

Vinícius Juliate Damaceno Fernandes

**Avaliação imuno-histoquímica de
formas modificadas de histonas
em queratocistos odontogênicos
submetidos à marsupialização**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Uberlândia, fevereiro de 2017

Vinícius Juliate Damaceno Fernandes

**Avaliação imuno-histoquímica de
formas modificadas de histonas em
queratocistos odontogênicos
submetidos à marsupialização**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola

Prof. Dr. João Paulo Silva Servato

Uberlândia, fevereiro de 2017

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

- F363a
2018
- Fernandes, Vinícius Juliate Damaceno, 1992
Avaliação imuno-histoquímica de formas modificadas de histonas em queratocistos odontogênicos submetidos à marsupialização / Vinícius Juliate Damaceno Fernandes. - 2018.
65 p. : il.
- Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.254>
Inclui bibliografia.
1. Odontologia - Teses. 2. Cistos odontogênicos - Teses. 3. Procedimentos cirúrgicos operatórios - Teses. 4. Imunohistoquímica - Teses. I. Cardoso, Sérgio Vitorino. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.314

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



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 nº332– COPOD

Data: 22/02/2018

Discente: Vinícius Juliate Damaceno Fernandes Matrícula: 11612ODO001

Título do Trabalho: **Avaliação das alterações globais de histonas em queratocisto odontogênico antes e após a marsupialização**

Área de concentração: Clínica Odontológica Integrada.

Linha de pesquisa: Patologia e diagnóstico bucal

As dez horas do dia vinte e dois de fevereiro do ano de 2018 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 2018, assim composta: Professores Doutores: Adriano Mota Loyola (UFU); João Paulo Silva Servato (UNIUBE); e Sérgio Vitorino Cardoso (UFU) orientador(a) do(a) candidato(a) **Vinícius Juliate Damaceno Fernandes**.

Iniciando os trabalhos o(a) presidente da mesa Dr. Sérgio Vitorino Cardoso 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) 1 provado(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 30 minutos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Adriano Mota Loyola (UFU)

Prof. Dr. João Paulo Silva Servato (UNIUBE)

Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso– UFU
Orientador (a)

Se viver requer coragem, então,
Viva para ser feliz e não viva em vão.
Chorão (CBJR)

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| RESUMO | 8 |
| ABSTRACT | 9 |
| 1 – INTRODUÇÃO | 11 |
| 2 - REVISÃO DE LITERATURA | 13 |
| 2.1 – Queratocisto odontogênico..... | 13 |
| 2.2 – Marsupialização..... | 16 |
| 2.3 – Histonas e suas modificações..... | 20 |
| 2.4 – Estudos epigenéticos em queratocisto odontogênico | 24 |
| 3 – OBJETIVOS | 26 |
| 3.1 – Objetivo Geral | 26 |
| 3.2 – Objetivos específicos | 26 |
| 4 – MATERIAIS E MÉTODOS | 27 |
| 4.1 – Casuística e amostras para análise..... | 27 |
| 4.2 – Imuno-histoquímica | 28 |
| 4.3 - Avaliação da expressão das modificações de histonas..... | 30 |
| 4.4 - Avaliação estatística | 32 |
| 5 – RESULTADOS | 33 |
| 5.1 – Dados Clínicos..... | 33 |

| | |
|---|-----------|
| 5.2 – Dados histopatológicos | 34 |
| 5.3 – Histonas modificadas | 34 |
| 6 – DISCUSSÃO | 43 |
| 7 – CONCLUSÃO | 49 |
| 8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |
| Anexo 1 | 60 |

RESUMO

O queratocisto odontogênico (QO) é uma lesão cística, intraóssea, localmente agressiva que apresenta características histopatológicas únicas. Seu tratamento pode ser desafiador devido às altas taxas de recidiva associadas à lesão. Neste sentido, uma técnica descrita para o tratamento do QO é a marsupialização seguida por enucleação do remanescente cístico. Esta modalidade de tratamento causa modificações no epitélio da lesão, acompanhadas por redução do tamanho da mesma. Os mecanismos que regulam estas modificações não estão totalmente elucidados na literatura. As proteínas histonas atuam na formação e manutenção da cromatina. Possuem uma calda N-terminal que permitem ligações reversíveis com a capacidade de causar silenciamento e ativação da transcrição do DNA. Ainda não se sabe o papel das modificações de histonas no queratocisto odontogênico. No presente estudo, 22 casos de QO tratados por marsupialização e posterior enucleação foram submetidas a imuno-histoquímica para detecção das histonas modificadas H3K9ac, H3K9me3, H3K18ac, H3K36me3 e H4K12ac, além do marcador de proliferação celular Ki-67. Verificou-se redução significativa nos níveis de H3K9me3 das amostras iniciais (obtidas por marsupialização) para as amostras finais (obtidas por enucleação) com epitélio cístico alterado. Foi detectada ainda correlação significativa entre a reatividade para Ki-67 e para as histonas modificadas H3K9ac, H4K12ac e H3K36me3 nas amostras finais com epitélio típico de QO. Esses resultados encontrados sugerem instabilidade do estado de heterocromatina, assim como uma perda da capacidade de reparo a dano no DNA, decorrentes da marsupialização e mediadas por modificações de histonas, em particular de H3K9me3.

Palavras-chave: Queratocisto odontogênico; Marsupialização; Histona

ABSTRACT

The odontogenic keratocyst (OKC) is a cystic, intraosseous, locally aggressive lesion that presents unique histopathological features. Its treatment can be challenging due to the high recurrence rates associated with the lesion. In this sense, one of the described techniques for the treatment of OKC is the marsupialization followed by enucleation of the cystic remnants. This modality of treatment causes modifications in the epithelium of the lesion, accompanied by a reduction in its size. The mechanisms that regulate these modifications are not fully elucidated in the literature. Histone proteins act in the formation and maintenance of chromatin. They have an N-terminal tail that allows reversible bonds with the ability to cause silencing and activation of DNA translation. The role of histone modifications in odontogenic keratocysts is not yet known. In the present study, 22 cases of OKC treated by marsupialization and subsequent enucleation were subjected to immunohistochemistry assays to detect the modified histones H3K9ac, H3K9me3, H3K18ac, H3K36me3 and H4K12ac, in addition to the cell proliferation marker Ki-67. There was a significant reduction in the H3K9me3 levels of the final samples (obtained by enucleation) for the altered cystic epithelium in relation to the initial samples (obtained by marsupialization). Significant correlation was also detected between reactivity for Ki-67 and for the modified histones H3K9ac, H4K12ac and H3K36me3 in the final samples with typical OKC epithelium. These results suggest heterochromatin state instability, as well as a loss of repair capacity to DNA damage, arising from marsupialization and mediated by histone modifications, in particular H3K9me3.

Keywords: Odontogenic Keratocyst; Marsupialization; Histone

1 – INTRODUÇÃO

O queratocisto odontogênico (QO) é uma lesão cística odontogênica caracterizada por revestimento de epitélio estratificado escamoso paraqueratinizado, bem como por ser localmente agressiva. Essa doença afeta os ossos gnáticos, especialmente a mandíbula. Shear & Speight, 2007; Speight *et al.*, 2017). O QO representa cerca de 11% de todos os cistos maxilo-mandibulares. Seu tratamento pode ser desafiador, devido ao seu destacado potencial de crescimento e às suas altas taxas de recidiva (Blanas *et al.*, 2000; Shear & Speight, 2007; Speight *et al.*, 2017).

Diversos tipos de tratamento, sempre de natureza cirúrgica, têm sido utilizados no manejo do QO. Além de remover a lesão, busca-se reduzir as chances de recidiva e ao mesmo tempo reduzir a morbidade decorrente do próprio tratamento. A ressecção cirúrgica é destacada como a abordagem mais efetiva, visto que resulta nas menores taxas de recidiva, todavia usualmente resulta em grande morbidade posterior. A enucleação com tratamento adjuvante de margens cirúrgicas também é muito empregada, porém pode gerar morbidade significativa dependendo da extensão da lesão ou de seu relacionamento com estruturas anatômicas nobres. Desta maneira, uma abordagem bifásica, composta por marsupialização para redução inicial do QO e posterior enucleação do resíduo cístico, tem sido recentemente utilizada com bons resultados (Nakamura *et al.*, 2002; Kolokythas *et al.*, 2007). Todavia, os mecanismos pelos quais a marsupialização desencadeia a redução do queratocisto odontogênico ainda são amplamente desconhecidos.

Histonas são proteínas responsáveis pela formação e manutenção da cromatina, e de fato constituem a maior parte da porção proteica dessa estrutura. Essas proteínas possuem uma cauda N-terminal que permite ligações com diversos grupos químicos tais como metil, acetil e fosfato, dentre outros, os quais mudam a acessibilidade de fatores de transcrição ao DNA. Dependendo das ligações existentes a cromatina entra em um estado mais

“aberto” – que permite a transcrição do DNA – ou mais “fechado” – causando silenciamento gênico. O estudo das mudanças das modificações das histonas tem despertado grande interesse na comunidade científica. A desregulação deste mecanismo, de natureza epigenética, pode favorecer a expressão errônea de genes e consequente formação de neoplasias (Feng *et al.*, 2012; Morgan e Shilatifard., 2015).

De fato, em alguns tipos de tumores a presença dessas modificações já é usada para se prever a evolução da doença, assim como a resposta ao tratamento. Porém, há poucos trabalhos sobre as modificações de histonas em relação ao comportamento biológico das mesmas.

Pelo exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar o tratamento do QO através da marsupialização seguida de enucleação, à luz das mudanças clínicas e histológicas produzidas na lesão, e especialmente, avaliar se estas mudanças estão relacionadas à mudança nos padrões de expressão das modificações de histonas estudadas através de técnica de imuno-histoquímica.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 – Queratocisto odontogênico

Cistos são cavidades patológicas revestidas por epitélio, que contém em seu interior material líquido ou semi-sólido. Cistos maxilares podem ter origem odontogênica e não-odontogênica, e no último caso podem ser ainda classificados em cistos de desenvolvimento ou cistos inflamatórios de acordo com a etiopatogênese da lesão (Shear & Speight, 2007; Neville *et al.*, 2009; Manor 2012).

O queratocisto odontogênico (QO) é uma lesão cística de desenvolvimento, praticamente restrita aos ossos gnáticos, caracterizada por revestimento epitelial estratificado pavimentoso paraqueratinizado, homogeneamente fino, com células basais empilhadas de núcleos hiper cromáticos, e cápsula também pouco espessa formada por tecido conjuntivo denso. Mostra comportamento invasivo e elevada chance de recidiva após tratamento (Shear & Speight, 2007; Speight *et al.*, 2017). Representa cerca de 11% de todos os cistos maxilo-mandibulares (Blanas *et al.*, 2000; Shear & Speight, 2007; Speight *et al.*, 2017).

O QO ocorre mais comumente na forma de lesões isoladas, porém a ocorrência múltipla também é possível, no contexto da síndrome dos carcinomas basocelulares nevídes (também denominada de Síndrome de Gorlin-Goltz), quando então associada a outras alterações tais como carcinomas basocelulares precoces e múltiplos, malformações ósseas e neoplasias malignas como o meduloblastoma (Todd & August, 2003; Scully *et al.*, 2010). Pacientes sindrômicos apresentam desenvolvimento contínuo de novos QO assim como recidivas de lesões anteriormente tratadas até os 30 anos, idade em que a formação de novas lesões tende a diminuir (Lo Muzio, 2008).

Ao longo dos anos, muito se tem sido discutido quanto à natureza e à classificação do QO, tendo sido classificado em 2005 como neoplasia e então denominado como tumor odontogênico queratocístico. Posteriormente, em 2017, foi reclassificado como cisto (Gomes, *et al.*, 2017; Speight *et al.*, 2017). O fato que mais pesou nesta decisão foi que neoplasias não regredem de tamanho espontaneamente ao retirar o estímulo que a causou. Este fato não é verdadeiro para o QO, que tende a regredir de tamanho após procedimentos descompressivos (Wright & Vered., 2017).

Acredita-se que o QO surja a partir de remanescentes da lâmina dental, em particular porque o crescimento infiltrativo da lesão mimetiza a migração daquela estrutura embrionária (Speight *et al.*, 2017). Estudos moleculares e genéticos identificaram mutações presentes no gene *PTCH*, relacionado à via de sinalização celular Sonic Hedgehog (Shh), em diversos casos esporádicos e sindrômicos de QO (Barreto *et al.*, 2000; Gomes *et al.*, 2009). Também tem sido verificada nessa doença a perda de heterozigosidade (LOH) em diversos genes supressores de tumor, tais como o próprio *PTCH* (Gomes *et al.*, 2009; Diniz *et al.*, 2017; Peacock, 2017).

Clinicamente, o QO ocorre principalmente em região posterior de mandíbula e ramo ascendente, com maior frequência em homens. O pico de incidência se encontra entre a segunda e quarta década de vida. É uma lesão intraóssea, encontrada quase exclusivamente nos ossos gnáticos, que surge de forma assintomática. Lesões grandes podem apresentar aumento de volume, dor, drenagem espontânea do conteúdo intraluminal (queratina), parestesia dos lábios inferiores, alterações de posicionamento e mobilidade dos dentes associados, além de ausências dentárias (Shear & Speight, 2007, Jafaripozve *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2017; Speight *et al.*, 2017).

Devido a sua característica assintomática, a maioria dos QO é diagnosticada fortuitamente em exames radiográficos solicitados por outros motivos (Shear & Speight, 2007; MacDonald-Jankowski, 2011). O QO é geralmente encontrado como lesão radiolúcida de bordas bem definidas predominantemente com aspecto unilocular (Zhao *et al.*, 2002). A lesão pode

estar relacionada a um dente não irrompido (impactado ou não), por vezes em relação coronária quando então é eventualmente denominado “queratocisto folicular”, requerendo a realização de diagnóstico diferencial especialmente para com o cisto dentífero (Regezi *et al.*, 2008; Neville *et al.*, 2009).

O diagnóstico do QO é definido a partir de suas características histopatológicas. A lesão exibe um padrão microscópico distinto, revestimento epitelial fino (composto de 6 a 10 camadas celulares), e por isso bastante friável. A camada basal apresenta células colunares e cuboidais de núcleos hipercromáticos. As células epiteliais superficiais se mostram pavimentosas, paraqueratinizadas, com a superfície muitas vezes corrugada. Figuras mitóticas podem ser encontradas nas camadas basal e suprabasal. A cápsula é usualmente fina, composta por tecido conjuntivo denso, o qual apresenta inflamação evidente em até 75% dos casos (Kaplan and Hirshberg, 2004; Speight *et al.*, 2017) Em alguns casos, displasias epiteliais podem ser encontradas, contudo transformações malignas para carcinoma de células escamosas são raras (Shear & Speight, 2007). Este padrão típico e diagnóstico do QO é alterado na presença de inflamação. Nessa situação, pode ocorrer no epitélio a formação de cones, acantose, perda das características das células basais e ausência de queratinização; no conjuntivo, além da própria inflamação, verifica-se espessamento da cápsula (Shear & Speight, 2007; Speight *et al.*, 2017).

A abordagem considerada mais eficaz para o tratamento do QO é a ressecção segmentar (Willians and Connor, 1994; Shear & Speight, 2007). Trata-se de abordagem agressiva, que busca diminuir ao máximo a persistência de células residuais da lesão e assim evitar recidivas (Willians and Connor, 1994). Verifica-se taxas de recidiva próximas a zero com esse tipo de tratamento (Tolstunov and Treasure, 2008; Mendes, 2010; Pogrel, 2013). Todavia, a ressecção está muitas vezes associada a resultados funcionais adversos para o paciente, tais como: parestesia de lábio inferior, necessidade de outros procedimentos cirúrgicos para corrigir o defeito ósseo com enxertos, aumento do risco a infecção, custo total do tratamento elevado, risco de

exposição da placa de reconstrução cirúrgica entre outros (Blanas *et al.*, 2000; Maurette *et al.*, 2006). Em particular, crianças e adolescentes estão sujeitas a problemas de desenvolvimento da face após abordagens cirúrgicas agressivas da mandíbula. Logo, buscam-se alternativas terapêuticas que consigam não apenas garantir um risco mínimo de recidivas mas também diminuir a morbidade decorrente do próprio tratamento (Pogrel, 2013).

Recidivas tendem a ocorrer em até cinco anos após a intervenção terapêutica primária para o QO (Blanas *et al.*, 2000). Quando a abordagem é a ressecção óssea a taxa de recidiva invariavelmente encontrada é de 0%. Todavia, diversos autores têm mais recentemente recomendado que a ressecção não seja o tratamento de primeira escolha para o QO, em função da agressividade excessiva da ressecção, com aumento da morbidade, e da baixa taxa de recidiva com a utilização de outras técnicas complementares à enucleação, (Blanas *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2010; Pogrel, 2013; de Castro *et al.*, 2017). Quando o QO é tratado por enucleação simples (sem abordagem complementar), a frequência de recidiva pode chegar a inaceitáveis 60% dos casos (Mendes *et al.*, 2010; Pogrel, 2013; de Castro *et al.*, 2017). Tratamentos complementares a enucleação tem sido usados com vistas a tornar este procedimento mais eficaz, mencionando-se a crioterapia (com recidivas documentadas em 11,5% dos casos), a marsupialização (17,8%) ou descompressão (11,9%) e a utilização da solução de Carnoy (7,8%) (de Castro *et al.*, 2017). A utilização de solução de Carnoy pode trazer danos à saúde do paciente, como toxicidade às estruturas nervosas assim como aos tecidos moles adjacentes, pele e danos aos os folículos dentais no caso de crianças. Em relação a crioterapia, há o risco de necrose celular no tecido ósseo (de Castro *et al.*, 2017).

2.2 – Marsupialização

A pressão interna do conteúdo cístico tem sido considerada força impulsora do crescimento dessas lesões (Pogrel, 2005; Shear & Speight,

2007). Dessa forma, procedimentos de descompressão tem sido proposto como alternativas terapêuticas para essas doenças (Pogrel, 2005; Manor *et al.*, 2012). De forma geral, tais procedimentos consistem em acessar a cavidade cística, permitindo a drenagem e a remoção de parte ou todo o seu conteúdo (Tolstunov and Treasure, 2008; Anavi *et al.*, 2011; Manor *et al.*, 2012). Técnicas de descompressão podem causar a redução de volume de cistos odontogênicos, inclusive daqueles de comportamento mais agressivo como o QO, e essas reduções podem acontecer rapidamente (Brøndum and Jensen (1991); Zhao *et al.*, 2011; Schlieve *et al.*, 2014).

A marsupialização é uma forma específica de descompressão aplicada originalmente ao QO por Partsch, em 1892. Nesse procedimento, além do acesso à cavidade cística realiza-se a síntese do revestimento cístico ao tegumento (pele ou mucosa) por onde foi realizado o acesso (Nakamura *et al.*, 2002; Pogrel, 2004). Pode-se lançar mão de dispositivos que permitam ou prolonguem a comunicação entre a cavidade cística e o meio externo, tais como cânulas (Marker *et al.*, 1996; Maurette *et al.*, 2006). Além da descompressão, considera-se que o efeito da marsupialização sobre o QO deva-se em parte ao contato do revestimento cístico – epitelial e conjuntivo – com o meio oral (Marker 1996; Maurette, 2006). Recomenda-se a enucleação do remanescente do QO, mesmo após sua marsupialização e redução de volume (Pogrel, 2005; Oliveros-Lopez *et al.*, 2017). A Figura 1 ilustra as etapas da marsupialização em um paciente com QO.

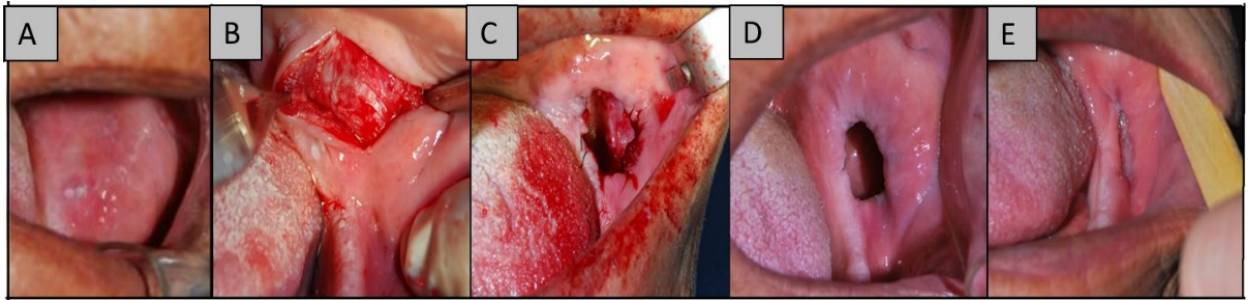


Figura 1- Paciente com queratocisto odontogênico tratado inicialmente por marsupialização. A) Região de fundo de vestibulo/ângulo mandibular esquerdo do paciente. B) Incisão na mucosa e localização da parede cística. C) Sutura do epitélio cístico à mucosa oral. D) 3 meses de marsupialização ativa. E) 13 meses de marsupialização ativa. Fonte: Imagens gentilmente cedidas pelo Dr. Luiz Fernando Barbosa de Paulo.

A marsupialização do QO tem o benefício de favorecer intervenção cirúrgica mínima reduzindo principalmente em grandes lesões, danos a estruturas anatômicas e a perda de dentes que podem estar associados à lesão. Neste sentido, o próprio espessamento conjuntivo e epitelial favorece a remoção integral do remanescente da lesão (Maurette *et al.*, 2006). A grande limitação da mesma é a dependência do comprometimento do paciente ao tratamento, pois o período de acompanhamento pode ser longo, com a necessidade de diversos retornos (August, 2003; Kolokythas *et al.*, 2007). Outros pontos críticos seriam o aumento da possibilidade de infecção da lesão devido ao contato direto com a cavidade oral, a possibilidade de obliteração da comunicação, e problemas na irrigação da lesão (Oliveros-Lopez *et al.*, 2017).

Anavi e colaboradores (2011), mostraram que a marsupialização pode ser utilizada para tratamento de cistos odontogênicos, e nos casos mais agressivos, a enucleação deve ser realizada. Verificou-se que a redução nas dimensões das lesões marsupializadas na mandíbula é maior que na maxila, e que cistos grandes têm uma maior taxa de redução por mês que os pequenos (Berge *et al.*, 2016; Oliveros-Lopez *et al.*, 2017).

Os dados de recorrência encontrados através da marsupialização seguida de enucleação variam de 0 a 24,4% (Pogrel and Jordan, 2004; Kolokythas *et al.*, 2007; Berge *et al.*, 2016). Em relação a correlação dos dados

clínicopatológicos e a recorrência da lesão, nenhuma diferença estatística foi encontrada quanto a idade, o sexo dos pacientes, a localização da lesão, e a presença de sintomas. Já para as características radiográficas, as lesões multiloculares tendem a recorrer mais que aquelas uniloculares (Berge *et al.*, 2016; de Castro *et al.*, 2017). Há ainda que destacar que os casos sindrômicos apresentam altas de recidivas, chegando a 60% (Lo Muzio, 2008). Porém, nestes pacientes, a “recorrência” observada pode ser uma nova lesão, o que aumentaria artificialmente as taxas de recidivas de um determinado tratamento (Blanas *et al.*, 2000). A recorrência da lesão pode acontecer até 10 anos após o tratamento, assim o acompanhamento prolongado é recomendado por período indeterminado (Maurette *et al.*, 2006; KOLOKYTHAS *et al.*, 2007).

Após marsupializados, verifica-se alterações significativas no aspecto histopatológico dos QO. Tais alterações provavelmente decorrem da inflamação provocada pela própria manipulação cirúrgica e pelo contato com o meio bucal (August *et al.*, 2013). O epitélio típico descrito anteriormente torna-se mais espesso, com aumento do número de camadas de células, formando projeções epiteliais, muitas vezes perdendo a sua característica de células basais hipercromáticas, aproximando seu aspecto de outros cistos maxilares e da mucosa oral. Importante destacar que mesmo nas lesões marsupializadas é usual encontrar parte do epitélio que mantém características típicas de QO (Marker *et al.*, 1996; Ninomiya *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002).

Clark *et al.*, (2006) mostrou que essas alterações sugerem atividades de crescimento e proliferação, e não estão relacionadas as proteínas Ki-67, p53, e EGFR, as quais foram pesquisadas antes e após a marsupialização e se mantiveram sem diferenças estatísticas, com tendência de aumento na expressão de EGFR após a intervenção. Diniz e colaboradores, em (2012), mostraram que as células epiteliais do QO marsupializado tem característica anti-apoptótica, havendo redução nos níveis de BCL-2.

A marsupialização seguida da enucleação é uma opção segura e efetiva no tratamento da lesão, tendo uma abordagem menos invasiva e desfigurante, que diminui o desconforto do paciente (Brøndum *et al.*, 1991;

Maurette *et al.*, 2006; Kolokythas *et al.*, 2007; Anavi *et al.*, 2011). Devido a estas características, aliada ao fato de não afetar negativamente a taxa de recorrência da lesão, ela pode ser utilizada como tratamento de primeira escolha para o QO (Nakamura *et al.*, 2002).

Apesar da bem documentada redução do tamanho do QO após a marsupialização, os mecanismos que regulam esta redução ainda não estão totalmente elucidados. Assim, faz-se necessário mais estudos sobre como a marsupialização age no QO, alterando suas características microscópicas e moleculares (Clark *et al.*, 2006; Nakamura *et al.*, 2002; Pogrel, 2013).

2.3 – Histonas e suas modificações

As modificações de histonas são um tipo de fenômeno epigenético. A epigenética consiste em alterações hereditárias estáveis sem que haja alterações na sequência de DNA (Berger *et al.*, 2009; Füllgrabe *et al.*, 2011). Fenômenos epigenéticos favorecem a ativação ou silenciamento de genes específicos através da adição ou remoção de radicais químicos a molécula de DNA, de modificações das histonas, e de formas interferentes de RNA (Herceg, 2016; Cortopassi *et al.*, 2016). A epigenética tem ganhado destaque no estudo da carcinogênese, visto que este processo pode ser iniciado através de mecanismos epigenéticos, a partir da ativação de oncogenes, de silenciamento de genes supressores de tumor e de defeitos ou da inativação do reparo de DNA (Estteler *et al.*, 2001; Herceg, 2016; Chakravarthi *et al.*, 2016).

As histonas constituem a principal porção proteica da cromatina. São alcalinas e encontradas no núcleo das células eucariontes (Deckert & Struhl, 2001; Gregory *et al.*, 2001; Youngson, 2006). Sua principal função está associada à formação da cromatina, que é um complexo formado pelo DNA e por histonas (Wolffe, 1998; Herceg, 2016). A menor estrutura da cromatina é denominada nucleossomo. Cada nucleossomo é formado por oito histonas, sendo duas de cada tipo (H2A, H2B, H3 e H4). Este octâmero é formado por

dois dímeros H2A-H2B e um tetrâmero composto por dois dímeros H3-H4, que se localiza centralmente enquanto os dímeros se acomodam em lados opostos. O DNA então se enrola a este octâmero 1,75 vezes, tendo aproximadamente 147 nucleotídeos contidos na volta. A histona H1 interage com o DNA de ligação, atuando na organização da fita de 30nm que vai de um nucleossomo ao outro (Wolffe, 1998; Smith, 1991; Kouzarides, 2007; Alberts *et al.*, 2010).

As histonas possuem ainda uma calda N-terminal que podem sofrer modificações pós-traducionais reversíveis, que por sua vez modulam a acessibilidade ao DNA na cromatina. Essas modificações incluem acetilação e metilação de lisina e arginina, fosforilação de serina e treonina, ubiquitinação de lisina, glicosilação, entre outros, sendo realizadas por enzimas específicas de maneira dinâmica (Deckert & Struhl, 2001; Feng *et al.*, 2012; Biterge & Schneider, 2014). Esta maquinaria complexa resulta em um estado mais “aberto” ou “fechado” da cromatina, permitindo assim a ativação ou silenciamento da expressão gênica (Deckert & Struhl, 2001; Biterge & Schneider, 2014; Feng *et al.*, 2012). As enzimas reguladoras deste código, bem como mutações nas próprias histonas têm sido descritas em diversos tipos de câncer, sendo que a superexpressão e a queda na expressão de tipos específicos de modificações de histonas já são utilizados como fatores preditivos da evolução e recorrência de tumores na próstata, pulmão e no intestino (Fullgrabe *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012; Elsheikh *et al.*, 2009; Morgan & Shilatifard, 2015).

A cauda N-terminal das histonas H3 e H4 possuem carga positiva quando desacetiladas, resultando em uma ligação mais justa com o DNA, devido à carga negativa do mesmo. Assim, a acetilação das histonas tem um potencial de descondensar a cromatina devido à inibição desta interação de cargas, ativando a ação de genes. O status de acetilação do resíduo de lisina das histonas ocorre através do trabalho de duas enzimas; a acetiltransferase de histona (HAT) e a desacetilase de histona (HDAC). Há dois tipos de HATs: o tipo-B, que são citoplasmáticas e agem sobre as histonas recém sintetizadas mas não naquelas associadas à cromatina; e o tipo-A, que são nucleares e

mais diversas que o tipo-B, sendo exemplificadas por pelo menos três famílias, GNAT, MYST e CBP/p300. As HATs utilizam acetilcoenzima-A como cofator para catalisar a transferência de um grupo acetil para a cadeia lateral de uma lisina. Com isso, a carga positiva da lisina é perdida, diminuindo o potencial de interação entre as histonas e o DNA. Já as HDACs, são uma classe de enzimas que possuem função oposta às HATs, atuando em processos incluindo transdução de sinal, apoptose, regulação do ciclo celular e crescimento celular. Como as HATs, elas atuam no núcleo e no citoplasma, catalizando a desacetilação em proteínas histonas e não-histonas através de associação com diversos complexos de proteínas. (Kouzarides, 2007; Taby & Issa, 2010; Banister & Kouzarides, 2011; Yen *et al.*, 2016).

Diferentemente da acetilação, o processo de metilação das histonas está associado tanto a repressão quanto ativação da transcrição, dependendo especificamente do local afetado, e não afeta a carga elétrica das histonas (Taby & Issa, 2010; Banister & Kouzarides 2011; Yen *et al.*, 2016). A metilação nas lisinas 4, 36 e 79 da histona H3 normalmente ocorre em genes ativos, enquanto a metilação da lisina 9 e 20 de H3 e 27 de H4 estão normalmente associadas a inativação gênica (Yen *et al.*, 2016). As lisinas podem ser mono, di, ou trimetiladas, enquanto as argininas podem ser mono, ou bi metiladas simetricamente ou não (Banister & Kouzarides 2011). Elas são catalisadas por um grande número de enzimas, a maioria das quais contém um módulo de proteína específico chamado domínio SET. As enzimas metiltransferase de histonas (HKMT) tendem a ser muito específicas, visto que cada enzima atua sobre um resíduo de lisina específico, metilando-o em um nível específico (mono, di ou trimetilação). Semelhante à acetilação / desacetilação, a metilação das histonas é reversível e catalisada por duas famílias de desmetilases de histonas (HDMTs), nomeadas demetilase lisina específica 1 (LSD1) e enzimas contendo o domínio Jumonji (Taby & Issa, 2010).

A trimetilação da lisina 9 da histona H3 (H3K9me3) é associada a repressão do processo de transcrição enquanto a acetilação desta mesma lisina (H3K9ac) está ligada a áreas ativas da cromatina. A acetilação dessa

lisina impede a sua metilação, sendo encontrada em regiões próximas ao início do processo de transcrição. Ela está envolvida em processo de proliferação celular, migração celular, regulação da diferenciação celular, regula negativamente processos de apoptose e sinalização célula a célula (Fullgrabe *et al*, 2011; Li *et al*, 2013; Karsli-Ceppioglu *et al.*, 2017; Triff *et al.*, 2017). Em 2009, Elsheikh e colaboradores mostraram que níveis altos de H3K9ac em câncer de mama está associado a um prognóstico favorável. Karsli-Ceppioglu *et al.*, (2017) analisou subtipos de cânceres de mama e descreveu a H3K9ac como responsável pela desregulação do gene PAX3, estando assim relacionada a um fator prognostico negativo para tumores positivos para HER2. Já em tumores de próstata e ovário, a queda nos níveis de H3K9ac está ligado a progressão tumoral e um pior prognóstico (Fullgrabe *et al*, 2011).

Já a H3K9me3 está associada a resposta celular a dano no DNA, criando uma área repressiva no local e iniciando o processo de reparo sendo removido posteriormente para permitir melhor acesso das proteínas responsáveis pelo reparo (Cao *et al.*, 2016). A histona H3k36me3, similarmente a H3K9me3 é importante para o recrutamento de fatores de reparo, abrindo a cromatina e facilitando o acesso ao DNA e participando no processo de transcrição como recrutador de complexos de leitura do DNA, prevenindo a transcrição em lugares indesejados do genoma (Li *et al.*, 2013; Cao *et al.*, 2016; Gates *et al.*, 2017). Há trabalhos que mostram redução nos níveis globais de H3K36me3 em tecidos tumorais, devido a uma mutação da histona H3, que inibe a sua metilação (Morgan and Shilatifard, 2015; Fang *et al.*, 2016; Gates *et al*, 2017).

A acetilação da histona H3K18 é estudada em diversos tumores, associada ao câncer de próstata com um aumento no estágio do tumor mas com menor chance de recorrência, sugerindo uma melhor resposta ao tratamento. Já em câncer de pulmão e rim, os resultados mostraram que casos com baixos níveis de H3K18ac e H3K12ac está relacionada a pior prognostico, enquanto para o câncer pancreático o aumento nos níveis de H3K18ac e H4K12ac relaciona-se com menor sobrevida (Juliano *et al.*, 2016). Tzao e

colaboradores, (2009) mostraram que para carcinomas espinocelulares de esôfago, pacientes com expressão baixa de H3K18ac têm maior chance de sobrevida do que casos com alta expressão, principalmente em estágios iniciais da doença, servindo como biomarcador para a lesão.

Fica claro que o significado das modificações de histonas varia entre diferentes tipos de tumores, e até entre diferentes tipos histológicos de um mesmo tumor, tornando assim o seu mapeamento importante para o entendimento da tumorigênese e progressão tumoral, auxiliando no desenvolvimento de terapias específicas para o tratamento de diversas lesões, inclusive não neoplásicas.

2.4 – Estudos epigenéticos em queratocisto odontogênico

A metilação do DNA é um evento epigenético caracterizado pela adição de um grupo metil na citosina dentro das ilhas CpG pela proteína DNA metiltransferase, com isto há o remodelamento da cromatina, seletivamente ativando ou inativando genes (Gomes, *et al.*, 2009). Este é o fenômeno epigenético mais estudado, e os padrões de metilação são observados em diversas doenças, incluindo até tumores benignos e cânceres (Gomes, *et al.*, 2009; Fullgrabe *et al.*, 2011; Pereira *et al.*, 2017). A hipermetilação foi estudada como alternativa para inativação do PTCH, mas os resultados mostraram que ela não foi encontrada em QO esporádicos e sindrômicos (Gomes *et al.*, 2017). De acordo com o trabalho feito por Pereira *et al.*, (2017), que estudou a metilação de DNA de 22 genes relacionados com a apoptose em QO, a marsupialização gera um padrão diferente de metilação destes genes, que não foi acompanhado por alteração na expressão gênica dos mesmos.

Há ainda os chamados microRNAs (miRNA), que são pequenos RNAs não-codificantes. Eles medeiam a expressão gênica em pós-transcricional através de degradação ou repressão de um RNA mensageiro. A alta expressão de miRNA oncogênico pode reduzir a produção de proteínas de genes supressores de tumor (Gomes, 2009). Em um estudo realizado em 2012,

Diniz *et al* revisou o papel do miR-15a/16-1 miRNA na expressão de Bcl-2 em QO, encontrando um aumento na expressão destes miRNAs após a marsupialização, que poderia explicar a queda nos níveis de Bcl-2 após o tratamento.

Apesar dos trabalhos descritos acima, o estudo epigenético do QO, e sua influência na patogênese da lesão ainda são escassos. Ao conhecimento dos autores, não há na literatura nenhum trabalho que aborde o papel das modificações de histonas nessa lesão. Tal conhecimento pode despertar novas investigações acerca do tema, podendo em um segundo momento, serem norteadoras de terapias mais efetivas no tratamento da lesão e na previsão de recorrência.

3 – OBJETIVOS

3.1 – Objetivo Geral

Ampliar o conhecimento sobre a resposta de queratocistos odontogênicos à marsupialização, com foco no estudo de formas modificadas de histonas.

3.2 – Objetivos específicos

1. Selecionar casuística de pacientes com QO tratados por marsupialização e posterior enucleação, com amostras teciduais disponíveis da abordagem cirúrgica inicial (marsupialização) e definitiva (enucleação);
2. Investigar a presença, nas amostras em estudo, de histonas modificadas específicas, a saber: H3K9ac, H3K9me3, H3K18ac, H3K36me3 e H4K12ac, além do antígeno de proliferação celular Ki-67, por ensaios imuno-histoquímicos, seguida pela avaliação morfológica e semi-quantitativa da reatividade dessas moléculas.
3. Avaliar comparativamente os padrões de reatividade imuno-histoquímica e os dados clinicopatológicos dos casos, à busca de associações entre os padrões, comportamento biológico e a resposta terapêutica das lesões.

4 – MATERIAIS E MÉTODOS

Este estudo foi previamente avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Uberlândia, sob o protocolo 2.001.481.

4.1 – Casuística e amostras para análise

Inicialmente, foram identificados todos os casos diagnosticados como QO pelo Laboratório de Patologia do Hospital Odontológico da Universidade Federal de Uberlândia, no período de março de 1998 a julho de 2014. Em seguida, mediante consulta aos pedidos de exame anátomo-patológico e aos prontuários odontológicos dos pacientes, a casuística foi restrita apenas aos casos tratados por marsupialização seguida de enucleação, excluindo-se ainda casos síndrômicos, que não continham material tecidual arquivado em quantidade suficiente para as análises histológicas previstas no estudo, ou que não satisfaziam plenamente os critérios definidores do QO reconhecidos pela Organização Mundial da Saúde (Speight *et al.*, 2017).

Com a finalidade de caracterização amostral bem como para análises posteriores, informações clínicas e radiográficas foram recuperadas dos prontuários odontológicos dos casos, incluindo idade e sexo dos pacientes, localização, características radiográficas, tamanho estimado (maior diâmetro inicial e após marsupialização), tratamento (incluindo intercorrências) e preservação (período de marsupialização, ocorrência de recidivas) das lesões.

De forma geral, a indicação e a execução do tratamento por marsupialização e posterior enucleação seguiram as recomendações de Marker *et al.* (1996). Apenas lesões extensas ou em vizinhança muito próxima a estruturas anatômicas críticas foram selecionadas para marsupialização. Esse procedimento consistiu em anestesia local, seguida por incisão horizontal

na mucosa vestibular no local da lesão, com rebatimento de retalho de espessura total e acesso a cápsula cística após osteoplastia. Após o acesso inicial, realizou-se incisão para remoção de um segmento com aproximadamente 1cm² da parede da lesão. Em lesões multiloculares, as partições intracísticas foram removidas por curetagem para se obter uma única cavidade cística. Em seguida, as margens da mucosa foram reposicionadas e ancoradas às margens da parede cística mediante suturas com fios reabsorvíveis. Os pacientes foram instruídos a seguir dieta pastosa por uma semana e a manterem higiene oral apropriada, incluindo bochecho duas vezes ao dia com solução aquosa de digluconato de clorexedina a 0,12%, e duas irrigações com a mesma solução da bolsa criada pela marsupialização. Todos os pacientes foram submetidos a avaliações clínico-radiográficas trimestrais, até a enucleação das lesões. A enucleação consistiu na remoção de todo o remanescente da lesão juntamente com excisão da mucosa sobrejacente e curetagem do osso sadio em 2 a 3mm de profundidade usando uma broca esférica grande.

4.2 – Imuno-histoquímica

Os ensaios imuno-histoquímicos foram realizados com a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, utilizando espécimes teciduais dos casos de interesse fixados em formol a 10% por pelo menos 24 horas e incluídos em parafina.

Para tanto, cortes histológicos com 4µm de espessura foram obtidos de cada amostra em estudo e colocados em lâminas sinalizadas. Depois de desparafinados em xilol e hidratados em soluções aquosas com concentrações decrescentes de etanol, os cortes foram submetidos a recuperação antigénica com solução de EDTA (1mM, pH 8,0) e Tween 20 (Sigma Chemical Co, St Louis, EUA) em câmara automatizada para controle de temperatura e pressão (Biocare, Concord, CA, EUA), durante 15 minutos a 110°C. Realizou-se então bloqueio da atividade endógena de peroxidase com três banhos de dez

minutos cada em solução aquosa de peróxido de hidrogénio (10%), seguidas por lavagem em água destilada.

Na etapa seguinte, os cortes foram submetidos a três banhos de cinco minutos cada em solução-tampão TRIS-HCl (pH 7,4), e então incubados com solução bloqueadora de reações inespecíficas a base de caseína (Background Sniper, Biocare Medical, Concord, CA, EUA) por 15 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com os anticorpos primários (produzidos por ABCAM, Cambridge, Reino Unido), incluindo-se o marcador de proliferação celular Ki-67 para fins comparativos, cujas características são mencionadas no Quadro 1. A incubação foi realizada em câmara úmida, por duas horas, à temperatura ambiente.

Quadro 1 – Informações sobre os anticorpos primários utilizados no estudo.

| Especificidade | Referência do fabricante | Clonalidade | Lote de fabricação | Título de trabalho |
|-----------------------|---------------------------------|--------------------|---------------------------|---------------------------|
| H3K9ac | ab10812 | Policlonal | GR12997-1 | 1:1000 |
| H3K9me3 | ab8898 | Policlonal | GR130993-2 | 1:2000 |
| H3K18ac | ab1191 | Policlonal | GR12997-1 | 1:2000 |
| H3K36me3 | ab9050 | Policlonal | GR114293-1 | 1:5000 |
| H4K12ac | ab61238 | Policlonal | GR38757-3 | 1:20000 |
| Ki-67 | ab1667 | Policlonal | GR138905-1 | 1:1000 |

Após lavagem em TRIS-HCl, procedeu-se à amplificação da reação com sistema de estreptavidina-biotina-peroxidase (Starr Trek, Biocare Medical, Concord, CA, EUA). Essa consistiu inicialmente na incubação com solução de anticorpo secundário biotilado, por 20 minutos, à temperatura ambiente, seguida por lavagem em solução de TRIS-HCl (2 banhos de 2 minutos cada), e incubação novamente por 10 minutos à temperatura ambiente em solução de estreptavidina conjugada a peroxidase.

Finalmente, após nova lavagem em TRIS-HCl, a reação foi revelada com a imersão dos cortes histológicos em solução aquosa de 3,3'-tetrahidrocloreto de diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio, por cinco minutos, com precipitação resultante do pigmento oxidado, seguido de banho em água corrente por outros cinco minutos para lavagem, levando-os pôr fim à contracoloração com hematoxilina de Harris e lavados em água corrente.

Após essa etapa, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 80%, 90% e duas vezes a 100%), diafanizados em dois banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e resina histológica (Precision, Cralplast, China).

Como controles positivos, foram considerados tecidos das próprias amostras avaliadas (controles internos) previamente indicados como reativos para os anticorpos em estudo, pelo fabricante e pelo banco de dados www.proteinatlas.com. A omissão dos anticorpos primários foi empregada como controle negativo.

4.3 - Avaliação da expressão das modificações de histonas

Previamente à análise específica, todas as lâminas submetidas a imuno-histoquímica foram digitalizadas com o *scanner* Aperio Scanscope Turbo AT (Leica Biosystems, Alemanha) e em seguida visualizadas com o *software* Aperio Imagescope (Leica Biosystems).

Para fins de análise de cada caso, considerando-se as amostras obtidas quando da marsupialização e aquelas obtidas pela enucleação, as primeiras foram definidas como “iniciais” e as últimas como “finais”. Além do momento de obtenção das amostras, a análise do resultado dos ensaios imuno-histoquímicos de cada caso considerou também a morfologia epitelial nas amostras finais, resultando na seguinte distribuição de áreas de interesse para cada caso:

- 1 – Nas amostras iniciais, áreas com epitélio típico de QO;
- 2 – Nas amostras finais, áreas com epitélio típico de QO;

3 –Nas amostras finais, áreas com epitélio cístico não típico de QO (com camada basal inconspícua, acantótico, de queratinização discreta ou ausente);

Ainda, em cada área de interesse, a avaliação foi realizada especificamente nas regiões em que as características morfológicas de cada apresentação do epitélio cístico se mostravam mais preservadas e em que a marcação se mostrava mais evidente (*hotspots*). A partir dos *hotspots*, foram então capturadas imagens correspondentes a até 10 campos microscópicos de grande aumento (conforme disponibilidade em cada amostra), de forma sequencial e sem repetição, em formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

A análise específica empregou método semi-quantitativo, com o método de Quickscore (QS) (Detre, 1995). Dessa forma, a reatividade para cada antígeno nos núcleos dos queratinócitos foi estimada mediante um índice (QS), composto pelo produto dos escores atribuídos a dois componentes, a saber: proporção de células marcadas e intensidade predominante de marcação, conforme apresentado no Quadro 2.

Quadro 2 – Componentes do índice de Quickscore (Detre, 1995).

| Componente | Escore | Significado |
|--------------------------------------|---------------|-------------------------------|
| Porcentagem de células marcadas | 1 | 0 a 4% de células reativas |
| | 2 | 5 a 19% de células reativas |
| | 3 | 20 a 39% de células reativas |
| | 4 | 40 a 59% de células reativas |
| | 5 | 60 a 79% de células reativas |
| | 6 | 80 a 100% de células reativas |
| Intensidade predominante de marcação | 0 | Ausente |
| | 1 | Fraca |
| | 2 | Moderada |
| | 3 | Intensa |

4.4 - Avaliação estatística

Os dados obtidos foram inicialmente avaliados por estatística descritiva considerando, quando pertinente, o emprego de categorias, médias, medianas e frequências relativas (percentuais).

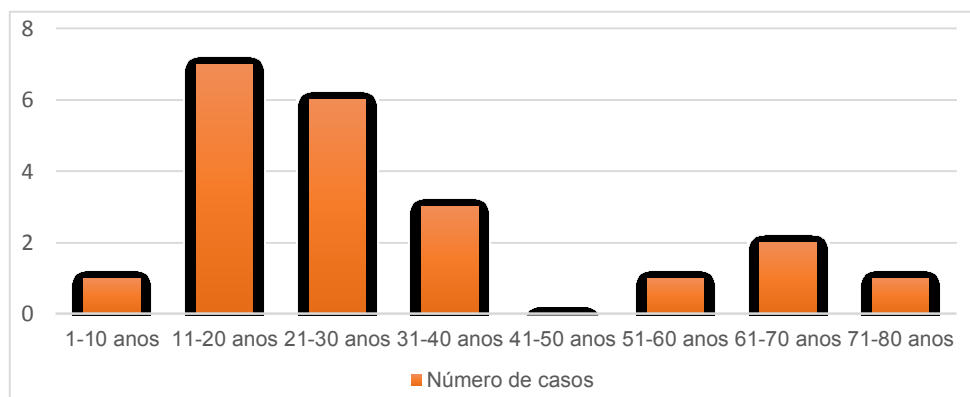
Considerando a natureza semiquantitativa da avaliação imunohistoquímica com o índice QS (Klopffleisch, 2013), foram realizadas análises estatísticas para variáveis não paramétricas, com os testes estatísticos de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn's para análises de associação, e de Spearman para análises de correlação. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 – RESULTADOS

5.1 – Dados Clínicos

O estudo foi composto por 21 pacientes, com predomínio de homens em proporção de 14:8 para mulheres. Em um caso, uma paciente teve duas lesões individuais, que foram tratadas de forma independente. A média de idade dos pacientes foi de 29,7 anos, com variação de 9 a 75 anos de idade e maior frequência de casos na segunda e terceira décadas de vida, conforme apresentado no Gráfico 1.

Gráfico 1 - Frequência dos casos de QO analisados por década de vida Fonte: próprio autor



Quanto à localização, muitas lesões compreendiam mais de um local simultaneamente. Considerando apenas o epicentro de cada lesão, o corpo mandibular foi a região mais afetada somando 15 lesões (48,4%), seguida pelo ramo mandibular 11 lesões (35,5%), maxila 3 lesões (9,7%), e sínfise mandibular 2 lesões (6,4%). Radiograficamente, 81% dos QO eram uniloculares, e 40% das lesões estavam associadas a dentes inclusos.

A extensão máxima das lesões à época da marsupialização era em média de 5cm (desvio-padrão de 2,1cm). O período mediano de marsupialização foi de oito meses, variando entre 2 e 33 meses. Quando da enucleação, os remanescentes císticos apresentavam em média 1,3cm (desvio-padrão de 0,5cm) em seu maior diâmetro.

Após a enucleação, o período mediano de acompanhamento dos pacientes foi de 53 meses (4,4 anos), variando entre 12 e 168 meses, e em nenhum caso foi notada recidiva da lesão.

5.2 – Dados histopatológicos

Todas as amostras iniciais apresentavam predominantemente áreas com morfologia típica para QO do revestimento epitelial, havendo ainda áreas focais de epitélio alterado, quase sempre associado a inflamação na cápsula da lesão. Nas amostras finais, tal distribuição se invertia em decorrência do amplo predomínio de áreas com epitélio alterado (não típico de QO), acompanhadas por cápsula espessa e intensamente inflamada, ainda que sempre tenha sido possível identificar nessas amostras áreas – minoritárias – de epitélio típico.

Nas amostras iniciais, provenientes da marsupialização, inflamação moderada ou intensa estava presente em 56% dos casos. Nas amostras finais obtidas pela enucleação, 91% das áreas com epitélio típico de QO estavam associadas a inflamação moderada ou intensa, a qual era identificada em 100% das áreas com epitélio não-típico de QO).

5.3 – Histonas modificadas

Em relação a H3K9me3, a marcação foi de intensidade predominantemente moderada, com frequência de 80 a 100% de células marcadas, distribuída igualmente em todas as camadas epiteliais,

independentemente do tipo de amostra (inicial ou final) e do padrão histológico (típico ou não-típico de QO). Verificou-se redução significativa do QS quando comparadas as amostras iniciais (com epitélio típico) às finais com epitélio não-típico ($p = 0,0412$), conforme ilustrado na Figura 2.

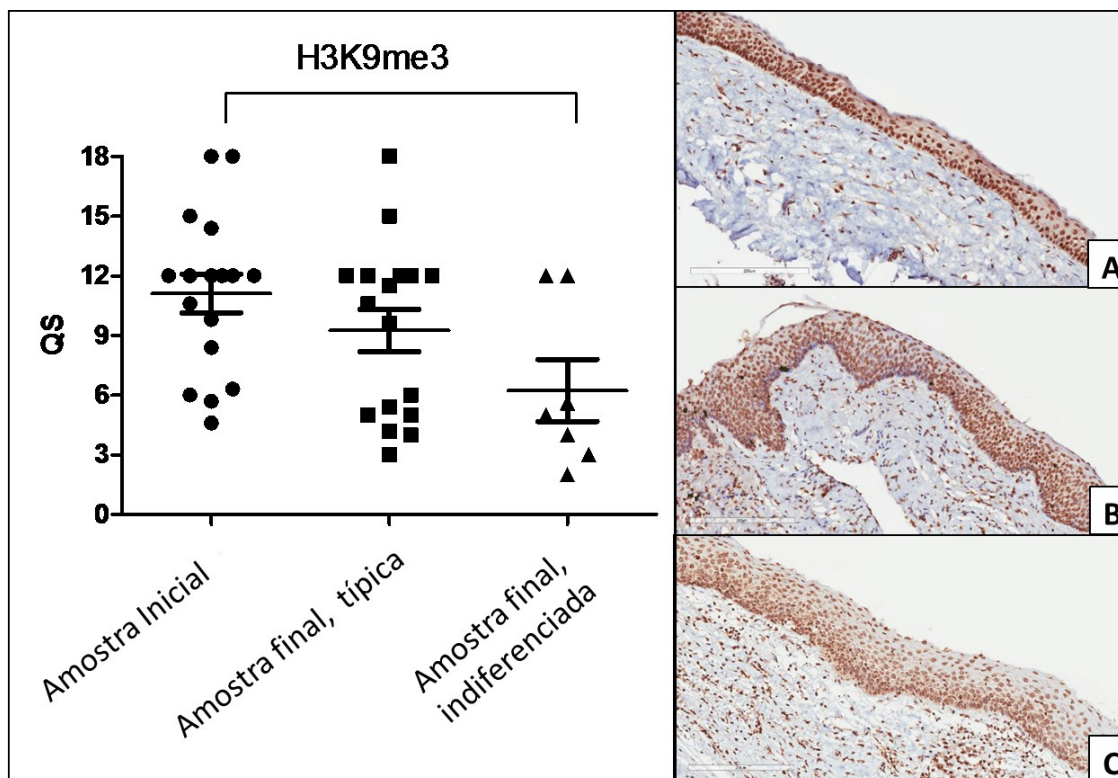


Figura 2 - Gráfico da expressão de H3K9me3 nos grupos estudados e suas imagens representativas. A barra indica diferença estatística entre os grupos marcados ($p=0,0412$). Ao lado, imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase): A) Amostra inicial (n=17); B) Amostra final, com epitélio típico de QO (n=17); C) Amostra final com epitélio não típico (n=7).

Para a H3K9ac a marcação foi homogeneamente intensa, também distribuída por todas as camadas epiteliais em todas as amostras, também com frequência de 80 a 100% das células marcadas. Verificou-se redução no valor de QS das amostras iniciais para as finais, todavia sem diferenças estatísticas ($p = 0,4437$). O gráfico da avaliação assim como imagens representativas dos grupos pode ser encontrado na Figura 3.

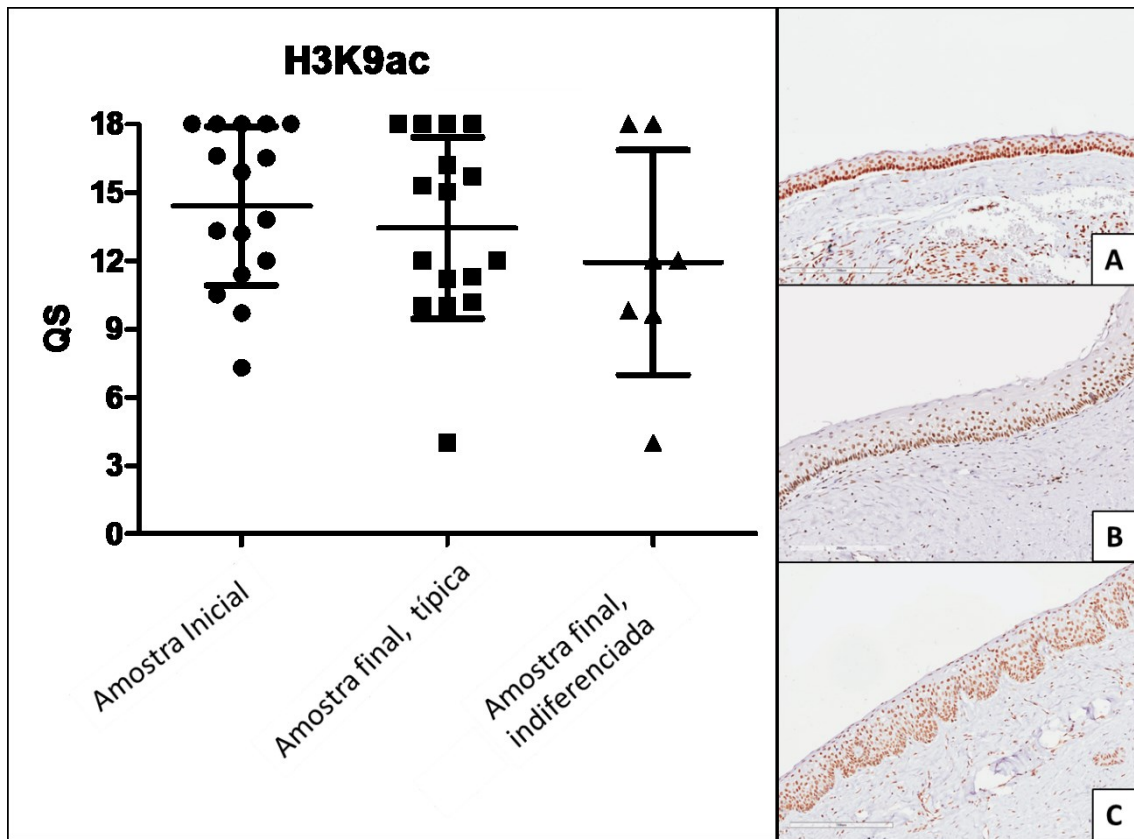


Figura 3 - Gráfico da expressão de H3K9ac nos grupos estudados e suas imagens representativas. Ao lado, imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase) ($p=0,4437$): A) Amostra inicial (n=16); B) Amostra final, com epitélio típico de QO (n=16); C) Amostra final com epitélio não típico (n=7).

Já para H3K36me3, a marcação foi predominantemente moderada, com distribuição homogênea em todas as camadas epiteliais de todas as amostras dos diferentes padrões, com frequência 80 a 100% de células marcadas. Assim como no caso anterior, houve redução nos valores de QS das amostras iniciais para as finais, sem diferença estatística significativa ($p = 0,3356$). A Figura 4 traz as informações dos grupos estudados assim como imagens representativas de cada grupo.

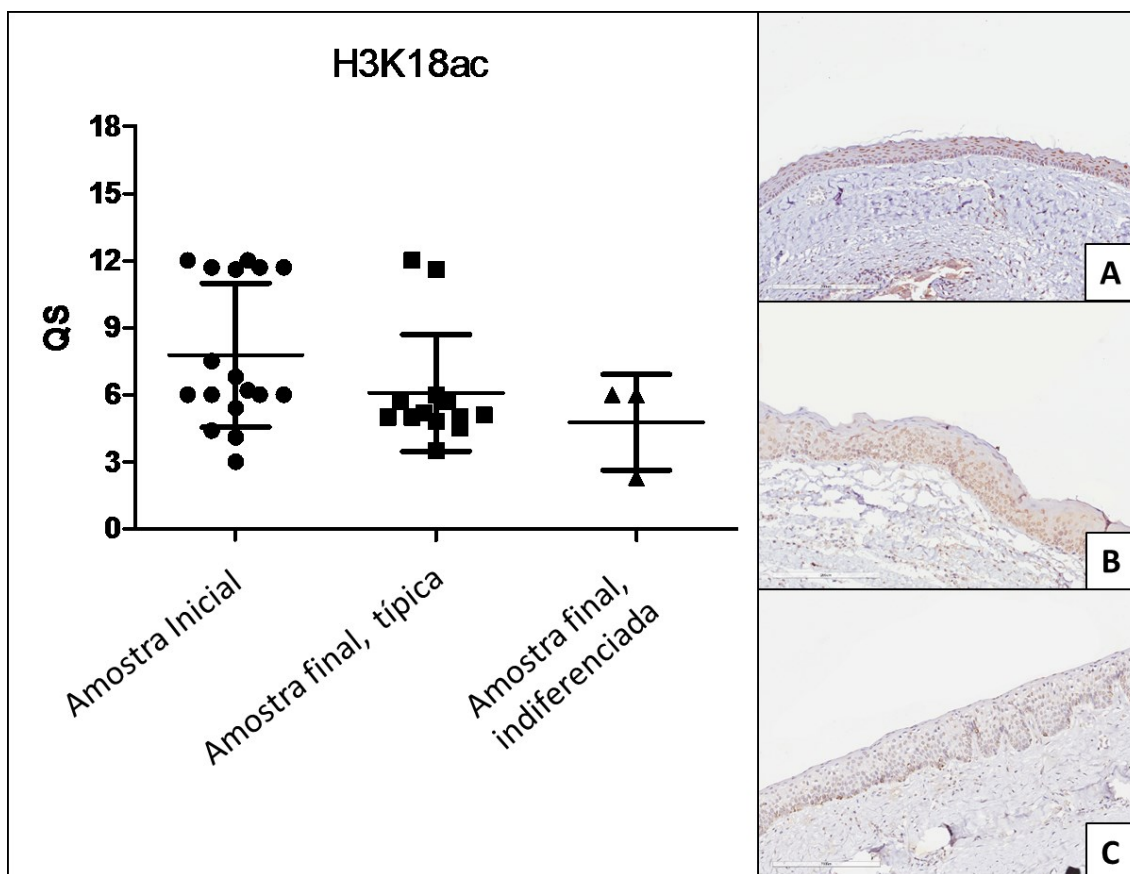


Figura 5 - Gráfico da expressão de H3K18ac nos grupos estudados e suas imagens representativas. Ao lado, imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase) ($p=0,0904$): A) Amostra inicial (n=18); B) Amostra final, com epitélio típico de QO (n=14); C) Amostra final com epitélio não típico (n=3).

Para H4K12ac, a marcação foi homogeneamente intensa e presente em toda a espessura epitelial em todas amostras iniciais e finais. Houve alta frequência de células marcadas (80-100%). Também foi notado queda na expressão após a marsupialização, sem diferenças estatísticas ($p=0,4785$). As imagens representativas dos grupos estudados assim como o gráfico da reação estão na imagem 6.

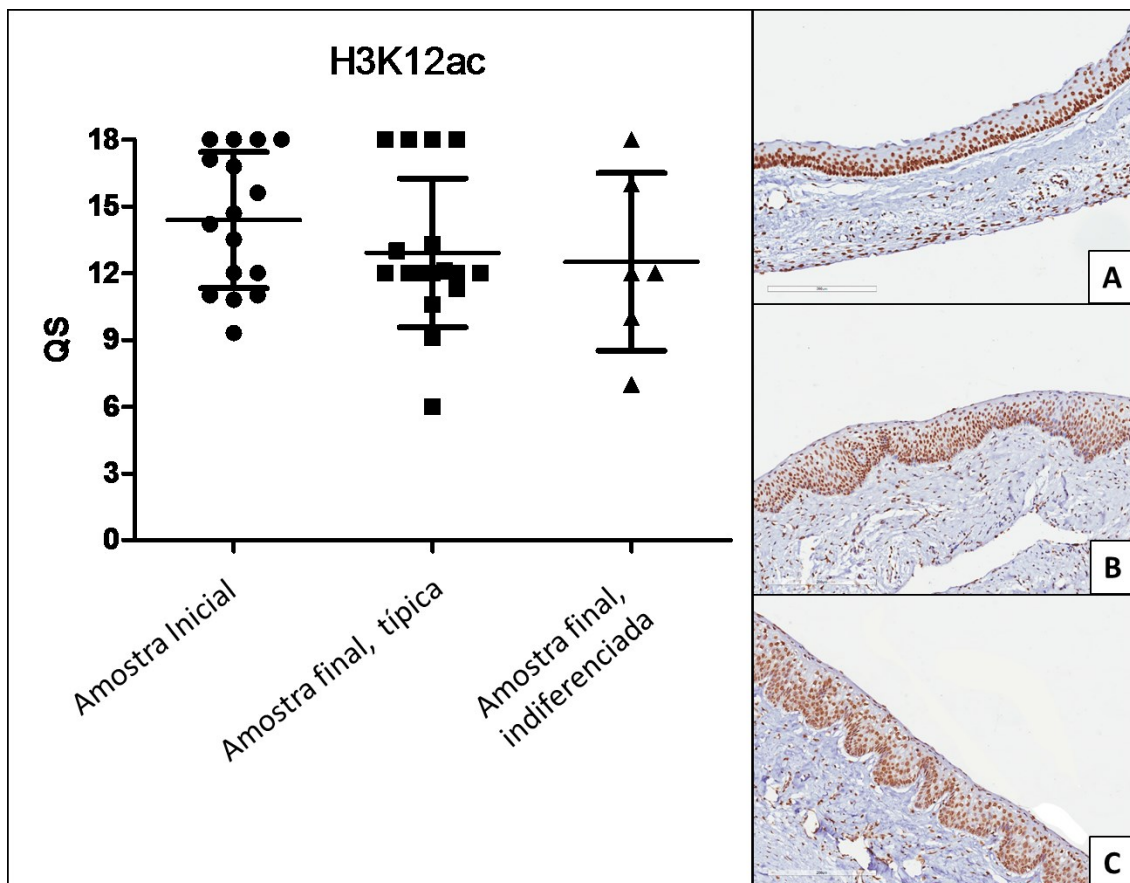


Figura 6 - Gráfico da expressão de H3K9ac nos grupos estudados e suas imagens representativas. Ao lado, imagens representativas da reatividade imunohistoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase) ($p=0,4785$): A) Amostra inicial (n=17); B) Amostra final, com epitélio típico de QO (n=18); C) Amostra final com epitélio não típico (n=7).

Por fim, para o antígeno de proliferação celular Ki-67, a marcação foi homogeneamente moderada com baixa proporção de células marcadas (5 - 19%), confinada as camadas mais profundas do epitélio (basal e parabasal) em todas as amostras iniciais e finais. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos estudados ($p=0,6159$). As imagens representativas dos grupos estudados assim como o gráfico da reação estão na Figura 7.

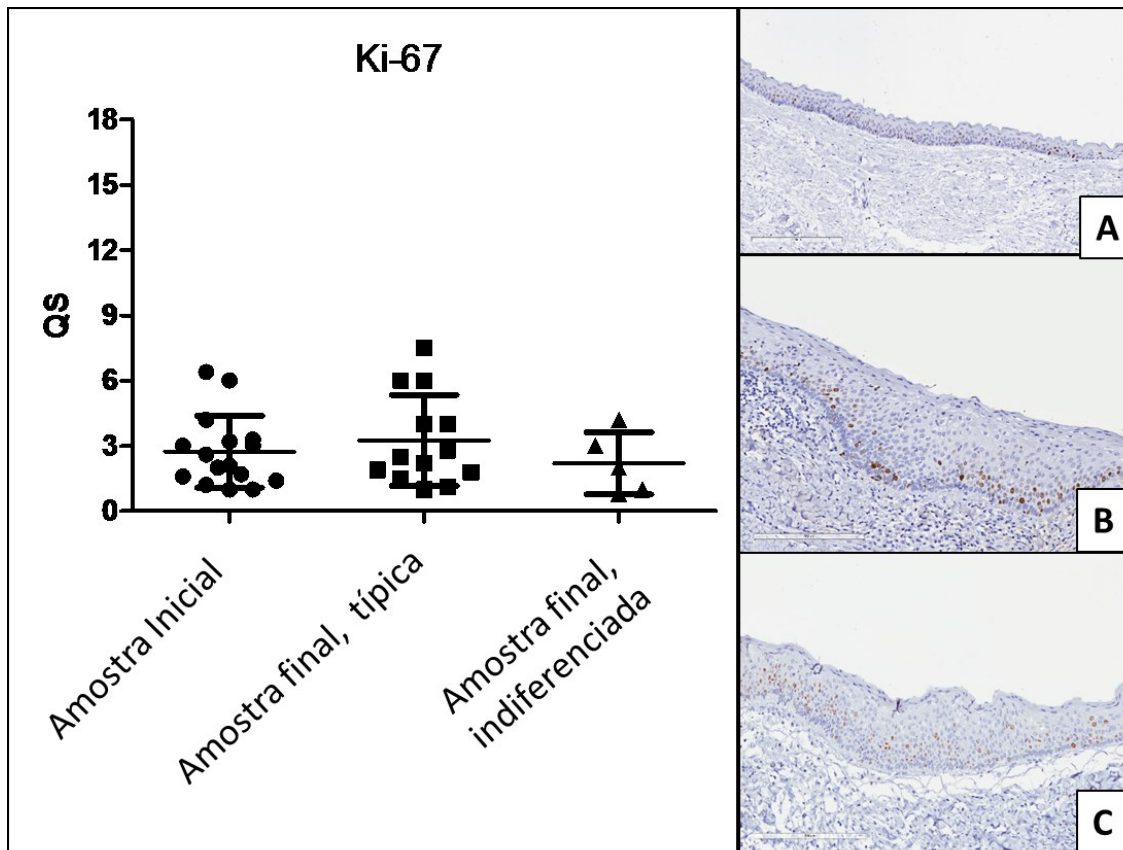


Figura 7 - Gráfico da expressão de Ki-67 nos grupos estudados e suas imagens representativas. Ao lado, imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica (técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase) ($p=0,6159$): A) Amostra inicial ($n=16$); B) Amostra final, com epitélio típico de QO ($n=13$); C) Amostra final com epitélio não típico ($n=5$).

Verificou-se correlação direta e estatisticamente significativa entre o QS para o marcador de proliferação celular Ki-67 e para H3K9ac ($p=0,0182$; $r=0,5646$), H4K12ac ($p=0,0080$; $r=0,6365$), H3K36me3 ($p=0,0001$; $r=0,7771$) nas amostras finais típicas, e para H3K36me3 nas amostras finais indiferenciadas ($p=0,0206$; $r=0,5264$), conforme ilustrado nos Gráficos 2 a 4. Para as demais modificações de histonas e tipos de amostras, não houve correlação significativa.

Gráfico 2 – Correlação entre o índice de Quickscore para Ki-67 e H3K9ac nas amostras finais diferenciadas de queratocistos odontogênicos previamente marsupializados e posteriormente enucleados ($p=0,0182$; $r=0,5646$; teste de Spearman).

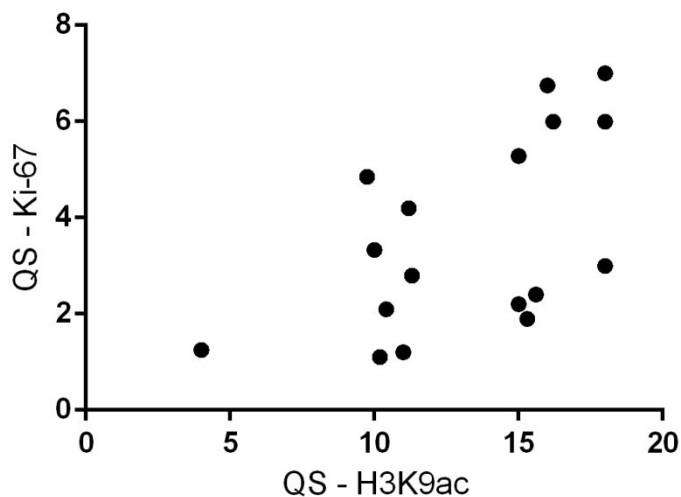


Gráfico 3 – Correlação entre o índice de Quickscore para Ki-67 e H4K12ac nas amostras finais diferenciadas de queratocistos odontogênicos previamente marsupializados e posteriormente enucleados ($p=0,0080$; $r=0,6365$; teste de Spearman).

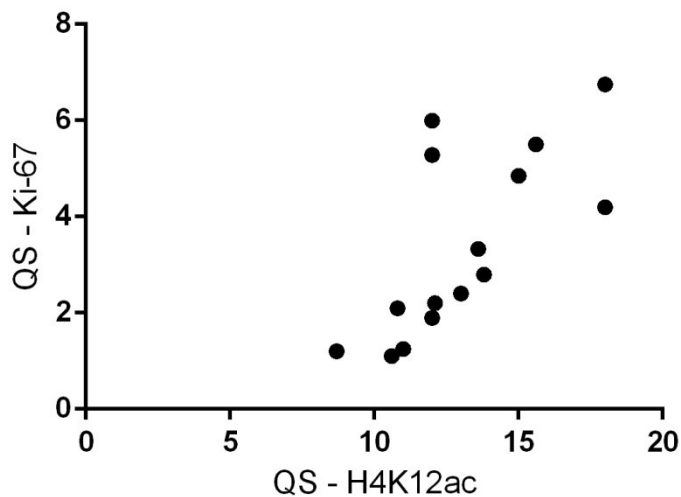


Gráfico 4 – Correlação entre o índice de Quickscore para Ki-67 e H3K36me3 nas amostras finais diferenciadas de queratocistos odontogênicos previamente marsupializados e posteriormente enucleados ($p=0,0001$; $r=0,7771$; teste de Spearman).

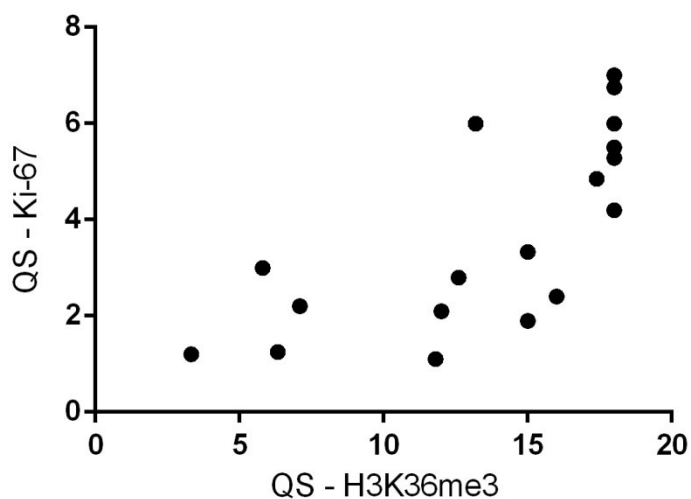
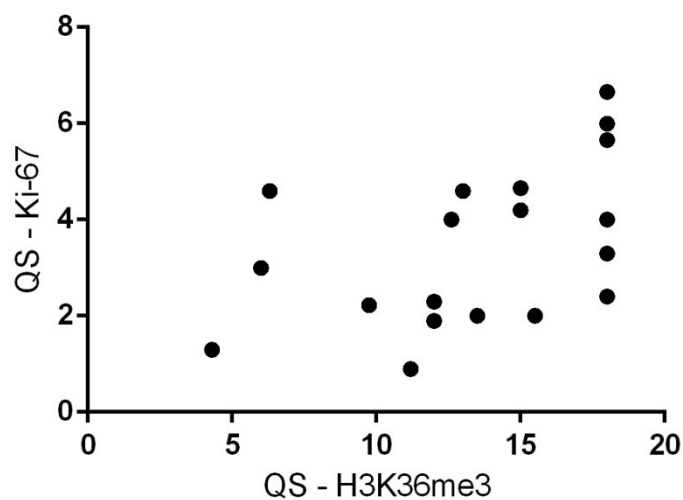


Gráfico 5 – Correlação entre o índice de Quickscore para Ki-67 e H3K36me3 nas amostras finais indiferenciadas de queratocistos odontogênicos previamente marsupializados e posteriormente enucleados ($p=0,0206$; $r=0,5264$; teste de Spearman).



6 – DISCUSSÃO

As variadas modalidades terapêuticas empregadas para o tratamento do QO podem ser classificadas como radicais ou conservadoras. O principal exemplo do primeiro grupo é a ressecção, já o segundo grupo é composto pela curetagem, enucleação (associada ou não por tratamentos coadjuvantes), a marsupialização ou descompressão, seguidas ou não de tratamento cirúrgico posterior (Anavi *et al.*, 2011; Pogrel, 2005; Blanas *et al.*, 2000). Diversos estudos mostraram a eficácia do tratamento conservador na terapia dos QO, empregando a enucleação associada com outras terapias, mas principalmente pela técnica da marsupialização e descompressão (Maurette *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2002). O tratamento radical pode ser considerado muito invasivo para grandes QO, devendo assim ser evitados em um primeiro momento. Vários autores reportaram êxito no tratamento de grandes QO utilizando a marsupialização seguida da enucleação. (Blanas *et al.*, 2000; Mendes *et al.*, 2010; Pogrel, 2013; Nakamura *et al.*, 2002).

Este tratamento possui a desvantagem de depender do comprometimento do paciente por um longo período de tempo, mediante retornos regulares ao dentista e irrigações diárias na lesão até ocorrer a involução da lesão, o que pode levar à perda de interesse ao tratamento pelo paciente e conseqüentemente ao abandono do mesmo. Porém, esta abordagem terapêutica resulta na redução do defeito ósseo gerado pela lesão tanto quanto a outras estruturas que podem estar próximas à lesão, tais como dentes e o nervo alveolar inferior, reduzindo as sequelas do tratamento. Ainda, não gera maiores gastos com medicamentos e hospitalização (August *et al.*, 2003; Pogrel and Jordan, 2004; Pogrel, 2005; Maurette *et al.*, 2006). Nos casos acompanhados por este estudo, verificou-se a cooperação e aceite por parte de todos pacientes, pois as recomendações de higiene e retornos periódicos foram realizadas sem intercorrências, mesmo ficando com a lesão marsupializada por um período prolongado (média 11 meses).

Em relação aos dados clinicopatológicos, a casuística avaliada no presente estudo é similar ao perfil anteriormente descrito na literatura para o QO (Shear & Speight, 2007, Jafaripozve *et al.*, 2013; Berge *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2017; Speight *et al.*, 2017). Houve ligeiro predomínio do sexo masculino (1,75:1), com maior frequência dos casos diagnosticados na segunda e terceira décadas de vida (média de 29,7 anos), e maior incidência na região posterior de mandíbula (Berge *et al.*, 2016). Quanto ao aspecto radiográfico, o predomínio de lesões uniloculares também é apontado na literatura (Zhao *et al.*, 2002; MacDonald-Jankowski, 2011). A grande frequência de associação com dentes inclusos também já é reconhecida (MacDonald-Jankowski, 2011).

Quanto ao tratamento, o emprego do tratamento bifásico por marsupialização e posterior enucleação foi reservado para lesões grandes, de forma semelhante a outros trabalhos previamente descritos na literatura (Anavi *et al.*, 2011; Berge *et al.*, 2016). A redução proporcional das lesões provocada pela marsupialização é variável na literatura. Marker *et al.* (1996) e Zhao *et al.* (2002) encontraram valores de 50 a 60%, no primeiro caso após média de 9,5 meses de marsupialização e no segundo de 3 a 7 meses de marsupialização. Já Nakamura *et al.* (2002), encontrou valores de 81,4% com média de 23,5 meses de marsupialização. Há ainda descrito, a completa resolução da lesão utilizando a marsupialização como tratamento único (Pogrel, 2004). Essa variação de valores pode ser explicada pelas diferentes metodologias empregadas para mensuração da lesão e sua redução, o tipo de exame de imagem utilizado (radiografia panorâmica ou tomografia computadorizada) com suas respectivas distorções, assim como pelo tempo de marsupialização ativa.

As recidivas são um tópico que gera intensa discussão sobre o QO. Elas tendem a ocorrer dentro de cinco anos após o tratamento, mas já foram identificadas após mais de dez anos da primeira intervenção (Maurette *et al.*, 2006; KOLOKYTHAS *et al.*, 2007; de Castro *et al.*, 2017). Na casuística estudada, não foi encontrada nenhuma recorrência. Estes dados divergem da média encontrada para a marsupialização em estudos recentes, que aponta 18% de casos recidivantes (Berge *et al.*, 2016), 17,7% (de Castro *et al.*, 2017).

O curto período de acompanhamento (53 meses em média) pode ter sido insuficiente para o aparecimento dessas recorrências, gerando assim uma estimativa abaixo do real para este tratamento. Por certo, os pacientes deste estudo seguem em acompanhamento semestral para esclarecer este cenário.

A marsupialização gerou mudanças morfológicas em todos os casos analisados, fato reconhecido na literatura, onde se informa que após a marsupialização o epitélio característico do QO mantém-se presente em algumas áreas minoritárias enquanto outras apresentavam um epitélio com mais camadas celulares, eventualmente com a formação de cones epiteliais ficando mais parecido com a mucosa oral (Marker *et al.*, 1996; Ninomiya *et al.*, 2002; Nakamura *et al.*, 2002; Telles *et al.*, 2013). Tais mudanças parecem ter sido provocadas pela inflamação. Em um trabalho conduzido por Rodu *et al.*, (1987), ao analisar a relação entre a inflamação e o revestimento epitelial do QO, apenas 8,9% dos casos apresentavam inflamação sem mudanças epiteliais; por outro lado, nenhum caso apresentou mudanças epiteliais sem inflamação. De fato, a presença de inflamação no QO gera um aumento significativo na expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em relação aquelas não inflamadas. Quando comparado com cistos radiculares e dentígeros, o QO também apresenta níveis mais elevados de PCNA, sendo este antígeno utilizado como marcador de proliferação celular (Sudiono and Zain., 2003; Singh *et al.*, 2014). Na casuística apresentada, inflamação estava presente em 56% das amostras iniciais, valor dentro do esperado para amostras iniciais, de até 75% dos casos em trabalhos previamente descritos na literatura (Kaplan and Hirshberg, 2004). Foi observado que após a marsupialização, nas áreas típicas de QO (aquelas que se assemelham as amostras iniciais) a inflamação estava presente em 91% dos casos. Nas áreas com epitélio modificado, o valor era de 100%, semelhante com os resultados em amostras iniciais com presença de alterações epiteliais apresentados por Rodu *et al.*, (1987). A inflamação nas amostras iniciais pode ser causada por perfurações na cortical óssea, permitindo uma comunicação entre a lesão e a mucosa oral. Outro ponto de introdução desta inflamação seria o ligamento periodontal, em casos próximos a dentes (Kaplan and Hirshberg, 2004; Singh

et al., 2014). Apesar dos resultados acima citados, os efeitos da inflamação no QO ainda não estão totalmente elucidados, com resultados controversos sendo descritos (Mendes *et al.*, 2010; Singh *et al.*, 2014)

Ao conhecimento do autor, este é o primeiro trabalho que relaciona as mudanças globais de histonas com as mudanças morfológicas do QO após a marsupialização. A epigenética tem ganhado cada vez mais destaque no estudo da carcinogênese assim como diversas outras lesões, mas na área bucomaxilofacial ainda há uma escassez de estudos. As modificações das histonas têm a capacidade de facilitar ou dificultar o processo de tradução do DNA, estando relacionadas com a inativação/silenciamento de genes supressores de tumor. (Fullgrabe *et al.*, 2011; Feng *et al.*, 2012; Elsheikh *et al.*, 2009; Morgan & Shilatifard, 2015).

Nos casos analisados, houve uma redução estatisticamente significativa nos níveis de H3K9me3 nas áreas indiferenciadas das amostras finais em relação as amostras iniciais. Esta redução sugere redução da capacidade de reparo no DNA e instabilidade da heterocromatina neste epitélio, assim como perda da identidade celular. Esta hipótese é suportada pelo fato da instabilidade da heterocromatina ser causada pela ação da enzima SET7/9 que metila a H3K9, impedindo a ação da atividade enzimática da SUV39H1 metiltransferase, necessária para a estabilidade da heterocromatina, resultando em queda dos níveis de H3K9me3. Além disso, quando um dano ao DNA é detectado, há aumento de um complexo de proteínas, contendo KAP-1, HP1, SUV39H1, que gera um aumento nos níveis de H3K9me3. Esse aumento cria domínio repressivo na heterocromatina próximo ao dano, iniciando o processo de reparo (Cao *et al.*, 2016). Outra função importante desta modificação de histona é a manutenção da identidade celular. A presença de heterocromatina impede a reprogramação celular (Becker *et al.*, 2016) Assim, a redução dos níveis encontrada após a marsupialização pode estar relacionada a uma reprogramação deste epitélio, que regressaria a um estado menos diferenciado, mudando assim as características clássicas de QO.

Para as demais modificações de histonas estudadas, vimos que houve uma tendência de queda dos valores de QS similar a encontrada em H3K9me3, porém, sem diferenças significativas. Este fato pode estar relacionado a alguns fatores limitantes do estudo, tal como a casuística pequena (n=23 lesões), ainda que justificável pela relativa raridade da lesão e pelo número ainda limitado de casos tratados bifásicamente.

Outro fator que chama a atenção é a especificidade dos anticorpos usados na imuno-histoquímica. Egelhofer e colaboradores, (2011), identificou através de diversos testes biomoleculares como western blot, dot blot, Chip-chip ou Chip-seq que pelo menos 25% dos anticorpos disponíveis para modificações de histonas tinham algum problema de especificidade ou utilidade. Além disso, variações de lote também mostraram resultados variantes quanto a especificidade. Para solucionar este problema, eles propuseram um banco de dados (<http://compbio.med.harvard.edu/antibodies/>) para validação destes anticorpos, onde diferentes pesquisadores pudessem inserir os resultados encontrados para diferentes anticorpos e lotes. Dos anticorpos utilizados neste trabalho, dois não continham entradas na *database* acima citada, H3k12ac e H3K9ac. Para os demais (H3K9me3, H3K18ac e H3K36me3), não encontramos referência para o lote específico utilizado neste trabalho. Para H3K9me3 houve aprovação em 71% dos testes aplicados utilizando diferentes lotes do anticorpo (ab10812). Para H3K18ac, a taxa de aprovação foi de 91% (ab1191), e para H3K36me3 a taxa de aprovação foi de 82% (ab9050). No entendimento do autor do presente estudo, todos os anticorpos utilizados apresentaram bons níveis especificidade trazendo assim um resultado confiável a sua utilização.

O Ki-67 é um marcador expresso em células com processo de proliferação ativo, sendo amplamente utilizado (Shear & Speight., 2007). Ele é expresso durante a fase tardia de G1, S, M, e G2 do ciclo celular, e é degradado rapidamente após o término da mitose (Shear & Speight., 2007; Chang *et al.*, 2010). Há trabalhos que mostram que a proliferação das células epiteliais do QO é maior que outras lesões císticas como o cisto dentífero e o

cisto radicular (Shear & Speight., 2007; Mendes *et al.*, 2010; Manor *et al.*, 2012). A marcação para Ki-67 nos casos estudado foi positiva para células nas camadas profundas do epitélio (basal e parabasal), e não houve diferenças estatísticas na sua expressão entre as amostras estudadas. Este resultado é similar ao encontrado por Clark *et al.*, (2006). Há ainda outro trabalho, que mostra queda nos níveis de Ki-67 proporcionalmente com os níveis de expressão IL-1 α mRNA após a marsupialização, sugerindo que a redução de tamanho observada no QO está relacionada a queda na expressão de IL-1 α e a proliferação celular (Ninomiya *et al.*, 2002). Neste sentido buscamos correlações de Ki-67 com as proteínas relacionadas a modificações de histonas estudadas. As histonas H3K9ac, H4K12ac, H3K36me3 em amostras finais típicas e a última também nas amostras indiferenciadas apresentaram diferenças estatisticamente significante para esta análise. Todas as modificações de histonas acima citadas estão relacionadas com a abertura do DNA, sugerindo que o processo de proliferação celular pode estar relacionado a ação de tais proteínas. Como visto anteriormente, a acetilação de histonas está relacionada com o afrouxamento das ligações entre as histonas e o DNA, tornando assim possível a transcrição gênica (Kouzarides, 2007; Taby & Issa, 2010). A trimetilação da histona H3 na lisina 36 também está relacionada a genes ativos (Yen *et al.*, 2016). Assim, a correlação destas proteínas com o Ki-67 mostra que o potencial de proliferação do QO pode estar relacionado as modificações de histonas presentes no epitélio da lesão.

7 – CONCLUSÃO

1 – Vinte e um casos foram selecionados a partir dos critérios estabelecidos para a participação no estudo. Destes, um apresentou duas lesões que foram trabalhadas de forma individual, somando vinte e duas amostras para as análises histológicas previstas no estudo.

2 – Para todas amostras selecionadas para o estudo, foram detectadas positividade nos testes imuno-histoquímicos, tanto para as modificações de histonas estudadas (H3K9me3, H3K18ac, H3K9ac, H3K36me3, H4K12ac) assim como para o Ki-67. Quanto a morfologia do epitélio, a marsupialização provocou mudanças no padrão histológico em todos os casos, com pequenas áreas permanecendo semelhantes as amostras iniciais.

3 – Ao avaliar comparativamente os padrões de reatividade imuno-histoquímica da lesão, apenas H3K9me3 apresentou uma redução estatisticamente significativa nas amostras finais indiferenciadas em relação as amostras iniciais. A queda dos níveis de H3K9me3 sugerem que neste epitélio alterado há uma perda da capacidade de manutenção da heterocromatina com perda da identidade celular e uma redução na capacidade de resposta a danos no DNA. Essas hipóteses corroboram com o comportamento da lesão após a marsupialização que perde a sua força de crescimento, regride de tamanho e passa a se comportar de forma mais semelhante a mucosa normal. Os resultados obtidos a partir da correlação entre Ki-67 e as modificações de histonas estudadas mostrou que a proliferação observada no QO pode estar relacionada a ação destas proteínas.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

2 - Anavi Y, Gal G, Miron H, Calderon S, Allon DM. Decompression of odontogenic cystic lesions: clinical long-term study of 73 cases, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2011 Aug;112(2):164-169. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2010.09.069>

3 - August M, Faquin WC, Troulis MJ, Kaban IB. Dedifferentiation of odontogenic keratocyst epithelium after cyst decompression, **J Oral Maxillofac Surg**. 2003 Jun;61(6):678-83; discussion 683-684. <https://doi.org/10.1053/joms.2003.50137>

4 - Bannister AJ, Kouzarides T. Regulation of chromatin by histone modifications, **Cell Res**. 2011 Mar;21(3):381-95. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>

5 - Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocyst, **J Dental Res**. v. 79, p. 1418-1422, 2000. <https://doi.org/10.1177/00220345000790061101>

6 - Becker JS, Nicetto D, Zaret KS. H3K9me3-Dependent Heterochromatin: Barrier to Cell Fate Changes, **Trends Genet**. 2016 Jan;32(1):29-41. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.11.001>

7 - Berge TI, Helland SB, Sælen A, Øren M, Johannessen AC, Skartveit L, Grung B. Pattern of recurrence of nonsyndromic keratocystic odontogenic tumors, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2016 Jul;122(1):10-16. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.01.004>

8 - Berger SL, Kouzarides T, Shiekhata R, Shilatifard A. An operational definition of epigenetics, **Genes Dev**. 2009 Apr 1;23(7):781-3. <https://doi.org/10.1101/gad.1787609>

- 9 - Biterge B, Schneider R. Histone variants: key players of chromatin, **Cell Tissue Res**. 2014 Jun;356(3):457-66. <https://doi.org/10.1007/s00441-014-1862-4>
- 10 - Blanas N, Freund B, Schwartz M, Furst IM. Systematic review of the treatment and prognosis of the odontogenic keratocyst, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2000 Nov;90(5):553-558. <https://doi.org/10.1067/moe.2000.110814>
- 11 - Brøndum N, Jensen VJ. Recurrence of keratocysts and decompression treatment. A long-term follow-up of forty-four cases, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 1991 Sep;72(3):265-9. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(91\)90211-T](https://doi.org/10.1016/0030-4220(91)90211-T)
- 12 - Cao LL, Shen C, Zhu WG. Histone modifications in DNA damage response, **Sci China Life Sci**. 2016 Mar;59(3):257-270. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-5011-z>
- 13 - Chakravarthi BV, Nepal S, Varambally S. Genomic and Epigenomic Alterations in Cancer, **Am J Pathol**. 2016 Jul;186(7):1724-35. <https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2016.02.023>
- 14 - Chang SL, Hu S, Hung SI, Huang YL, Hsiao WC, Chung WH. A comparison of Ki-67 antigen presentation in acute generalized exanthematous pustulosis and pustular psoriasis, **Arch Dermatol Res**. 2010 Sep;302(7):525-529. <https://doi.org/10.1007/s00403-010-1046-3>
- 15 - Clark P, Marker P, Bastian HL, Kroghdahl A. Expression of p53, Ki-67, and EGFR in odontogenic keratocysts before and after decompression, **J Oral Pathol Med**. 2006 Oct;35(9):568-572. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2006.00468.x>
- 16 - Cortopassi WA, Kumar K, Duarte F, Pimentel AS, Paton RS. Mechanisms of histone lysine-modifying enzymes: A computational perspective on the role of the protein environment, **J Mol Graph Model**. 2016 Jun;67:69-84. <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2016.04.011>

- 17 - de Castro MS, Caixeta CA, de Carli ML, Ribeiro Júnior NV, Miyazawa M, Pereira AAC, Sperandio FF, Hanemann JAC. Conservative surgical treatments for nonsyndromic odontogenic keratocysts: a systematic review and meta-analysis, **Clin Oral Investig**. 2017 Dec. [Epub ahead of print]. <https://doi.org/10.1007/s00784-017-2315-8>
- 18 - Deckert J, Struhl K. Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors, **Mol Cell Biol**. 2001 Apr;21(8):2726-2735. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.8.2726-2735.2001>
- 19 - Detre S, Jotti GS, Dowsett M. A "Quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas, **J Clin Pathol**. 1995 Sep;48(9):876-878. <https://doi.org/10.1136/jcp.48.9.876>
- 20 - Diniz MG, Gomes CC, de Castro WH, Guimarães AL, De Paula AM, Amm H, Ren C, MacDougall M, Gomez RS. miR-15a/16-1 influences BCL2 expression in keratocystic odontogenic tumors, **Cell Oncol (Dordr)**. 2012 Aug;35(4):285-91. <https://doi.org/10.1007/s13402-012-0087-3>
- 21 - Diniz MG, Gomes CC, de Sousa SF, Xavier GM, Gomez RS. Oncogenic signaling pathways in benign odontogenic cysts and tumours, **Oral Oncol**. 2017 Sep;72:165-173. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.021>
- 22 - Egelhofer TA, Minoda A, Klugman S, Lee K, Kolasinska-Zwierz P, Alekseyenko AA, *et al*. An assessment of histone-modification antibody quality, **Nat Struct Mol Biol**. 2011 Jan;18(1):91-3. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1972>
- 23 - Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA, Powe DG, Ahmed RA, *et al.*, Global histone modifications in breast cancer correlate with tumor phenotypes, prognostic factors, and patient outcome, **Cancer Res**. 2009 May 1;69(9):3802-3809. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-3907>
- 24 - Esteller M, Fraga MF, Guo M, Garcia-Foncillas J, Hedenfalk I, Godwin AK, *et al*. DNA methylation patterns in hereditary human cancers mimic sporadic

- tumorigenesis, *Hum Mol Genet.* 2001 Dec 15;10(26):3001-7.
<https://doi.org/10.1093/hmg/10.26.3001>
- 25 - Feng Z, Xu Q, Chen W. Epigenetic and genetic alterations-based molecular classification of head and neck cancer, *Expert Rev Mol Diagn.* 2012 Apr;12(3):279-290. <https://doi.org/10.1586/erm.12.19>
- 26 - Füllgrabe J, Kavanagh E, Joseph B. Histone onco-modifications, *Oncogene.* 2011 Aug 4;30(31):3391-3403.
<https://doi.org/10.1038/onc.2011.121>
- 27 - Gates LA, Foulds CE, O'Malley BW. Histone Marks in the 'Driver's Seat': Functional Roles in Steering the Transcription Cycle, *Trends Biochem Sci.* 2017 Dec;42(12):977-989. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2017.10.004>
- 28 - Gates LA, Shi J, Rohira AD, Feng Q, Zhu B, Bedford MT, *et al.* Acetylation on histone H3 lysine 9 mediates a switch from transcription initiation to elongation, *J Biol Chem.* 2017 Sep 1;292(35):14456-14472.
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.802074>
- 29 - Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst, *Oral Oncology.* v. 45, p. 1011–1014, 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2009.08.003>
- 30 - Gomes CC, Guimarães LM, Diniz MG, Gomez RS. Molecular alterations in odontogenic keratocysts as potential therapeutic targets, *J Oral Pathol Med.* 2017 Nov;46(10):877-882. <https://doi.org/10.1111/jop.12591>
- 31 - Gregory PD, Wagner K, Hörz W. Histone acetylation and chromatin remodeling, *Exp Cell Res.* 2001 May 1;265(2):195-202.
<https://doi.org/10.1006/excr.2001.5187>
- 32 - Herceg Z. Epigenetic Mechanisms as an Interface Between the Environment and Genome, *Adv Exp Med Biol.* 2016;903:03-15.
- 33 - Jafaripozve N, Jafaripozve S, Khorasgani MA. Kerathocyst Odontogenic Tumor: Importance of Selection the Best Treatment Modality and A Periodical

Follow-up to Prevent from Recurrence: A Case Report and Literature Review, *Int J Prev Med*. 2013 Aug;4(8):967-70.

34 - Juliano CN, Izetti P, Pereira MP, Dos Santos AP, Bravosi CP, Abujamra AL, Prolla PA, Osvaldt AB, Edelweiss MI. H4K12 and H3K18 Acetylation Associates With Poor Prognosis in Pancreatic Cancer, *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2016 May-Jun;24(5):337-44. <https://doi.org/10.1097/PAI.000000000000194>

35 - Kaplan I, Hirshberg A. The correlation between epithelial cell proliferation and inflammation in odontogenic keratocyst, *Oral Oncol*. 2004 Nov;40(10):985-991. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2004.04.017>

36 - Karsli-Ceppioglu S, Dagdemir A, Judes G, Lebert A, Penault-Llorca F, Bignon YJ, Bernard-Gallon D. The Epigenetic Landscape of Promoter Genome-wide Analysis in Breast Cancer, *Sci Rep*. 2017 Jul 26;7(1):6597. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06790-z>

37 - Klopfleisch R. Multiparametric and semiquantitative scoring systems for the evaluation of mouse model histopathology--a systematic review, *BMC Vet Res*. 2013 Jun 21;9:123. <https://doi.org/10.1186/1746-6148-9-123>

38 - Kolokythas A, Fernandes RP, Pazoki A, Ord RA. Odontogenic keratocyst: to decompress or not to decompress? A comparative study of decompression and enucleation versus resection/peripheral ostectomy, *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Apr;65(4):640-644. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2006.06.284>

39 - Kouzarides T. Chromatin modifications and their function, *Cell*. 2007 Feb 23;128(4):693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>

40 - Li F, Mao G, Tong D, Huang J, Gu L, Yang W, *et al*. The histone mark H3K36me3 regulates human DNA mismatch repair through its interaction with MutS α , *Cell*. 2013 Apr 25;153(3):590-600. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.03.025>

- 41 - Lo Muzio L. Nevroid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome), **Orphanet J Rare Dis**. 2008 Nov 25;(3):32. <https://doi.org/10.1186/1750-1172-3-32>
- 42 - MacDonald-Jankowski DS. Keratocystic odontogenic tumour: systematic review, **Dentomaxillofac Radiol**. 2011 Jan;40(1):1-23. <https://doi.org/10.1259/dmfr/29949053>
- 43 - Manor E, Kachko L, Puterman MB, Szabo G, Bodner L. Cystic lesions of the jaws - a clinicopathological study of 322 cases and review of the literature, **Int J Med Sci**. 2012;9(1):20-26. <https://doi.org/10.7150/ijms.9.20>
- 44 - Marker P, Brøndum N, Clausen PP, Bastian HL. Treatment of large odontogenic keratocysts by decompression and later cystectomy: a long-term follow-up and a histologic study of 23 cases, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 1996 Aug;82(2):122-131. [https://doi.org/10.1016/S1079-2104\(96\)80214-9](https://doi.org/10.1016/S1079-2104(96)80214-9)
- 45 - Maurette PE, Jorge J, De Moraes M. Conservative treatment protocol of odontogenic keratocyst: a preliminary study, **J Oral Maxillofac Surg**. 2006 Mar;64(3):379-383. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2005.11.007>
- 46 - Mendes RA, Carvalho JF, van der Waal I. Characterization and management of the keratocystic odontogenic tumor in relation to its histopathological and biological features, **Oral Oncol**. 2010;46:219-225. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.01.012>
- 47 - Morgan MA, Shilatifard A. Chromatin signatures of cancer, **Genes Dev**. 2015 Feb 1;29(3):238-249. <https://doi.org/10.1101/gad.255182.114>
- 48 - Nakamura N, Mitsuyasu T, Mitsuyasu Y, Taketomi T, Higuchi Y, Ohishi M. Marsupialization for odontogenic keratocysts: Long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2002 Nov;94(5):543-553. <https://doi.org/10.1067/moe.2002.128022>

49 - Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. **Oral and maxillofacial pathology** – 3rd ed.: Elsevier. Capitulo 15, pag. 683-687, 2009.

50 - Ninomiya T, Kubota Y, Koji T, Shirasuna K. Marsupialization inhibits interleukin-1a expression and epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts, **J Oral Pathol Med**. 2002 Oct;31(9):526-533. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0714.2002.00029.x>

51 - Oliveros-Lopez L, Fernandez-Olavarria A, Torres-Lagares D, Serrera-Figallo MA, Castillo-Oyagüe R, Segura-Egea JJ, *et al*. Reduction rate by decompression as a treatment of odontogenic cysts, **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2017 Sep 1;22(5):e643-e650. <https://doi.org/10.4317/medoral.21916>

52 - Pereira KMA, Costa SFDS, Pereira NB, Diniz MG, Castro WH, Gomes CC, *et al*. DNA methylation profiles of 22 apoptosis-related genes in odontogenic keratocysts before and after marsupialization, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. 2017 Nov;124(5):483-489. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.07.010>

53 - Peacock ZS. Controversies in Oral and Maxillofacial Pathology, **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. 2017 Nov;29(4):475-486. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2017.06.005>

54 - Pogrel MA, Jordan RC. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst, **J Oral Maxillofac Surg**. 2004 Jun;62(6):651-656. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2003.08.029>

55 - Pogrel MA. Treatment of Keratocysts: The Case for Decompression and Marsupialization, **J Oral Maxillofac Surg**. 2005 Nov;63(11):1667-1673. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2005.08.008>

56 - Pogrel MA. The keratocystic odontogenic tumor, **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**. 2013 Feb;25(1):21-30. <https://doi.org/10.1016/j.coms.2012.11.003>

- 57 - Regezi JÁ, Sciubba J, Richard C, Jordan K. **Patologia oral: correlações clínicopatológicas**. [tradução Alexandre de Almeida Ribeiro], Rio de Janeiro, Elsevier. Capítulo 10, p. 245-249, 2008.
- 58 - Rodu B, Tate AL, Martinez MG. The implications of inflammation in odontogenic keratocysts, *J Oral Pathol*. 1987 Nov;16(10):518-521. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.1987.tb00684.x>
- 59 - Schlieve T, Miloro M, Kolokythas A. Does decompression of odontogenic cysts and cystlike lesions change the histologic diagnosis?, *J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jun;72(6):1094-105. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2013.12.028>
- 60 - Scully C, Langdon J, Evans J. Marathon of eponyms: 7 Gorlin-Goltz syndrome (Naevoid basal-cell carcinoma syndrome), *Oral Dis*. 2010 Jan;16(1):117-8. <https://doi.org/10.1111/j.1601-0825.2009.01539.x>
- 61 - Shear M, Speight P. Odontogenic keratocyst, In **Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions**. Fourth Edition, Oxford, UK: Blackwell Munksgaard; 2008. p.06-12.
- 62 - Singh HP, Shetty DC, Kumar A, Chavan R, Shori DD, Mali J. A molecular insight into the role of inflammation in the behavior and pathogenesis of odontogenic cysts, *Ann Med Health Sci Res*. 2013;3:523-528. <https://doi.org/10.4103/2141-9248.122072>
- 63 - Smith MM. Histone structure and function, *Curr Opin Cell Biol*. 1991 Jun;3(3):429-437. [https://doi.org/10.1016/0955-0674\(91\)90070-F](https://doi.org/10.1016/0955-0674(91)90070-F)
- 64 - Speight P, Devilliers P, Li T.-J, Odell E.W, Wright J.M. Odontogenic keratocyst, In **WHO Classification of Head and Neck Tumours**, Fourth edition, Lyon, France: IARC; 2017. p.235-236.
- 65 - Sudiono J, Zain RB. PCNA expression in epithelial linings of odontogenic cysts, *Ann Dent Univ Malaya*. 2003;10:1-5.
- 66 - Taby R, Issa JP. Cancer epigenetics, *CA Cancer J Clin*. 2010 Nov-Dec;60(6):376-92. <https://doi.org/10.3322/caac.20085>

- 67 - Telles DC, Castro WH, Gomez RS, Souto GR, Mesquita RA. Morphometric evaluation of keratocystic odontogenic tumor before and after marsupialization, **Braz Oral Res.** 2013 Nov-Dec;27(6):496-502. <https://doi.org/10.1590/S1806-83242013000600009>
- 68 - Todd R, August M. Molecular approaches to the diagnosis of sporadic and nevoid basal cell carcinoma syndrome-associated odontogenic keratocysts, **Oral Maxillofac Surg Clin North Am.** 2003 Aug;15(3):447-61. [https://doi.org/10.1016/S1042-3699\(03\)00039-6](https://doi.org/10.1016/S1042-3699(03)00039-6)
- 69 - Tolstunov L, Treasure T. Surgical treatment algorithm for odontogenic keratocyst: combined treatment of odontogenic keratocyst and mandibular defect with marsupialization, enucleation, iliac crest bone graft, and dental implants, **J Oral Maxillofac Surg.** 2008 May;66(5):1025-36. <https://doi.org/10.1016/j.joms.2007.08.014>
- 70 - Triff K, McLean MW, Konganti K, Pang J, Callaway E, Zhou B *et al.* Assessment of histone tail modifications and transcriptional profiling during colon cancer progression reveals a global decrease in H3K4me3 activity, **Biochim Biophys Acta.** 2017 Jun;1863(6):1392-1402. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2017.03.009>
- 71 - Tzao C, Tung HJ, Jin JS, Sun GH, Hsu HS, Chen BH, *et al.* Prognostic significance of global histone modifications in resected squamous cell carcinoma of the esophagus, **Mod Pathol.** 2009 Feb;22(2):252-60. <https://doi.org/10.1038/modpathol.2008.172>
- 72 - Williams TP, Connor FA Jr. Surgical management of the odontogenic keratocyst: aggressive approach, **J Oral Maxillofac Surg.** 1994 Sep;52(9):964-966. [https://doi.org/10.1016/S0278-2391\(10\)80081-3](https://doi.org/10.1016/S0278-2391(10)80081-3)
- 73 - Wright JM, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors, **Head Neck Pathol.** 2017 Mar;11(1):68-77. <https://doi.org/10.1007/s12105-017-0794-1>

74 - Wolffe, A. **Cromatin**: Structure & Function. 3 ed. Bethesda: Academic Press, 1998.

75 - Yen CY, Huang HW, Shu CW, Hou MF, Yuan SS, Wang HR, *et al.* DNA methylation, histone acetylation and methylation of epigenetic modifications as a therapeutic approach for cancers, **Cancer Lett.** 2016 Apr10;373(2):185-92.
<https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.01.036>

76 - Youngson RM. Collins Dictionary of Human Biology. Glasgow: **Harper Collins**, 2006.

77 - Zhao YF, Wei JX, Wang SP. Treatment of odontogenic keratocysts: a follow-up of 255 Chinese patients, **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 2002 Aug;94(2):151-156.
<https://doi.org/10.1067/moe.2001.125694>

78 - Zhao Y, Liu B, Han QB, Wang SP, Wang YN. Changes in bone density and cyst volume after marsupialization of mandibular odontogenic keratocysts (keratocystic odontogenic tumors), **J Oral Maxillofac Surg.** 2011 May;69(5):1361-6.
<https://doi.org/10.1016/j.joms.2010.05.067>

Anexo 1



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de alterações epigenéticas em doenças da região bucomaxilofacial.

Pesquisador: ADRIANO MOTA LOYOLA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 60858016.1.0000.5152

Instituição Proponente: Universidade Federal de Uberlândia/ UFU/ MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.001.481

Apresentação do Projeto:

Conforme apresenta o protocolo: As modificações epigenéticas têm ganhado atenção no estudo da carcinogênese juntamente com as alterações genéticas. Evidências recentes sugerem a participação de componentes epigenéticos também em lesões cancerizáveis. Esse estudo foi desenvolvido para analisar as alterações epigenéticas associadas à carcinogênese humana na região bucomaxilofacial. Padrões dessas alterações têm sido observados em amostras dessas neoplasias. A identificação e caracterização desses distintos padrões se faz essencial para o desenvolvimento de terapêuticas mais eficazes e efetivas, além de proporcionar a tentativa de explicar a etiopatogenia, e detectar possíveis influências das mesmas no comportamento desses tumores. Até recentemente, o sequenciamento de DNA para identificar mutações genéticas em neoplasias era impraticável e caro. Os recentes avanços tecnológicos nesse processo, como a criação do método de sequenciamento de última geração, baseada no uso de semicondutores Ion Proton, otimizou o custo e o tempo do sequenciamento, além de oferecer resultados mais confiáveis.

Usando o Ion Proton, os pesquisadores sequenciarão genes mais comumente relacionados às alterações em histonas, buscando identificar o papel dessas alterações epigenéticas 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

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: 2.001.481

(leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica). 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 prospectivamente, a partir da aprovação do presente projeto, e 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). A coleta dos casos em ambas as situações se fará até 2021 período limite do desenvolvimento do estudo, perfazendo um número provável de 320 amostras ao final, baseado na frequência de seus diagnósticos registrados no Laboratório de Patologia do Curso de Odontologia. Todos os casos eletivos serão incluídos no estudo a partir da aceitação do paciente, mediante a assinatura de termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE).

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar e analisar alterações epigenéticas, 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 queilite actínica) e sua relação com comportamento biológico e parâmetros clinicopatológicos das lesões supracitadas.

Objetivo Secundário:

A) Descrever as características clinicopatológicas das lesões estudadas, considerando, quando pertinente, a possibilidade de estudar casos isolados ou pequenas série de casos, especialmente quando os casos trouxerem informações inusitadas em relação ao que é conhecido pela literatura;

B) Descrever e semiquantificar os padrões de reatividade imunistoquímica de vários antígenos representativos das modificações de histonas, nas lesões supracitadas;

C) Analisar os padrões de reatividade imunistoquímica com os dados clínico-patológicos nas diferentes lesões a busca de associações entre os padrões e comportamento biológico das lesões e sobrevida dos pacientes.

D) Quantificar por Western Blotting, a presença de proteínas histonas modificadas, 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 queilite actínica);

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: 2.001.481

E) Mapear as mutações gênicas de histonas 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 queilite actínica;F) Avaliar a presença de miRNA relacionados as proteínas histonas 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 queilite actínica.

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. Os mesmos serão coletados após a retirada cirúrgica, que aconteceria, 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:

O projeto de pesquisa esta descrito de maneira detalhada, permitindo adequada interpretação para a elaboração do parecer ético deste comitê.

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: 2.001.481

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As pendências apontadas no parecer consubstanciado número 1.864.897, de 05 de Dezembro de 2016, foram atendidas.

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

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: 2.001.481

486/12) 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 486/12), 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 486/12). É papel de o pesquisador assegurar medidas imediatas 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_PROJETO_804983.pdf | 14/12/2016 20:23:48 | | Aceito |
| Outros | PB_PARECER_CONSUBSTANCIADO_CEP_1864897.pdf | 14/12/2016 20:23:12 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Outros | Respostas_pendencias_CEP.pdf | 14/12/2016 20:22:32 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto.pdf | 14/12/2016 20:18:20 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.pdf | 14/12/2016 20:17:07 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folha_de_Rosto.pdf | 07/10/2016 11:31:04 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Outros | Questionario.pdf | 08/10/2016 13:03:59 | 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: 2.001.481

| | | | | |
|-----------------------------|--|------------------------|------------------------|--------|
| Outros | Declaracao_Instituicao_Co_Participante.pdf | 05/10/2016 10:03:35 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Declaração de Pesquisadores | termo_de_compromisso_da_equipe_executora.pdf | 05/10/2016 10:01:55 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Outros | Carta_de_encaminhamento_de_protocolo.pdf | 05/10/2016 10:00:30 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Outros | Diretor_HO.pdf | 05/10/2016 09:58:04 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Outros | Diretor_FOUFU.pdf | 05/10/2016 09:57:24 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |
| Outros | Lattes.pdf | 05/10/2016 09:53:57 | ADRIANO MOTA LOYOLA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

UBERLÂNDIA, 05 de Abril de 2017

Assinado por:

Sandra Terezinha de Farias Furtado
(Coordenador)

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