

VINICIUS CESAR BARBOSA DE MENEZES

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS FOLÍCULOS
DENTÁRIOS EM RELAÇÃO À IDADE CRONOLÓGICA**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2020**

Vinícius César Barbosa de Menezes

AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS FOLÍCULOS DENTÁRIOS EM RELAÇÃO À IDADE CRONOLÓGICA

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de concentração em Estomatologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Cavaliéri Gomes

Belo Horizonte
2020

Ficha Catalográfica

M543a Menezes, Vinícius César Barbosa de.
2020 Avaliação das alterações moleculares dos folículos
T dentários em relação à idade cronológica / Vinícius César
Barbosa de Menezes. -- 2020.

102 f. : il.

Orientadora: Carolina Cavaliéri Gomes.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Saco dentário. 2. Metilação de DNA. 3. Sistema de
sinalização das MAP quinases. I. Gomes, Carolina Cavaliéri.
II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de
Odontologia. III. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Sérgio Barbosa dos Santos - CRB: 6/3182.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES MOLECULARES DOS FOLÍCULOS DENTÁRIOS EM
RELAÇÃO À IDADE CRONOLÓGICA**

VINÍCIUS CÉSAR BARBOSA DE MENEZES

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 25 de junho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientadora
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Luciana Miguita Luiz
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz
Universidade Federal de Minas Gerais

Prof(a). Fabrício Rezende do Amaral
Newton Paiva/ Arnaldo

Prof(a). Fabrício Tinôco Alvim de Souza
Centro Universitário UNA

Belo Horizonte, 25 de junho de 2020.

Defesa Homologada pela Pós-Graduação em Odontologia em 20 / 07 /2020.

Isabela Almeida Pordeus
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais, José Luiz e Sônia.
Meus irmãos Juciana e Anderson.
Minha esposa Jane, e meus filhos Theo e Flávia.

AGRADECIMENTO

A Deus que se mostrou presente e me deu forças nos momentos difíceis, nos momentos de cansaços e de incompreensões, ajudando a superá-los com sabedoria, paciência, força e fé.

Agradecimento especialmente a duas pessoas que foram fundamentais nesse processo e que sem elas não chegaria a etapa final; à minha orientadora professora Dr^a. Carolina Cavaliéri Gomes, pela disposição, disponibilidade, oportunidade, dedicação e principalmente paciência em compreender minhas dificuldades durante esse processo, e ao professor Dr. Ricardo Santiago Gomez pela orientação, pela confiança, oportunidade, paciência, ensinamentos e generosidade em abrir as portas para que eu pudesse realizar um sonho. Agradeço muito pela oportunidade.

A minha mãe e meu pai, que mesmo na distância estavam sempre presentes nos meus pensamentos em todos momentos que precisava ter força, e que através das suas palavras e gestos foram meu porto seguro.

Ao meu filho Theo que com sua alegria, seu lindo sorriso e sua forma de ser criança divertida e alegre, soube me trazer leveza nos momentos mais difíceis e me mostrou o sentido real da vida.

A minha “pequenina” filha Flávia que me faz querer ser uma pessoa melhor e fazer tudo valer a pena.

Aos meus irmãos (Anderson e Juciana) que me ajudaram a chegar aonde estou, e sem eles essa caminhada não teria acontecido.

A minha esposa Jane que soube entender essa etapa da minha vida e pela sua compreensão, paciência e amor soube compreender minhas ausências, minhas inquietudes e meus momentos de dificuldades, me ajudando e apoiando sempre ao meu lado.

Aos meus amigos e familiares que compreenderam minha ausência, me apoiaram e estiveram ao lado e tornaram essa caminhada mais leve e fácil.

Ao professor Dr. Renan Pedra de Souza e a colega Josiane Alves França pela contribuição generosa ao trabalho nas análises estatísticas.

A todos do laboratório de Patologia Molecular pela contribuição durante o trabalho.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia Patológica da FO-UFMG, pelo apoio.

À professora Dr^a. Marina Gonçalves Diniz, Dr^a. Nubia Braga Pereira e Dr. Fabrício Tinôco Alvim, pelo apoio durante a realização dos experimentos.

Aos meus colegas de Doutorado especialmente Sara Ferreira dos Santos Costa e Elisa Carvalho de Siqueira pela generosidade e contribuição no desenvolvimento do meu trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia das áreas de Estomatologia e Patologia Bucal pelos ensinamentos em sala de aula.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular e Patologia Geral por ajudarem quando necessário.

Ao professor Dr. Luiz Cesar Fonseca Alves pelo contribuição durante a pesquisa.

Aos pacientes que gentilmente colaboraram para realização do estudo.

Ao apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

A todos, agradeço por fazerem parte dessa história.

“ É graça divina começar bem. Graça maior é persistir na caminhada. Mas graça das graças é não desistir nunca.”

Dom Hélder Câmara

RESUMO

O Folículo dental (FD) é um tecido de origem ectomesenquimal. Aproximadamente 57% dos adultos apresentam terceiro molar mandibular impactado, sendo esse elemento dentário com maior prevalência de impactação dental. Há maior incidência de alterações patológicas em indivíduos mais velhos em comparação com indivíduos mais jovens. Porém os mecanismos envolvidos na formação de cistos e tumores relacionados aos FDs não estão bem elucidados, e, por isso, alguns autores defendem a extração profilática dos terceiros molares inclusos. Durante o envelhecimento cronológico, padrões epigenéticos mudam, e um padrão de hipometilação global do DNA pode ser encontrado concomitantemente com hipermetilação de vários genes supressores tumorais. A metilação do DNA é um dos mecanismos que regula as vias de sinalização celular, como a da MAPK/ERK, que atuam no controle da proliferação e diferenciação. Alguns pesquisadores descobriram um aumento na atividade do ERK 1/2 durante o processo de envelhecimento, o que poderia contribuir para a ocorrência de doenças, e a sua desregulação está envolvida na indução e na progressão de doenças como câncer e doenças autoimunes. Portanto, o presente estudo teve por objetivo avaliar se os FDs de indivíduos jovens e indivíduos mais velhos apresentam diferença no perfil de metilação global do DNA, e avaliar o padrão de imunoexpressão da forma fosforilada ERK1/2 (pERK1/2) nos FDs. A metilação global do DNA (percentual de 5mC) e a hidroximetilação (5hmC) foram avaliadas por ELISA em 59 amostras. Testamos a correlação entre o conteúdo de 5mC e 5hmC e a correlação de cada um com a idade dos pacientes. Examinamos a imunorreatividade do pERK 1/2 para avaliar a ativação das vias MAPK/ERK em 46 amostras de FD. As amostras apresentaram variação entre 13 e 31 anos de idade. Os resultados mostraram uma relação inversamente proporcional entre o conteúdo de 5hmC e idade até os 19 anos, portanto o percentual de 5hmC nos FDs tende a diminuir linearmente com o envelhecimento. O estudo imuno-histoquímico mostrou um padrão variável de imunoexpressão de pERK1/2 com 46% (21/46) das amostras exibindo menos de 10% de células positivas, enquanto 24% (11/46) das amostras apresentaram imunopositividade entre 10 e 50% e 30% (14/46) das amostras mais de 50% das células de FD. Não foi observado diferença nas idades entre esses grupos. Em conclusão, nossos resultados sugerem que a hidroximetilação global do DNA possui alteração no seu padrão durante o envelhecimento e que a via de sinalização celular MAPK/ERK está ativa nos FDs.

Palavras-chave: Folículo dental. Metilação global do DNA. ERK1/2. Vias de sinalização MAPK.

ABSTRACT

Evaluation of molecular changes in dental follicles in relation to chronological age

The dental follicle (DF) is a tissue of ectomesenchymal origin. Approximately 57 % of young adults have impacted third molars, which is the most prevalent impacted tooth. The incidence of pathological changes is greater among older individuals than younger individuals. However, the mechanisms behind the formation of cysts and tumors related to DFs have not been fully clarified and, therefore, some researchers defend the prophylactic extraction of third molars. During chronological aging, epigenetic patterns change and a global DNA hypomethylation pattern can be found concomitantly with hypermethylation of several tumor suppressor genes. DNA methylation is one of the regulators of cell signaling pathways, such as the MAPK/ERK pathway. Some researchers have found an increase in ERK1/2 activity during the aging process, which may contribute to the occurrence of disease, and its dysregulation is involved in the induction and progression of diseases such as cancer and autoimmune diseases. Thus, the aim of the present study was to evaluate whether DFs in young and older individuals differ in terms of global methylation and hydroxymethylation and to evaluate the immunoreexpression pattern of phosphorylated ERK1/2. Global DNA methylation (5mC content) and hydroxymethylation (5hmC) were evaluated by ELISA in 59 DF samples. We tested the correlation between 5mC and 5hmC content, and the correlation of each with patients' age. We examined ERK1/2 immunoreactivity for the evaluation of the activation of the MAPK pathways in 46 DF samples. Age of patients of the 59 samples of DFs ranged from 13 to 31 years. An inversely proportional relation was found between the 5hmC content and age up to 19 years, therefore, the percentage of 5hmC in the DFs tends linearly decrease with aging. The immunohistochemical study showed a variable pattern of immunoreexpression of pERK 1/2 with 46% (21/46) of the samples showing less than 10% of positive cells, while 24% (11/46) of the samples showed immunopositivity between 10 and 50% and 30% (14/46) of the samples greater than 50% of the DF cells. There was no difference in age among these groups. In conclusion, our results suggest that the global hydroxymethylation of DNA changes in its pattern during aging and that the MAPK/ERK cell signaling pathway is active in DFs.

Keywords: Dental follicle. DNA methylation. ERK1/2. MAPK signaling pathways.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Formação da metilcitosina	23
Figura 2- Possíveis mecanismos dinâmicos do DNA	26
Figura 3- Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK1/2	30
Figura 4- Relação entre metilação global do DNA, a hidroximetilação global do DNA e a idade dos indivíduos.....	42
Figura 5- Distribuição da metilação global do DNA e hidroximetilação global do DNA entre os sexos e os lados da extração dos dentes impactados/folículos dentários...	44
Figura 6- Imagens representativas do padrão de marcação imuno-histoquímica de pERK 1/2 em folículos dentários	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Características clínicas dos indivíduos das 59 amostras de folículos dentários do estudo da metilação do DNA	40
Tabela 2- Descritivas da idade, 5hmC e 5mC de acordo com o sexo, idade e lado da extração das amostras de folículos dentários.	43
Tabela 3- Resultado da imunoexpressão de pERK1/2 por amostra de folículos dentários.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS

ADO	Adenosina
BRAF	V-raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CNS	Conselho Nacional de Saude
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CpG	Citosina/Ligação Fosfodiéster/Guanina
CH3	Metil
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNMT	DNA Metiltransferase
DNMT 1	DNA Metiltransferase 1
DNMT 2	DNA Metiltransferase 2
DNMT 3A	DNA Metiltransferase 3A
DNMT 3B	DNA Metiltransferase 3B
DNMT 3L	DNA Metiltransferase 3L
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
ERK	Extracellular Signal-Regulated Kinases
ERK1/2	Extracellular Signal-Regulated Kinases (1 and 2)
EROE	Epitélio Reduzido do Orgão de Esmalte
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FD	Folículo Dental
GDP	Guanosina-Difosfato
GTP	Guanosina-Trifosfato
H-RAS	V-Ha-Ras Harvey Sarcoma Viral Oncogene Homolog
K-RAS	V-Ki-Ras2 Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinases
MAP2K	Mitogen-Activated Protein Kinases-Kinases
MAP3K	Mitogen-Activated Protein Kinases-Kinases-Kinases
MEK	Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase
MC	Metilcitosina
N-RAS	Neuroblastoma RAS Viral (v-ras) Oncogene Homolog
NcRNAs	RNAs Não Codificantes

P16	Proteína 16
P21	Proteína 21
P53	Proteína 53
P27	Proteína 27
P16	Proteína 16
pERK1/2	Phosphorylated ERK12
RAS	Rat Sarcoma Virus
RAF-1	Rapidly Accelerated Fibrosarcoma protein 1
RNA	Ácido Ribonucléico
RB1	Gene Supressor Tumoral de Retinoblastoma 1
RB27	Gene Supressor Tumoral de Retinoblastoma 27
SAM	Adenosilmetionina
SAH	S-Adenosilhomocisteína
SAHH	Enzima S-Adenosilhomocisteína Hidrolase
TCLE	Termo de Consetimento Livre e Esclarecido
TET	Ten-Eleven Translocation
TOA	Tumor Odontogênico Adenomatóide
TOCC	Tumor Odontogênico Calcificante
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
5mC	5 Metilcitosina
5hmC	5 Hidroximetilcitosina

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Folículo dental	19
2.2	Epigenética e metilação do DNA.....	22
2.3	Metilação em idade	26
2.4	Vias de sinalização MAPK/ERK.	29
3	OBJETIVOS.....	33
3.1	Objetivos.	33
4	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	34
5	METODOLOGIA	35
5.1	Amostragem.	35
5.2	Coleta das amostras e armazenamento	35
5.3	Critérios de inclusão	36
5.4	Critérios de exclusão	36
5.5	Avaliação anatomopatológica.....	36
5.6	Extração do DNA.....	36
5.7	Avaliação da metilação e hidroximetilação global do DNA ...	37
5.8	Imuno-histoquímica (pERK1/2).....	38
6	ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
7	RESULTADOS.....	40

7.1	Metilação do DNA.....	40
7.1.1	Caracterização da amostra da metilação do DNA.....	40
7.1.2	Análise da metilação e hidroximetilação global nos FDs.....	42
7.2	Imunoexpressão de pERK 1/2.....	45
7.2.1	Caracterização da amostra da imunoexpressão de pERK1/2	45
7.2.2	Análise da expressão imuno-histoquímica de pERK 1/2	45
8	DISCUSSÃO	49
9	CONCLUSÃO	54
	REFERÊNCIAS.....	55
	ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética e Pesquisa.....	73
	ANEXO B – Artigo Científico Publicado durante o Doutorado no periódico Archives of Oral Biology.....	76
	ANEXO C – Artigo Científico Submetido durante o Doutorado para publicação no periódico Archives of Oral Biology.....	77

1 INTRODUÇÃO

O Folículo dental (FD) é um tecido de origem ectomesenquimal, formado na segunda fase da odontogênese, durante a condensação do ectomesênquima remanescente que envolve a superfície externa do órgão de esmalte (AZEVEDO *et al.*, 2009). O FD possui fatores que contribuem para a formação do elemento dental (ARANTES *et al.*, 2014), e, durante o processo de odontogênese, permanece adjacente à coroa dos dentes não irrompidos ou impactados (MATSUMOTO *et al.*, 2006). O elemento dental que apresenta maior prevalência de impactação é o terceiro molar, com aproximadamente 98% em relação aos outros elementos dentários (HATTAB e ALHAIJA, 1999). Cerca de 57% dos adultos jovens apresentam terceiro molar mandibular incluso ou impactado (AYRANCI *et al.*, 2017). O FD apresenta revestimento epitelial, seja por epitélio reduzido do órgão do esmalte (DUTRA *et al.*, 2015; STANLEY, 1965) ou por epitélio escamoso e, raramente, por epitélio respiratório (EDAMATSU *et al.*, 2005; MELETI, WAAL, 2013). FD apresenta ilhas de resíduos epiteliais, persistentes da fragmentação da lâmina dentária, que mantêm alguma capacidade proliferativa e de diferenciação, que poderiam contribuir para o surgimento de lesões (COȘARCĂ *et al.*, 2016).

Em indivíduos jovens, o FD apresenta predominância de epitélio reduzido do órgão de esmalte, enquanto em indivíduos mais velhos há predominância de epitélio escamoso fino (KIM e ELLIS, 1993; MELETI e WAAL, 2013), que é semelhante aos revestimentos epiteliais de cistos e tumores de origem odontogênica (BRICK, 2014; GULER *et al.*, 2012). Em FDs com metaplasia escamosa, a proliferação celular do epitélio oral pode estar ativa (CABBAR *et al.*, 2008) com maior potencial proliferativo em indivíduos mais velhos quando comparados a indivíduos mais jovens (KUCUKKOLBASI *et al.*, 2014). Adelsperger *et al.*, (2000) relatam em seu estudo que FDs com metaplasia escamosa apresentam atividade proliferativa no epitélio, entretanto FDs com ausência de metaplasia escamosa não mostraram atividade proliferativa. De Oliveira *et al.* (2010) descrevem como baixa a atividade proliferativa dos FDs, podendo responder com proliferação quando estimuladas. A prevalência de metaplasia escamosa aumenta com a idade (MELLO-PALMA *et al.*, 2018).

Os mecanismos reguladores da proliferação celular envolvem eventos epigenéticos, como a metilação do DNA (ADCOCKET *et al.*, 2007). Padrões

epigenéticos mudam em um indivíduo de forma tecido específico, durante o processo de envelhecimento (CHRISTENSEN *et al.*, 2009). Com o envelhecimento cronológico, um padrão de hipometilação global do DNA é observado nas neoplasias hematológicas (SALHIA *et al.*, 2010) concomitantemente com hipermetilação de vários genes supressores tumorais (MAEGAWA *et al.*, 2005). Hipoteticamente, esses fenômenos podem potencializar a proliferação celular desordenada (WEIDMAN *et al.*, 2007), observada em tumores odontogênicos epiteliais (MOREIRA *et al.*, 2009c). O padrão de metilação dos genes *P16*, *P21*, *P27*, *P53* e *RB1* em FDs foi previamente investigado e a presença de metilação nos genes *P16*, *P27*, *RB1* (MOREIRA *et al.*, 2009b) foi observada. Porém, não há estudos até o momento que tenham avaliado a correlação entre metilação global do DNA de FDs e idade, de forma que esta questão permanece em aberto.

As vias de sinalização celular, como a MAPK/ERK, atuam no controle da proliferação e da diferenciação (NICKOLAYCHUK *et al.*, 2002; SEARS & NEVINS, 2002). A via MAPK/ERK pode se tornar ativa através de processos fisiológicos em resposta a sinais mitógenos (fatores de crescimento, citocinas) que interagem com receptores presentes na superfície celular (XING *et al.*, 2007) ou também por mutações ativadoras em genes da via como *KRAS* (COURA *et al.*, 2019), ou *BRAF* (KURPPA *et al.*, 2014). Mutações ativadoras resultam na ativação constitutiva da via MAPK/ERK1/2 (DAVIES *et al.*, 2002), ocorrendo a fosforilação e translocação de ERK1 para o núcleo, podendo ativar vários fatores de transcrição (HEIKINHEIMO *et al.*, 2014), como observado em mutações no *KRAS* em tumor odontogênico adenomatóide (COURA *et al.*, 2019) e no *BRAF* V600E em ameloblastomas (KURPPA *et al.*, 2014).

Alterações na ativação de ERK1/2 já foi observado em tecidos normais. Aumento da atividade da ERK1/2 foi observado em células da musculatura lisa da aorta torácica de ratos, o que poderia contribuir para doenças cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2018). Nickolaychuk *et al.* (2002) relatam que a ERK1 e sua forma fosforilada, pERK1/2, são expressas em tecidos epiteliais de origem odontogênica como FD, cistos dentígeros e radiculares, ativando a proliferação e a diferenciação celular.

Desregulação ou o funcionamento inadequado dessas cascatas de sinalização estão envolvidos na indução e na progressão de doenças como câncer, doenças autoimunes e anormalidades do desenvolvimento (PLOTNIKOV *et*

al, 2011). Porém na literatura não há estudos durante o envelhecimento nos folículos dentais.

Tendo em vista que alterações na via de sinalização MAPK/ERK já foram relatadas em outros tecidos e órgãos durante o envelhecimento, esse estudo teve por objetivo avaliar o padrão de imunoexpressão de ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) nas amostras de FDs, a fim de testar se há alteração no padrão de expressão de pERK1/2 com o aumento da idade dos indivíduos. Considerando que há uma alteração no perfil global de metilação do DNA com a idade, avaliamos o perfil de metilação global de amostras de FDs de indivíduos jovens e de indivíduos mais velhos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Folículo dental

A formação do elemento dental consiste em um processo complexo que abrange eventos celulares e moleculares denominado odontogênese (COBOURNE *et al.*, 1999). Interações recíprocas entre tecidos epiteliais e mesenquimais desempenham um papel fundamental na morfogênese dos dentes e regulam todos os aspectos do desenvolvimento dentário (BALIC e THESLEFF, 2015). Juntamente com a formação do elemento dental, ocorre a erupção dentária, processo programado que requer a reabsorção óssea e a osteoindução (BRKIĆ, 2014). Essa formação e erupção dentária ocorrem juntamente com o desenvolvimento do FD (EDAMATSU *et al.*, 2005). O FD é um tecido frouxo situado ao redor do dente não irrompido (AZEVEDO *et al.*, 2009). sendo formado no estágio de Capuz, durante a condensação do ectomesênquima remanescente (derivado de células da crista neural) que envolve a superfície externa do órgão de esmalte e, juntamente com o órgão de esmalte e a papila dentária, formarão o germe dental (BRKIĆ, 2014).

Nesse processo de formação do germe dental, o FD permanece adjacente à coroa dos dentes não irrompidos ou impactados (MATSUMOTO *et al.*, 2006), recrutando células mononucleares (BRKIĆ, 2014; HAGHANIFAR *et al.*, 2014), que fornecem reguladores na reabsorção e na formação óssea (DOROTHEOU *et al.*, 2013), contribuindo para a erupção dental (HAGHANIFAR *et al.*, 2014).

Durante o desenvolvimento do dente, o FD é dividido em três camadas - a camada interna adjacente à superfície externa do órgão do esmalte e a papila dentária, a externa adjacente ao osso alveolar em desenvolvimento, e a camada intermediária que separa os outros dois (ROTHOVA *et al.*, 2012). Células do FD contribuem para a formação do cementoblasto, do osso alveolar, e do ligamento periodontal (BRKIĆ, 2014).

Histologicamente, o FD se apresenta como tecido conjuntivo frouxo, sendo composto por fibras colágenas orientadas circularmente ao redor do órgão de esmalte e da papila dentária (KIM e ELLIS, 1993). O FD contém ilhas de resíduos

epiteliais, persistentes, da fragmentação da lâmina dentária, que mantêm alguma capacidade proliferativa e de diferenciação (COȘARCĂ *et al.*, 2016), que poderiam ser o ponto de partida das doenças (VILLALBA L *et al.*, 2012). Internamente é revestido pelo epitélio reduzido do órgão do esmalte, ou seja, um epitélio com duas ou três camadas (células colunares ou cúbicas) (STANLEY, 1965) ou por epitélio escamoso e, raramente, por epitélio respiratório (EDAMATSU *et al.*, 2005; MELETI e WAAL, 2013).

Os FDs em indivíduos jovens o predominante é o epitélio reduzido do esmalte, e em indivíduos mais velhos o predominante é epitélio escamoso muito fino (STANLEY *et al.*, 1965), tornando-se mais espesso e mais escamoso na presença de alterações inflamatórias (EDAMATSU *et al.*, 2005) ou sob a influência de alterações patológicas (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Alterações no tipo de epitélio sugerem estar relacionadas à idade (KIM e ELLIS, 1993), sendo mais observado o epitélio reduzido do esmalte em terceiros molares inferiores, quando comparados aos superiores (AZEVEDO *et al.*, 2009). O epitélio escamoso presente no FD é semelhante aos revestimentos epiteliais de cistos inflamatórios e de desenvolvimento de origem odontogênica (GUILLERMIN *et al.*, 2012), com várias formas de metaplasia e degeneração observadas nesses revestimentos epiteliais (TASCI, 2015). Alguns cistos também apresentam revestimento semelhante ao epitélio reduzido do esmalte, com ilhas de epitélio odontogênico (COȘARCĂ *et al.*, 2016).

Dentes impactados ou não irrompidos são definidos como os que permanecem completamente ou incompletamente incorporados na mandíbula, maxila e mucosa por mais de dois anos após o período fisiológico de erupção (AL-ZOUBI *et al.*, 2019). O terceiro molar é o dente com maior prevalência de impactação, representando 98% de impactação em relação a todos os dentes inclusos e impactados, com variação em diferentes populações (HATTAB *et al.*, 1999). Aproximadamente 57% dos jovens adultos apresentam terceiro molar mandibular incluso ou impactado (AYRANCI *et al.*, 2017). A prevalência de cistos e tumores odontogênicos associados aos terceiros molares impactados é de 5,3% na população, com maior prevalência no sexo masculino (MELLO *et al.*, 2019). Shin *et al.* (2016) relatam em seu estudo que a proporção de cistos e tumores associados aos terceiros molares aumentaram com a idade, ocorrendo em 0,4 a 0,7% dos

indivíduos com idade menor do que 30 anos, e entre 7 a 20% dos indivíduos acima dos 50.

Tumores epiteliais e cistos odontogênicos podem ser derivados de células epiteliais de tecidos orais como os remanescentes de epitélios odontogênicos dos FDs (CABBAR, 2008, TASCI, 2015). Matsumoto *et al.* (2006) sugerem que o FD possui atividade proliferativa e diferenciação, porém o comportamento biológico pode não estar associado à desregulação da apoptose ou proliferação celular (MATSUMOTO *et al.*, 2006). Entretanto Cabbar *et al.* (2008) sugerem que o epitélio odontogênico dos FDs pode estar proliferando ativamente sendo um indicador de diferenciação do FD, e que diferentes taxas de proliferação das células contidas no epitélio oral podem ser importantes na formação de tumores epiteliais e cistos odontogênicos (CABBAR, 2008).

Adelsperger *et al.*, 2000 relatam em seu estudo que FDs com metaplasia escamosa apresentam atividade proliferativa, entretanto FD com ausência de metaplasia escamosa não apresentou atividade proliferativa. De Oliveira *et al.*, 2010, descrevem como baixa a atividade proliferativa dos FDs, podendo responder com proliferação, quando estimuladas. A apoptose também tem papel importante na oncogênese, citodiferenciação e transformação maligna do epitélio odontogênico (COSTA *et al.*, 2017). Bolat e Keklokoglu (2010) descrevem que apoptose e proliferação celular podem desempenhar papel importante na formação de cistos dentígeros ao redor da coroa de dentes retidos. Os cistos e tumores mais associados aos terceiros molares são: cisto dentígero, cisto radicular e o ameloblastoma (MELLO *et al.*, 2019), porém tumores malignos também podem ser formados a partir de células de origem odontogênica, como carcinoma de células escamosas (ARAUJO *et al.*, 2014).

Baykul *et al.* (2005) relatam que existe maior incidência de alterações patológicas nos tecidos foliculares de indivíduos mais velhos em comparação com indivíduos mais jovens. Adelsperger *et al.* (2000) descreveram forte correlação entre incidência de alteração cística nos tecidos foliculares e idade. Porém os mecanismos na formação de cistos e tumores relacionados aos FDs não estão bem elucidados (CABBAR *et al.*, 2008), por isso alguns autores defendem a extração profilática dos terceiros molares (FARAH *et al.*, 2002).

2.2 Epigenética e metilação do DNA

O termo “epigenética” foi descrito pela primeira vez por Conrad Waddington, na década de 1940, e englobava a maior parte do que é conhecido pela biologia do desenvolvimento (SHARMA *et al.*, 2010). Klose e Bird (2008) estabeleceram a definição consensual de epigenética como “fenótipo hereditário estável resultante de mudanças nos cromossomos sem alteração na sequência do DNA”. Mecanismos epigenéticos são alterações hereditárias na expressão gênica que independem de alterações na sequência primária do DNA (SHARMA *et al.*, 2010), sendo essenciais para a regulação da expressão gênica do desenvolvimento e da homeostase (GIBNEY *et al.*, 2010). Embora praticamente todas as células de um organismo contenham a mesma informação genética, nem todos os genes são expressos simultaneamente por todos os tipos celulares (BROOKES e SHI, 2014).

Padrões epigenéticos mudam em um indivíduo de modo tecido específico durante o processo de envelhecimento (CHRISTENSEN *et al.*, 2009). Os mecanismos epigenéticos regulam diversas funções celulares, como expressão gênica, reparo do DNA e proliferação celular (ADCOCKET *et al.*, 2007).

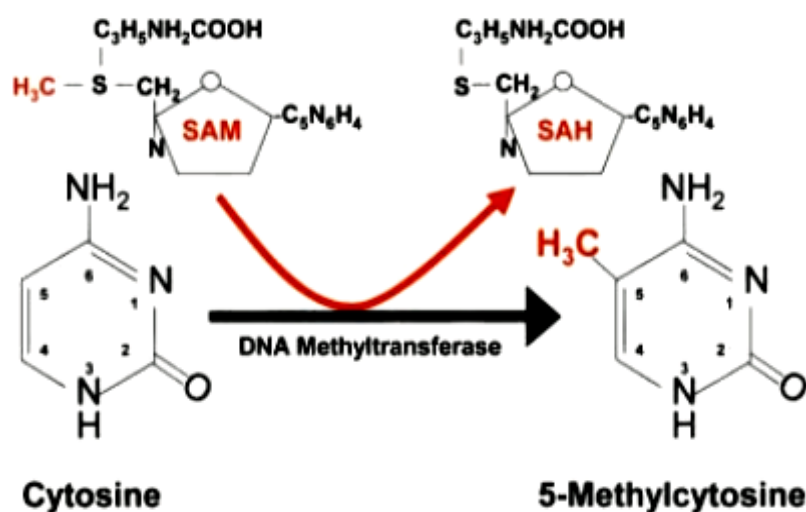
As modificações epigenéticas incluem metilação de DNA, modificação pós traducionais de histonas, remodelamento da cromatina e mecanismos baseados em RNAs não codificantes (ncRNAs) (DUPONT *et al.*, 2014). As alterações epigenéticas estão bem estabelecidas como importantes modificadores na susceptibilidade ao câncer e tumorigênese, e os subsequentes padrões aberrantes de 5 -metilcitosina (5 mC) têm se mostrado envolvidos em várias doenças associadas à idade (LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017), sendo um evento precoce e importante durante a carcinogênese, especialmente a metilação do DNA (LI e LIU, 2011). Essas alterações epigenéticas estão relacionadas à regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, sendo descritas em diferentes neoplasias benignas e malignas (NARLIKAR *et al.*, 2002).

A metilação do DNA é um importante mecanismo de modificação epigenética encontrado no genoma dos organismos vivos (KLOSE e BIRD, 2008). Estudos em diferentes tecidos humanos relataram mudanças abundantes de metilação do DNA com a idade, com a tendência predominante de hipometilação geral no envelhecimento, que ocorre principalmente em sequências repetitivas de DNA

(LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017).

A metilação consiste em uma modificação covalente do DNA na qual um grupamento metil (CH_3), obtido particularmente da metionina é transferido da 5-adenosilmetionina para o carbono 5 de uma citosina que geralmente precede uma guanina (dinucleotídeo CpG), sem interferir nas bases do DNA (HANDEL *et al.*, 2009). A metilação ocorre predominantemente em áreas ricas de CpG no DNA, conhecidas como ilhas CpG, encontradas principalmente em áreas promotoras de genes ativos (JONES, 2003), sendo associada ao silenciamento da transcrição do gene correspondente e condensação de cromatina (HERMANN *et al.*, 2004) (FIGURA 1).

Figura 1 - Formação da 5-Metilcitosina (5mC) pela DNA metiltransferase. Uma enzima DNA metiltransferase catalisa a transferência de um grupo metil (CH_3) de S-adenosilmetionina (SAM) para (desoxi) citosina, produzindo 5-(desoxi) metilcitosina e S-adenosilhomocistina (SAH).



Fonte: ATTWOOD *et al.*, 2002.

Os dinucleotídeos CpG tendem a se concentrar em regiões denominadas ilhas CpG, as quais possuem mais de 200 pb, como teor de CpG mais que 50%, sendo o resto do genoma empobrecido de sequências CpG (JONES, 2012). Aproximadamente 70% dos promotores de genes humanos estão associados a ilhas CpG, que geralmente se encontram desmetiladas sob condições normais. Os nucleotídeos CpG não estão uniformemente distribuídos pelo genoma, ocorrem em agrupamentos (clusters) de

sequências repetitivas, sequências satélites, repetições centrômeras ou pequenas extensões de DNA ricas em citosinas guaninas (COSTELLO e PLASS, 2001).

A metilação do DNA também pode ocorrer em regiões com menor densidade de CpG que se encontram nas margens das ilhas. As margens se situam em uma distância variável dos promotores e são chamadas de “shore” (até 2000 pb da ilha), “shelf” (2000 a 4000 pb) e “open sea” (4000 pb). A metilação das margens das ilhas CpGs está intimamente relacionada à inativação transcricional (CRIDER *et al.*, 2012).

As reações de metilação do DNA envolvem ação das DNA metiltransferases (DNMTs) que transferem um grupo metil de SAM ao carbono 5 da citosina. Como resultado temos a formação de S-adenosil-homocisteína (SAH), a qual pode ser clivada em ADO e homocisteína por ação da enzima SAH hidrolase (SAHH). A SAHH é uma enzima reversível, cujo equilíbrio termodinâmico na presença de ADO favorece a síntese de SAH, que é um importante inibidor das DNMTs (SUBRAMANIAM *et al.*, 2014).

Essa transferência do grupamento metil ao dinucleotídeo CpG ocorre através das DNA metiltransferases (DNMT), sendo identificados em mamíferos cinco membros da família DNMT: DNMT1, DNMT2, DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L, entretanto apenas DNMT1, DNMT3A e DNMT3B participam diretamente da adição de grupos metil ao DNA (SUBRAMANIAM, 2014).

A DNMT1 é a principal enzima responsável pela manutenção do padrão de metilação do DNA (RAMSAHOYE, 2000), sendo a primeira a ser identificada e o tipo mais abundante de DNMT em células somáticas de mamíferos (GOLL e BESTOR, 2005). Ao contrário das demais DNMTs, a DNMT1 metila preferencialmente DNA hemimetilado (ESPADA, 2012; MIREMADI *et al.*, 2007) e também tem atividade *de novo* metiltransferase (AAPOLA, 2000; OKANO *et al.*, 1999).

A DNMT2 é a menor DNMT dos mamíferos. Ela possui apenas um domínio C-terminal, sugerindo que essa enzima participe do reconhecimento de danos, recombinação e reparo do DNA (AAPOLA, 2000; HERMANN *et al.*, 2004).

As DNMT3 consistem em três diferentes proteínas em mamíferos: DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L (MORTUSEWICZ, 2005). DNMT3A e DNMT3B têm a função de atuar com a metilação *de novo*, apresentando uma distribuição ao longo do núcleo não associado com sítios de replicação durante a fase S (XUJ *et al.*, 2009). A DNMT3L também é um fator regulador da metilação *de novo*, porém não possui atividade catalítica (OKANO *et al.*, 1999). Suter *et al.* (2004) afirmam que a metilação na molécula de DNA controla várias funções do genoma, entre elas:

recombinação durante meiose e mitose, controle da replicação, estabilização e manutenção da expressão gênica e regulação da diferenciação celular.

A hipermetilação é uma alteração epigenética que frequentemente leva a deleções e translocações inativadoras de genes, e a hipometilação, que é o nível reduzido ou perda de metilação comparada com a das células normais, pode aumentar a instabilidade cromossômica e a ativação de oncogene (DONG *et al.*, 2014).

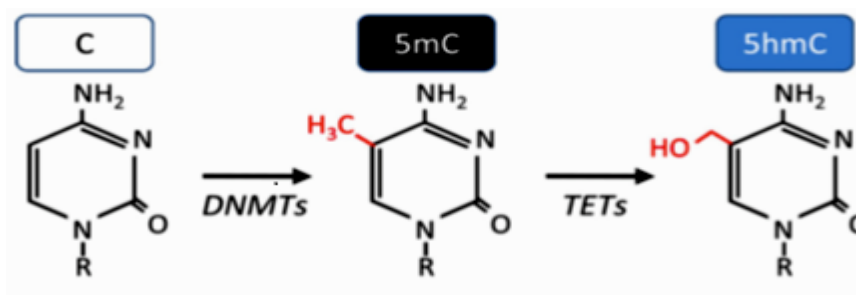
O padrão de metilação em células tumorais é alterado em relação às células normais com a hipermetilação de CGI em promotores, sendo observada com alta frequência em diferentes tumores, entretanto muitos cânceres são caracterizados por uma hipometilação global que está associada com instabilidade cromossomal (HERVOUET *et al.*, 2013).

Fatores ambientais têm sido envolvidos na modulação da metilação e incluem: poluentes, como íons metálicos como cromo (SHIAO *et al.*, 2005), níquel (SALNIKOW e COSTA, 2000), cádmio (TAKIGUSHI *et al.*, 2003), medicamentos (VEURINK *et al.*, 2005), estado nutricional (BELL *et al.*, 2011), e tabagismo.

Em 1972, Penn e colaboradores descobriram a 5-Hidroximetilcitosina (5hmC), que foi caracterizada como a sexta base do DNA alguns anos mais tarde, sendo um fator epigenético relacionado ao processo de desmetilação do DNA (PENN *et al.*, 1972). A 5hmC não é simplesmente um intermediário da desmetilação do DNA, mas uma marca epigenética genuína que pode desempenhar papel importante funcional na regulação gênica (LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017). Sua formação ocorre quando a 5mC é hidroxilada por enzimas da família TET (*ten-eleven translocation*) gerando a 5hmC. Esta, por sua vez, é fracamente reconhecida pela DNMT1, e, durante replicações celulares sucessivas, os sítios que eram metilados serão passivamente demetilados (KRIAUCIONIS S, HEINTZ N, 2009) (FIGURA 2).

Níveis globais de 5hmC em todo o genoma humano flutuam significativamente entre os tipos de tecido e são aproximadamente 10 vezes menores que os de 5mC, sendo presentes em humanos no rim, no fígado, no cólon e no reto e, com níveis mais altos, encontrados no cérebro (LI e LIU, 2011). A função da 5hmC como uma marca epigenética é mal compreendida, mas parece estar associada com ativação da transcrição (BREILING e LYKO, 2015).

Figura 2 - Mecanismo dinâmico da demetilação do DNA. Demetilação ativa do DNA através da hidroxilação da 5mC em 5hmC pelas enzimas TET.



Fonte: Adaptado de LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017.

Existe uma associação da 5hmC com doenças como câncer, doenças neurológicas e cardiovasculares, com a gametogênese e embriogênese (MENDONÇA *et al.*, 2018). Haffner *et al.* (2011) relatam que há diminuição de 5hmC extensivamente em diferentes cânceres humanos, incluindo glioblastoma e melanoma, e cânceres de mama, cólon, estômago, rim, fígado, pulmão, pâncreas e próstata.

O papel funcional do 5hmC assume importância maior, dado que é desregulado em várias doenças humanas, incluindo as degenerativas, como Parkinson e Alzheimer, sugerindo que 5hmC pode ter um papel influente na desmetilação do DNA durante o envelhecimento (TORANO *et al.*, 2006).

Portanto a metilação do DNA pode representar um passo fundamental no caminho pelo qual o tecido normal sofre transformação em tumor (COSTA *et al.*, 2017).

2.3 Metilação do DNA e idade

O envelhecimento é um processo fisiológico complexo caracterizado por perda progressiva da funcionalidade do tecido (CICCARONE *et al.*, 2017). Esse processo de envelhecimento pode representar um dos principais fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de doenças (LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017), como sarcopenia, osteoporose e neurodegenerações devido à

perda da integridade e da função celular (CICCARONE *et al.*, 2017), além do acúmulo de mutações genéticas que poderiam contribuir para o desenvolvimento de doenças como o câncer no cólon e no intestino delgado (BLOKZIJL *et al.*, 2016). Entretanto alterações teciduais podem ocorrer durante o envelhecimento, sem que haja manifestação de doença, como alterações no tecido conjuntivo, ou alterações na quantidade de colágeno em tecidos, com perda progressiva de 1% ao ano durante toda a vida adulta (CHUNG *et al.*, 2000).

As mudanças nos padrões epigenéticos que ocorrem em tecidos e células, são eventos genéticos moleculares que poderiam estar associados ao envelhecimento (MAEGAWA *et al.*, 2010). Em humanos, eventos epigenéticos como a metilação do DNA podem sofrer alterações em seus padrões de metilação durante o envelhecimento, como observado em células sanguíneas (BUSCALERT *et al.*, 2016). Torano *et al.* (2016) observaram que regiões do DNA de células-tronco mesenquimais humanas durante o envelhecimento podem também sofrer alterações. No mesmo sentido, Kriaucionis e Heintz (2009) descreveram que alterações no padrão de metilação do DNA variam significativamente entre tecidos do cérebro durante o envelhecimento.

Essa desregulação epigenética na metilação do DNA é uma característica comum do envelhecimento em mamíferos (MAEGAWA *et al.*, 2005) e pode levar à formação de tumores (HERVOUET *et al.*, 2013). Muitos genes sensíveis ao silenciamento mediado pela metilação do DNA são genes supressores tumorais que regulam a divisão celular, e sua perda ou inativação pode levar à proliferação celular desordenada (WEIDMAN *et al.*, 2007), como observado em tumores odontogênicos (MOREIRA *et al.*, 2009b).

O envelhecimento causa alterações tanto na distribuição da 5mC (KNAPOWSKI *et al.*, 2002, LI *et al.*, 2006), quanto na da 5hmC (HAFFNER *et al.*, 2011). Geralmente, com o envelhecimento, ocorre uma hipometilação global concomitantemente com a hipermetilação de algumas ilhas CpG distribuídas repetitivas (CRISTENSEN *et al.*, 2009), o que poderia contribuir para a inativação da transcrição/tradução ou para instabilidade genômica respectivamente (YOO & JONES, 2006). Esse processo é muitas vezes desregulado nas células tumorais (YOO e JONES, 2006), como nas neoplasias hematológicas (CRISTENSEN *et al.*, 2009), e em tumores odontogênicos (MOREIRA *et al.*, 2009a).

Células e tecidos normais em envelhecimento mostram perda progressiva do

conteúdo de 5mC, principalmente em sequências repetidas de DNA, mas também em áreas potenciais reguladoras de genes (ISSA, 2003). A hidroximetilação global também diminui progressivamente com a idade, com redução de 5hmC muito maior que a de 5mC (BUSCARLET *et al.*, 2016). Portanto, o papel das alterações da metilação do DNA precisa ser reexaminado a partir da perspectiva de 5hmC durante o envelhecimento, pois suas alterações poderiam contribuir para o surgimento de doenças (HAFFNER *et al.*, 2011).

Alterações relacionadas à idade nos níveis e / ou distribuição de 5hmC desequilibram a regulação gênica (LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017), como em diferentes cânceres humanos, incluindo glioblastoma e melanoma, e cânceres de mama, cólon, estômago, rim, fígado, pulmão, pâncreas e próstata (HAFFNER *et al.*, 2011). Song *et al.* (2011) relataram um ganho global de 5hmc com a idade no cerebelo e no hipocampo em ratos.

A metilação do DNA, modulada pelo envelhecimento (ISSA JP., 2003), pode representar um passo fundamental na via pela qual o tecido normal sofre transformação tumoral (COSTA *et al.*, 2017). Entretanto até o momento, estudos sobre o papel da metilação de genes na patogênese de tumores odontogênicos epiteliais ainda são escassos na literatura.

Nos FDs a metilação em genes pode influenciar esse tecido a mudanças patológicas, devido às alterações do controle do ciclo celular (MOREIRA *et al.*, 2009a).

Khojasteh *et al.* (2013) investigaram a possibilidade de metilação do gene *P16* em carcinoma ameloblástico, ameloblastoma e folículos dentais de dentes inclusos, e observou que o *P16* nos FDs se apresentava não metilado. Moreira *et al.* (2009b) investigaram o padrão de metilação dos genes *P16*, *P21*, *P27*, *P53* e *RB1*, responsáveis pelo controle do ciclo celular em amostras de Ameloblastoma, Tumor Odontogênico Cístico Calcificante, Tumor Odontogênico Adenomatóide (TOA) e FDs. Foi observada a presença de metilação nos genes *P16*, *P27*, *RB1*.

Costa *et al.* (2017) mostraram diferenças importantes nos níveis de metilação dos genes *TNFRSF25* e *BCL2L11*, de ameloblastomas em comparação aos folículos dentais.

Ainda são poucas as evidências em estudos que demonstrem o papel da metilação em FDs (COSTA *et al.*, 2017), e até o momento não há estudos que avaliaram as alterações no padrão de metilação do DNA em FDs durante o

envelhecimento.

2. 4 Via de sinalização MAPK/ERK

O envelhecimento é um processo biológico modulado que acontece durante o curso da vida incluindo fatores intrínsecos, extrínsecos e hereditários, sendo que padrões epigenéticos mudam durante a vida (LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017). Entretanto também existe uma associação entre idade e alterações na ativação das vias de sinalização celular, como a via MAPK/ERK (HUTTER *et al.*, 2000).

A manutenção da homeostase celular depende da regulação precisa de múltiplas vias de sinalização que controlam o destino fisiológico das células: como proliferação, diferenciação, senescência ou morte celular (SEARS & NEVINS, 2002).

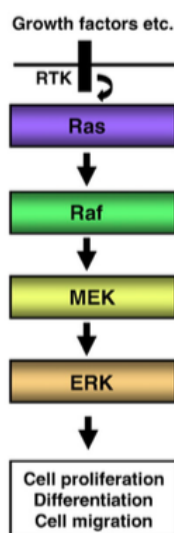
Uma das vias de sinalização celular é a da MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), que são vias centrais de sinalização reguladoras de uma ampla variedade de processos celulares estimulados, incluindo proliferação, diferenciação e apoptose (DHILLON *et al.*, 2007; TANG *et al.*, 2010).

As vias da MAPK são ativadas por diversos estímulos extracelulares e intracelulares, incluindo fatores de crescimento de peptídeos, citocinas, hormônios e vários estressores celulares (YOON e SEER, 2006). Cada eixo de sinalização de MAPK compreende pelo menos três componentes: uma cinase MAPK quinase (MAP3K), uma MAPK quinase (MAP2K) e uma MAPK. MAP3Ks fosforilam e ativam MAP2Ks, que por sua vez fosforilam e ativam MAPKs (KIM e CHOI, 2010).

A ativação fisiológica dessa via se inicia em resposta a múltiplos sinais mitogénicos (fatores de crescimento, hormônios e citocinas) que interagem com os receptores tirosina- cínase presentes na superfície celular, ativando-os (XING, 2007). Esses diferentes receptores de membrana, incluindo o receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2) e EGFR, levam à ativação de RAS (N-RAS, H-RAS e K-RAS), localizado na superfície interna da membrana, através da substituição do GDP pelo GTP (FREGNANI *et al.*, 2017). O RAS ativo, por sua vez, interage e ativa a cínase da proteína RAF, recrutando-a para a membrana, onde é ativada (XING, 2007). A RAF cínase do tipo B (BRAF), a mais abundante e potente

na família RAF, encontra-se assim capaz de fosforilar e ativar a MEK, que por sua vez fosforila e ativa a ERK (NUCERA *et al.*, 2009). Quando ativada, a ERK fosforila proteínas citoplasmáticas e é translocada para dentro do núcleo, onde regula a transcrição de genes envolvidos na diferenciação, na proliferação e na sobrevivência celular (HANDKIEWICZ-JUNAK *et al.*, 2010; TANG *et al.*, 2010) (FIGURA 3).

Figura 3- Representação esquemática da via de transdução de sinal da MAP quinase ERK1/2. Quando um agonista (como o Fatores de Crescimento, por exemplo) se liga ao receptor tirosina quinase (RTK), ocorre uma auto-fosforilação e cooptação de um complexo de proteínas que ativa Ras próximo à membrana. Ras ativa c-Raf-1, ou MAP quinase quinase quinase, que por sua vez fosforila a próxima quinase do módulo, MEK1/2 (MAP quinase quinase). MEK1/2 forma um complexo citoplasmático com ERK1/2 (MAP quinase) inativada; quando MEK fosforila ERK, as duas se separam, e ERK ativada transloca-se rapidamente para o núcleo, onde fosforila substratos, tais como fatores de transcrição (FT).



Fonte: Kim e Choi, 2010.

A via MAPK / ERK está mutada em cerca de 30% de todos os cânceres, com mutações no gene *BRAF* encontradas em aproximadamente 7% dos cânceres (T. A° BERG *et al.*, 2004). Essas mutações resultam em ativação constitutiva da via para o estado de hiperproliferação (DREESSEN e BRIVANLOU, 2007). Portanto, a desregulação ou o funcionamento inadequado dessas cascatas estão envolvidos na indução e na progressão de doenças como câncer, diabetes, doenças autoimunes e anormalidades do desenvolvimento (PLOTNIKOV *et al.*, 2011).

A proteína BRAF é o mais potente ativador da via MAPK (TANG e LEE, 2010)

e tem sido demonstrado que a hiperativação do *BRAF* pode dar início a tumorigênese (DREESEN e BRIVANLOU, 2007). O *BRAF* exerce a função de regular a via MAPK/ERK que é conservada em todos os eucariotos, agindo como transdutor entre o meio extracelular e o núcleo (TROVISCO *et al.*, 2006).

A mutação pontual *BRAF* mais comum é aquela em que a timina é substituída pela adenina (T 1799A), levando à substituição do ácido glutâmico (E) pela valina (V) no 600º resíduo de aminoácido na proteína expressa, por isso a identificação dessa mutação como V600E (McCAIN, 2012). Lesões benignas que apresentam essa mutação incluem nevos melanocíticos (POLLOCK *et al.*, 2003) e tumor neuro-endotelial melanótico da infância (GOMES *et al.*, 2015).

Mutações *BRAF* V600E foram encontradas em tumores odontogênicos. Kurppa *et al.* (2014) avaliaram 24 amostras de ameloblastomas, e 15 (63%) apresentavam mutações *BRAF* V600E. Brown *et al.*, (2014) avaliaram a presença de *BRAF* V600E em 50 amostras de ameloblastoma, sendo que em 31 (62%) foram identificadas mutações. Semelhante ao estudo do Brown *et al.* (2014), Sweeney *et al.* (2014) encontraram em mais de 60% dos ameloblastomas, mutações no *BRAF* V600E. Acredita-se que a proteína mutada, *BRAF* V600E, imite a fosforilação do segmento de ativação e ative constitutivamente a via da MAPK/ERK, com consequente aumento da proliferação celular (DAVIES *et al.*, 2002).

Mutações no *RAS* (*KRAS*) também ativam a via de sinalização MAPK/ERK, e foram observadas em tumores odontogênicos adenomatóides (GOMES *et al.*, 2016).

No módulo ERK/MAPK, o ERK (ERK1 e ERK2) é ativado após a fosforilação por MEK (MEK1 e MEK2), que é ativado quando fosforilado por Raf (Raf-1, B-Raf e A-Raf) (DHILLON, 2007). A inativação de ERK requer sua desfosforilação por fosfatases específicas, e a forma desfosforilada retorna ao citoplasma e se associa novamente à MEK 1/2 (WIDMANN *et al.*, 1999).

As ERKs (quinase regulada por sinal extracelular) foram originalmente clonadas por Cobb e colaboradores em 1991, através da bioquímica tradicional. Elas compreendem uma família de proteínas quinases 42/44 quilodaltons e ativadas por fosforilação (JARELL *et al.*, 2007).

A ERK é a mais bem estudada das vias MAPK de mamíferos e é desregulada em aproximadamente um terço de todos os cânceres humanos (DHILLON, 2007). ERKs ativos fosforilam numerosos alvos citoplásmicos e nucleares, incluindo fatores de transcrição e proteínas (YOON e SEER, 2006). A sinalização ERK pode,

dependendo do tipo de célula, regular proliferação, diferenciação, sobrevivência, migração, angiogênese e remodelação da cromatina (DUNN *et al.*, 2005; YOON e SEER, 2006).

A ERK1 e sua forma ativa pERK1/2 estão associadas à diferenciação e à proliferação ativa de epitélios de cistos odontogênicos (cistos dentígeros e radiculares), e sua forma fosforilada pERK1/2 é expressa em tecidos como o FD (NYCOLAYCHUK *et al.*, 2002). Nesse mesmo estudo, Nycolaychuk *et al.* (2002) relatam que houve expressão intensa de pERK1/2 no epitélio do cisto dentígero e do cisto radicular. Porém, no FD, menos células epiteliais expressaram pERK1/2 em comparação ao cisto radicular (18,4 % para FD e 56,1 % para cisto radicular).

As ERKs são ativadas em resposta aos estímulos dos fatores de crescimento, o que é essencial para proliferação e diferenciação celular (MANSOUR *et al.*, 1994), sobrevivência das células (XIA *et al.*, 1995), diferenciação, desenvolvimento, aprendizado e em algumas situações apoptose (SHAUL YD e SEGER R, 2007).

Durante o envelhecimento a ativação da via ERK pode estar aumentada, como observado em células da musculatura lisa da aorta torácica em ratos, o que poderia contribuir para alterações e doenças cardiovasculares (ZHANG *et al.*, 2018). Atividade reduzida da ERK1/2 foi observada em células T de humanos em idosos (BEIGING *et al.*, 1997) e hepatócitos de ratos idosos (LIU *et al.*, 1996).

A ativação de cascatas de sinalização intracelular envolvendo serina/treonina quinases ERK1/2 estimula ou inibe a diferenciação de células epiteliais em resposta a sinais extracelulares (NYCKOLAYCHUK *et al.*, 2002).

Alterações na via de sinalização MAPK/ERK já foram relatadas em outros tecidos e órgãos durante o envelhecimento, porém na literatura não há estudos que avaliaram alterações no padrão de expressão de pERK1/2 em FDs com o aumento da idade.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos

Avaliar o perfil de metilação e hidroximetilação global do DNA em amostras de FD de terceiros molares impactados mandibulares.

Avaliar se os FDs de indivíduos jovens e indivíduos mais velhos apresentam diferença no perfil de metilação global do DNA.

Avaliar o padrão de imunoexpressão da pERK1/2 em amostras de FDs de terceiros molares impactados mandibulares e se há diferença na imunoexpressão dessa proteína de acordo com a idade dos indivíduos.

4 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira do Conselho Nacional de Saúde sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos, conforme resoluções CNS no 196/96 E 304/00, sendo aprovado com o número de protocolo 2.144.768 (ANEXO A).

Os indivíduos selecionados para participar da pesquisa foram informados sobre conteúdo da pesquisa, objetivos e métodos, e incluídos na pesquisa somente após leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), tendo oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas. Eles foram convidados a participar, e informados de que durante qualquer etapa do projeto de pesquisa teriam o direito de desistir e não sofreriam nenhuma penalização, nem seriam interrompidos os procedimentos necessários para o término de seu tratamento.

5 METODOLOGIA

5.1 Amostragem

Uma amostra de conveniência de FDs foi obtida de indivíduos submetidos à extração de terceiros molares inferiores entre janeiro de 2017 a dezembro de 2017. O procedimento cirúrgico foi realizado por diferentes alunos de graduação em Odontologia e professores do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os terceiros molares inferiores apresentavam qualquer posição dental, tanto do lado direito quanto do esquerdo, totalmente inclusos e provenientes das Clínicas de Odontologia, Projetos de Extensão e Aperfeiçoamento em Cirurgia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais.

5.2 Coleta das amostras e armazenamento

As amostras do FD foram obtidas de indivíduos que se submeteram à extração de terceiros molares inferiores em um total de 59 indivíduos, seguindo normas e condutas de biossegurança, com material cirúrgico adequado para extração dental, sob anestesia local, com auxílio de exames de imagens, como tomografias e/ou radiografias, e sob supervisão e orientação de professores especialistas em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial.

A coleta das amostras foi realizada após a remoção dos terceiros molares por via não alveolar através de técnicas de osteotomia, curetagem do alveólo e remoção do FD. Após remoção do tecido folicular, o mesmo foi fragmentado em duas partes com lâmina de bisturi n.15c, e o primeiro fragmento foi fixado em formol tamponado a 10% e embebida em parafina para preparação de lâminas histológicas e confirmação do diagnóstico. Outro fragmento foi armazenado em tubo contendo 1mL de solução conservadora de ácidos nucleicos (RNAholder, BioAgency, Brasil) e estocado em um freezer a -80°C até o processamento das amostras.

5.3 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão no estudo foram realizados mediante a seleção de indivíduos de ambos os gêneros, sem idade específica e que apresentavam os terceiros molares mandibulares inclusos, em qualquer posição de inclusão.

5.4 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão dos indivíduos no estudo foram: não ter aceitado em participar do estudo, ter feito uso de antibióticos ou antiinflamatórios nos últimos seis meses, ser fumante, apresentar condições sistêmicas alteradas, indivíduos imunocomprometidos e indivíduos apresentando os terceiros molares mandibulares erupcionados ou semi-inclusos.

5.5 Avaliação anatomopatológica

Todas as lâminas histológicas das 59 amostras foram preparadas e coradas em H&E, coloração de rotina, para avaliação no Laboratório de Patologia Oral e Maxilo Facial da Universidade Federal de Minas Gerais. As amostras coletadas só foram utilizadas para estudo, caso o diagnóstico histopatológico fosse “folículo dental”.

5.6 Extração do DNA

DNA genômico (gDNA) foi isolado de FDs que apresentavam no mínimo 20 gramas de tecido. Essas amostras estavam armazenadas em solução conservadora

de ácidos nucleicos (*RNAholder*, BioAgency, Brasil) em freezer a -80°C . Foi utilizado o Kit comercial de extração DNeasyBlood&Tissue Kit (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as instruções do fabricante. A concentração do gDNA foi determinada por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nanodrop (NanoDrop instrument 2000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) e estocado a -20°C para posterior análise. Foram considerados bons parâmetros de pureza do DNA as relações (260/280) acima de 1,8 e relação (260/230) acima de 1,7.

5.7 Avaliação da metilação e hidroximetilação global do DNA

A metilação (%5mC) e hidroximetilação (%5hmC) global do DNA foram avaliadas nas 59 amostras de FDs. O DNA extraído das amostras de FDs foi submetido a reações do tipo ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática) com base em ligações antígeno-anticorpo para avaliação da metilação e hidroximetilação global do DNA. Para isso, utilizou-se anticorpo monoclonal para quantificação de 5-metilcitosina (Quest 5mC™ DNA ELISA Kit, Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA) e 5-hidroximetilcitosina (Quest 5hmC™ DNA ELISA Kit, Zymo Research Corp., Irvine, CA, USA), conforme protocolo do fabricante, com número do catálogo D5325 (Kit 5mC) e número do catálogo D5425 (Kit 5hmC). Com o intuito de quantificar a metilação e hidroximetilação global do DNA, foram feitos ensaios quantitativos que utilizam uma enzima e um substrato específico que revela a mudança de cor em presença do antígeno em estudo, em alguma amostra (nesse caso, DNA metilado) e reflete absorbância. Para cada ensaio ELISA, 5mC e 5hmC, todas as amostras foram avaliadas ao mesmo tempo e na mesma experiência. A análise da colorimetria foi calibrada para identificar o percentual de metilação e hidroximetilação do DNA em cada amostra, baseada no uso de uma curva padrão fornecida pelos kits utilizados.

A absorbância foi analisada no espectrofotômetro *Epoch™ Microplate Spectrophotometer* (BioTek, Winooski, USA), usando um leitor de placas ELISA para medir absorbância a 405 nm, sendo que em cada poço foi utilizado 100ng de DNA. Com os valores de absorvância obtidos por amostra, a partir do padrão da reação, foram calculadas as porcentagens de metilação global de DNA (5mC e 5hmC,

separadamente) para cada amostra. Em seguida, os valores percentuais foram analisados isoladamente e em conjunto.

5.8 Imuno-histoquímica (pERK1/2)

Para avaliar a ativação da via MAPK/ERK nas amostras de FDs, foi examinada a imunorreatividade pERK1/2 em 46 amostras de FDs de 46 indivíduos. A imuno-histoquímica foi realizada seguindo procedimentos padrão. Os cortes com espessura de 4µm foram colocados em lâminas silanizadas (Star Frost, Braunschweig, Germany). A recuperação anti-gênica foi realizada utilizando uma solução tampão TRIS-EDTA (pH 8,0), e o bloqueio da peroxidase endógena foi realizada com metanol/peróxido de hidrogênio 3%. A incubação do anticorpo primário foi realizada utilizando o anticorpo monoclonal de coelho anti- pERK1 / 2 (Thr202/Tyr204, CST # 4376), diluído a 1:100, overnight a 4°C. O sistema de detecção utilizado foi o polímero Envision – dual link system HPR (Dako, Carpinteria, CA, EUA) que foi incubado por 90 minutos a 4°C. A diaminobenzidina (Dako North America, Carpinéia, EUA) foi utilizada como cromógeno. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Mayers.

A expressão imuno-histoquímica de pERK1/2 foi avaliada utilizando-se uma estimativa visual da proporção de células marcadas com coloração nuclear positiva, tanto na porção epitelial quanto mesenquimal, independentemente da intensidade. Essa estimativa visual foi categorizada em três grupos: menos de 10% de células positivas; entre 10 e 50% de células positivas ou mais de 50 % de células positivas. A avaliação foi feita por dois observadores diferentes (N.B.P. e V.C.B.M), e apenas a marcação nuclear foi considerada. Em um segundo momento, os resultados foram reavaliados por um terceiro avaliador (C.C.G.) Casos em que houve discordância foram reavaliados e um consenso foi obtido.

6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As estatísticas descritivas e inferenciais foram executadas no software R versão 3.6.1. Para avaliação da relação entre variáveis numéricas, foram criados diagramas de dispersão com o suavizador do tipo *locally estimated scatterplot smoothing* (LOESS). As relações em que a curva do suavizador indicou linearidade foram quantificadas através do coeficiente de correlação de Spearman. A normalidade foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. Diferenças de medianas do conteúdo de 5mC e 5hmC entre sexo e o lado da extração foram avaliadas com o teste de Mann-Whitney para amostras independentes. O nível de significância foi estabelecido em 0,05. Análise de potência *a priori* e *post hoc* foram realizadas na versão G-power 3.1.9.4, usando proporções e tamanhos de efeito observados para calcular o tamanho da amostra para atingir 80% de *power* e *power* obtido, respectivamente.

Para a análise estatística dos resultados da imuno-histoquímica de pERK1/2, foi utilizado o software IBM SPSS Statistics para Windows, versão 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp.), por meio do qual foi avaliada a normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. A marcação por imuno-histoquímica foi categorizada em três grupos (Grupo 1: $\leq 10\%$, Grupo 2: $>10\%$ a ≤ 50 e Grupo 3: >50). O teste não paramétrico de Kruskal-Wallis foi usado para comparar as idades desses três grupos. Além disso, Wilcoxon-Mann-Whitney (W) foi utilizado para comparar a mediana das idades entre o Grupo 1 (IHQ $\leq 10\%$) com os Grupo 2 e 3 (IHQ $>10\%$). O nível de significância foi determinado em 0,05.

7 RESULTADOS

7.1 Metilação do DNA

7.1.1 Caracterização da amostra utilizada na análise da metilação global do DNA

As características dos indivíduos das amostras de FDs submetidas ao estudo da metilação do DNA estão mostradas na Tabela 1. Os resultados na distribuição por sexo mostram que a maior parte dos indivíduos era do sexo feminino, sendo 39 (66,1%) do sexo feminino e 20 (33,9%) do sexo masculino. A média de idade dos indivíduos foi de 19,56 anos, variando de 13 a 31 anos.

Tabela 1 - Características clínicas dos indivíduos das 59 amostras de FDs do estudo da metilação do DNA.

Amostra #	Informações Clínicas		
	Idade	Sexo	Lado
1	21	Feminino	Direito
2	16	Feminino	Direito
3	25	Feminino	Esquerdo
4	20	Feminino	Esquerdo
5	23	Feminino	Esquerdo
6	17	Feminino	Direito
7	17	Masculino	Esquerdo
8	17	Feminino	Direito
9	18	Masculino	Direito
10	17	Feminino	Direito
11	19	Feminino	Esquerdo
12	16	Masculino	Esquerdo
13	20	Feminino	Direito
14	30	Feminino	Direito
15	31	Masculino	Direito
16	27	Masculino	Esquerdo
17	17	Feminino	Esquerdo
18	17	Masculino	Esquerdo

19	20	Masculino	Direito
20	17	Masculino	Direito
21	17	Masculino	Direito
22	17	Feminino	Direito
23	17	Feminino	Direito
24	20	Feminino	Esquerdo
25	19	Feminino	Direito
26	16	Masculino	Esquerdo
27	16	Masculino	Direito
28	15	Masculino	Esquerdo
29	17	Feminino	Direito
30	19	Feminino	Esquerdo
31	23	Masculino	Direito
32	17	Feminino	Direito
33	17	Feminino	Esquerdo
34	23	Feminino	Esquerdo
35	25	Feminino	Esquerdo
36	19	Feminino	Esquerdo
37	15	Feminino	Esquerdo
38	17	Masculino	Direito
39	22	Feminino	Direito
40	13	Feminino	Direito
41	19	Masculino	Direito
42	18	Feminino	Direito
43	18	Feminino	Esquerdo
44	24	Masculino	Esquerdo
45	17	Masculino	Esquerdo
46	22	Feminino	Direito
47	18	Feminino	Esquerdo
48	27	Feminino	Esquerdo
49	18	Feminino	Esquerdo
50	17	Masculino	Esquerdo
51	22	Feminino	Esquerdo
52	24	Feminino	Esquerdo
53	19	Feminino	Direito
54	22	Feminino	Direito
55	18	Feminino	Direito
56	17	Masculino	Esquerdo
57	18	Feminino	Esquerdo
58	30	Masculino	Esquerdo
59	17	Feminino	Direito

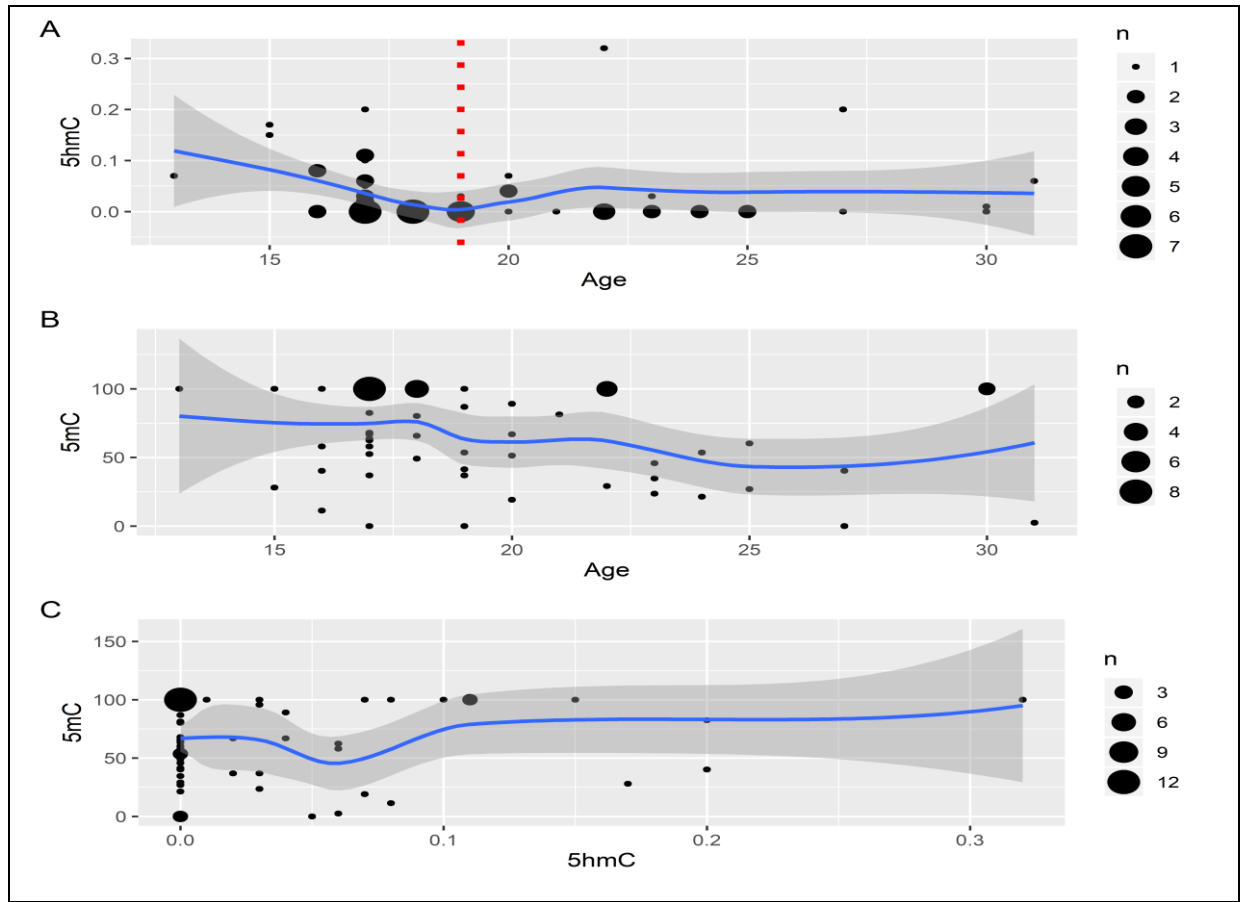
Fonte: De Menezes VCB, 2020.

Todas as amostras de FDs foram obtidas da região posterior de mandíbula após extração dos terceiros molares inclusos. Em relação ao lado, 29 (49,15%) amostras de FD foram extraídas do lado direito, e 30 (50,85%) foram extraídas do lado esquerdo conforme.

7.1.2 Análise da metilação e hidroximetilação global do DNA nos FDs

Os gráficos apresentados indicam a relação entre o conteúdo de 5hmC, 5mC e idade dos indivíduos. Nota-se que a relação entre 5hmC x idade e 5mC x idade não são tipicamente lineares ao longo de todo o tempo, tanto pela disposição dos pontos quanto pela forma da curva em azul que descreve esses pontos. No entanto, uma relação inversamente proporcional foi observada entre o conteúdo de 5hmC e idade até os 19 anos (vide linha vermelha pontilhada, coeficiente de correlação de Spearman = -0.552, $p = 0.0003$, $n = 38$). Não foi observada relação entre o conteúdo de 5hmC e 5mC (FIGURA 4).

Figura 4. Relação entre metilação global do DNA, a hidroximetilação global do DNA e a idade dos indivíduos estimada usando *locally estimated scatterplot smoothing* (linha azul) e intervalo de confiança de 95% em torno de *smooth* (área cinza em torno da linha azul). (A) A relação entre 5hmC e idade não foi linear (presença de pontos de dados esparsos e formato da curva azul). Uma correlação inversa foi observada entre o conteúdo de 5hmC e a idade até 19 anos (linha pontilhada vermelha) (coeficiente de correlação de Spearman = - 0,552, $p=0,0003$, $n=38$). (B) A relação entre 5mC e idade não foi linear (presença de pontos de dados esparsos e formato da curva azul) e nenhuma correlação pode ser testada. (C) Não houve relação entre 5hmC e 5mC. O conteúdo de 5hmC e 5mC é expresso em porcentagem.



Fonte: De Souza RP, 2020.

Considerando os 59 indivíduos das amostras de FD, a média da metilação global da 5hmC das amostras foi de 0,04 com um desvio padrão de 0,06; e a média da metilação global da 5mC foi de 65,82 com um desvio padrão de 33,08 conforme observado na Tabela 2.

Tabela 2 - Descritivas da idade, 5hmC e 5mC de acordo com o sexo, idade e lado da extração das amostras de FDs.

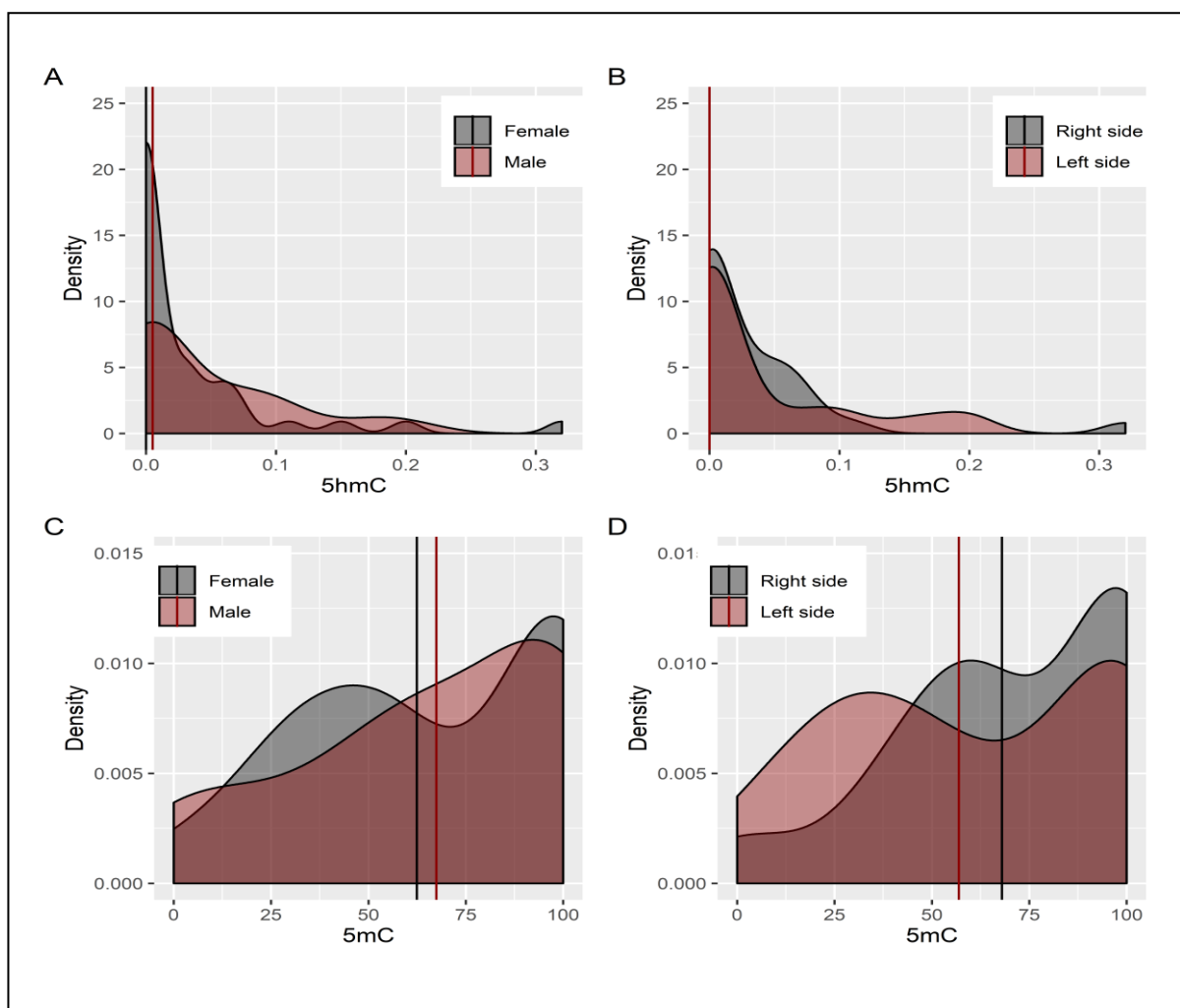
Todos							
variável	n	média	desvio padrão	mediana	min	max	erro padrão
5hmC	59	0.04	0.06	0.00	0.00	0.32	0.01
5mC	59	65.82	33.08	66.89	0.00	100.00	4.31
idade	59	19.56	3.92	18.00	13.00	31.00	0.51
Feminino							
5hmC	39	0.03	0.07	0.00	0.00	0.32	0.01
5mC	39	65.80	32.65	62.44	0.00	100.00	5.23

idade	39	19.56	3.45	19.00	13.00	30.00	0.55
Masculino							
5hmC	20	0.04	0.06	0.00	0.00	0.20	0.01
5mC	20	65.86	34.77	67.44	0.00	100.00	7.77
idade	20	19.55	4.82	17.00	15.00	31.00	1.08
Direito							
5hmC	29	0.03	0.06	0.00	0.00	0.32	0.01
5mC	29	71.32	30.31	68.00	0.00	100.00	5.63
idade	29	19.10	3.85	18.00	13.00	31.00	0.71
Esquerdo							
5hmC	30	0.04	0.06	0.00	0.00	0.20	0.01
5mC	30	60.50	35.24	56.89	0.00	100.00	6.43
idade	30	20.00	4.01	18.50	15.00	30.00	0.73

Fonte: De Siqueira EC, 2020.

Os dados não sugerem que idade ($p = 0.25$), 5hmC ($p = 0.33$) e 5mC ($p = 0.86$) tenham medianas diferentes entre homens e mulheres. Do mesmo modo, as medianas de idade ($p = 0.39$), 5hmC ($p = 0.99$) e 5mC ($p = 0.22$) não diferem entre os lados esquerdo e direito. As distribuições de 5hmC e 5 mC não aparentam ser diferentes por sexo e lado, conforme Figura 5.

Figura 5. Distribuição da metilação global do DNA e hidroximetilação global do DNA entre os sexos e os lados da extração dos dentes impactados/folículos dentários. Linhas verticais representam valores medianos de 5hmC ou 5mC percentuais com base no sexo ou lado da extração. (A) A distribuição de 5hmC não foi diferente de acordo com o sexo (teste de Mann-Whitney, $p=0,33$). (B) A mediana de 5hmC não foi diferente de acordo com o lado da extração dentária (teste de Mann-Whitney, $p=0,99$). As linhas de valor medianas são sobrepostas em a 0. (C) A mediana de 5mC não parece ser diferente de acordo com o sexo (teste de Mann-Whitney, $p=0,86$). (D) A distribuição de 5mC não parece ser diferente de acordo com o lado da extração dentária (teste de Mann-Whitney, $p=0,22$).



7.2 Imunoexpressão da pERK1/2

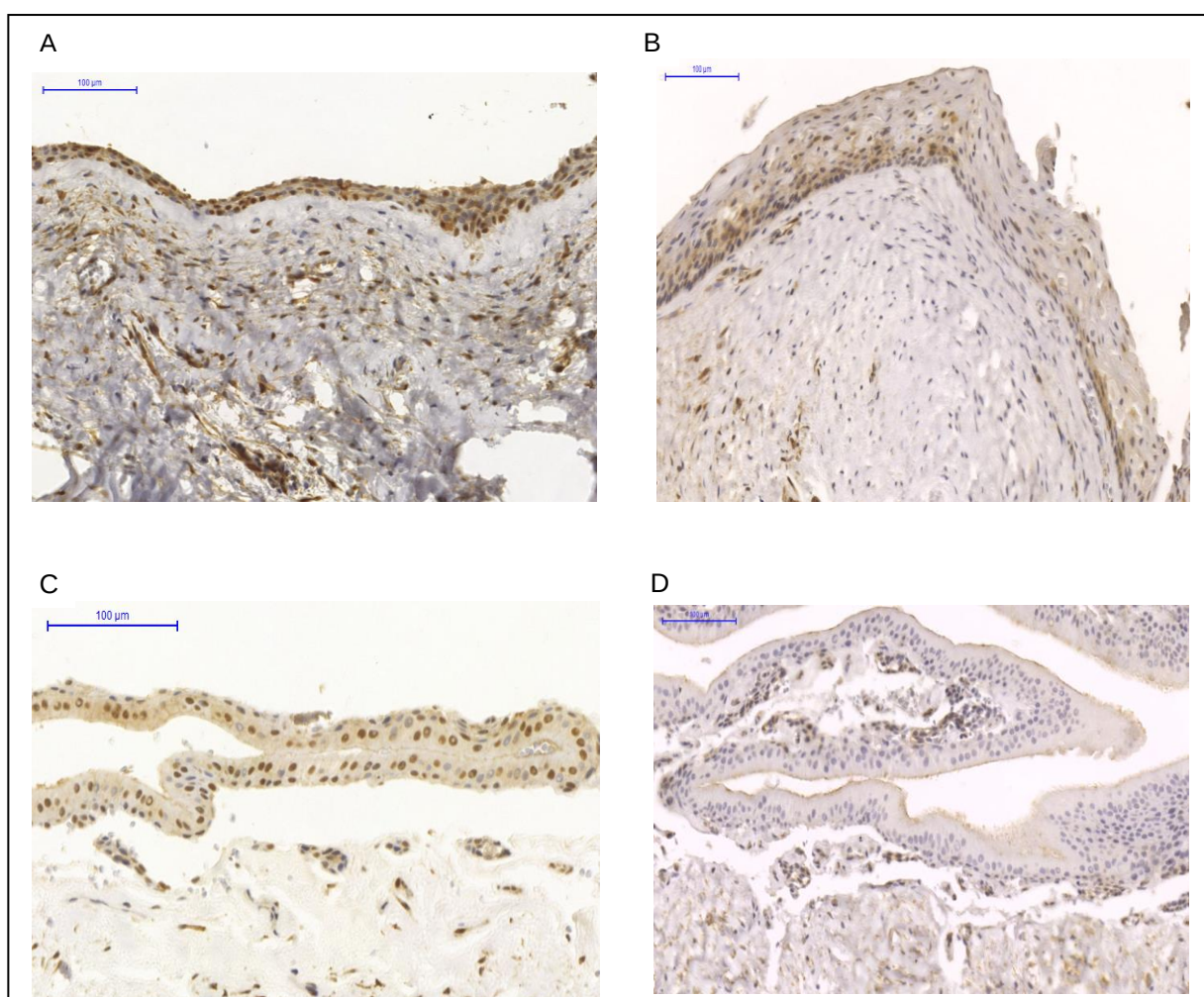
7.2.1 Caracterização da amostra da imunoexpressão de pERK1/2

As características clínicas dos casos em que foi avaliada a imunoexpressão de pERK1/2 eram em sua maioria de mulheres (67,4%), enquanto que 32,6% eram de homens. A mediana de idade dos indivíduos foi de 19,00 anos, variando de 16 a 31 anos.

7.2.2 Análise da expressão imuno-histoquímica de pERK1/2

Os resultados obtidos das amostras de FDs dos indivíduos do estudo da imunoexpressão de pERK 1/2 estão descritas na Tabela 3. Através da avaliação por estimativa visual, 21/46 (46%) das amostras apresentaram menos de 10% de células positivas (incluindo uma amostra negativa), 11/46 (24%) apresentaram entre 10 e 50% de células positivas e 14/46 (30%) apresentaram mais de 50% de células positivas. As amostras de FD apresentaram um padrão variável de marcação nuclear em tecido epitelial e conjuntivo, conforme imagens representativas da marcação imuno-histoquímica de pERK1/2 na Figura 6.

Figura 6. Observa-se a presença de um padrão variável de marcação em tecido epitelial e em tecido conjuntivo, com presença de marcação nuclear intensa (A) ou em um menor percentual de células (B) em áreas de epitélio escamoso. O epitélio reduzido do órgão de esmalte também mostrou padrão variável de imuno-expressão de pERK1/2, exibindo marcação nuclear em uma grande proporção de células (C) ou em áreas focais (D).



Fonte: Gomes CC, 2020.

Não foi observada diferença entre a distribuição das idades quando comparada com a imunomarcacão de pERK1/2 dos três grupos (KW=0,642, df=2, p=0,726). Também não foi identificado diferença quando comparada a mediana das idades entre o grupo de FDs com positividade $\leq 10\%$ com os casos que apresentaram $>10\%$ de marcação (W=227,000, p=0,426).

Tabela 3 - Resultado da imunoexpressão de pERK1/2 por amostra de Folículo Dental.

Amostra	Sexo	Idade	Imunoexpressão pERK 1/2
1	F	19	negativo
2	F	18	< 10%
3	F	20	< 10%
4	F	22	< 10%
5	M	16	< 10%
6	F	17	< 10%
7	F	19	< 10%
8	F	17	< 10%
9	F	30	< 10%
10	F	17	< 10%
11	F	17	< 10%
12	F	24	< 10%
13	M	24	< 10%
14	M	16	< 10%
15	M	17	< 10%
16	F	19	< 10%
17	M	18	< 10%
18	F	17	< 10%
19	M	20	< 10%
20	F	22	< 10%
21	M	17	< 10%
22	F	22	10 - 50%
23	M	16	10 - 50%
24	M	18	10 - 50%
25	F	17	10 - 50%
26	M	27	10 - 50%
27	F	23	10 - 50%
28	F	25	10 - 50%

29	F	27	10 - 50%
30	F	19	10 - 50%
31	F	17	10 - 50%
32	F	15	10 - 50%
33	F	23	> 50%
34	F	25	> 50%
35	F	21	> 50%
36	F	16	> 50%
37	F	17	> 50%
38	F	20	> 50%
39	M	17	> 50%
40	F	17	> 50%
41	M	30	> 50%
42	M	31	> 50%
43	F	17	> 50%
44	M	17	> 50%
45	M	19	> 50%
46	F	22	> 50%

Fonte: Gomes CC, 2020. F: Feminino; M: Masculino. Avaliação por estimativa visual da imunoexpressão de pERK1/2 por amostra de FD. 21 amostras apresentaram menos de 10% de células positivas (incluindo uma amostra negativa), 11 amostras apresentaram entre 10 e 50% de células positivas e 14 apresentaram mais de 50 % de células positivas.

8 DISCUSSÃO

O FD é um tecido formado durante a odontogênese e contribui para a formação do órgão dental (BRKIĆ, 2014). Estudos recentes têm demonstrado que componentes que contribuem para a formação do elemento dental durante a odontogênese são importantes no processo de tumorigênese (DINIZ *et al.*, 2017), sendo essas lesões caracterizadas por semelhanças morfológicas e moleculares com os tecidos dos quais se originam (BALIC A, THESLEFF I, 2015). Ocasionalmente, as células FD, por razões ainda desconhecidas, levam à formação de cistos e tumores, que incluem, entre outros, cistos dentígeros e tumores odontogênicos epiteliais centrais, como ameloblastomas e carcinomas de células escamosas intraósseas (ARAUJO, KOWALSKI, RODRIGUES, ALMEIDA, LOPES-PINTO & ALVES, 2014; BODNER, MANOR; CHRETIEN, CARPENTER, WHITE, HARRAH & LIGHTBODY, 1970; COLBERT, BRENNAN, THEAKER & EVANS, 2012; GARDNER, 1975; GAY-ESCODA, CAMPS-FONT, LÓPEZ-RAMÍREZ & VIDAL-BEL, 2015; GLOSSER & CAMPBELL, 1999; HANKEY & PEDLER, 1957; IDE, SHIMOYAMA, HORIE & KANEKO, 1999; IDE *et al.*, 2008; KRAMER & SCRIBNER, 1965; LEE & LOKE, 1967; ; MANGANARO, CROSS & STARTZELL, 1997; MEADOW, 1966; PANNEERSELVAM, PARAMESWARAN, KAVITHA & PANNEERSELVAM, 2017; REICHART & PHILIPSEN, 2004; SCIUBBA, FANTASIA & KAHN, 2001; SHEAR & VAN DER WAAL, 2011; STEPHENS, KOGON & REID, 1989; WALDRON & MUSTOE, 1989; WILLIAMS & NEWMAN, 1963).

Evidências de transformação patológica dos tecidos DF derivam de relatos de casos de cistos e tumores originários desses tecidos ou de investigações clínico-patológicas observacionais (SATHEESAN, TAMGADGE, TAMGADGE, BHALERAO & PERIERA, 2016). Existe maior incidência de alterações patológicas em indivíduos mais velhos do que em indivíduos mais jovens (BAYKUL *et al.*, 2005), com forte correlação entre a incidência de alteração cística nos tecidos foliculares e a idade (ADELSPERGER *et al.*, 2000). Quanto mais tempo o dente permanece impactado, maior o risco de desenvolvimento de cistos ou tumores (TASCI, 2015).

O envelhecimento representa um dos principais fatores de risco conhecidos para o desenvolvimento de doenças, pois os padrões epigenéticos mudam ao longo

do tempo de vida e podem ser importantes contribuintes para esse processo de envelhecimento (LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF, 2017). Na metilação do DNA, a idade é um fator importante na alteração de seu padrão (KNAPOWKI *et al.*, 2002), e essas alterações estão relacionadas à expressão aberrante ou a silenciamento gênico (SHARMA, *et al.*, 2010) estando esse processo muitas vezes desregulado nas células tumorais (YOO e JONES, 2006), incluindo tumores odontogênicos (MOREIRA *et al.*, 2009a). Além disso, alterações dinâmicas de 5mC e 5hmC podem ser críticas para a regulação da amelogênese (YOSHIOTA, MINAMIZAKI & YOSHIKO, 2015).

Neste estudo os padrões globais de metilação e hidroximetilação do DNA foram avaliados no FD associado a terceiros molares impactados. A metilação global do DNA (porcentagem de 5mC) e a hidroximetilação global do DNA (porcentagem de 5hmC) e a correlação entre os valores de ambos com a idade foram testadas, a fim de buscar mudanças nesse padrão durante o envelhecimento. Os resultados mostraram que o percentual de 5hmC no FD tende a diminuir linearmente com o envelhecimento até os 19 anos.

Esse declínio de 5hmC com o aumento da idade corresponde a um fenômeno estabelecido de hipometilação global associada à idade, previamente observado em humanos (BUSCARLET, TESSIER, PROVOST, MOLLICA & BUSQUE, 2016; TORAÑO *et al.*, 2016; XIONG *et al.*, 2015), e também em camundongos (KOCHMANSKI *et al.*, 2018). Outros, no entanto, observaram uma correlação positiva entre a idade e os níveis de 5hmC no sangue de pacientes saudáveis (JIANG *et al.*, 2017).

A hipometilação global desencadeia a instabilidade cromossômica, permitindo a ocorrência de mutações mais facilmente e a superexpressão de proto-oncogenes (BURZYNSKI, 2005). Essa discrepância pode ser devido a vários fatores que influenciam a metilação, mas provavelmente reflete o conteúdo global altamente variável do conteúdo de 5hmC em diferentes tecidos e linhagens de células humanas normais relatados anteriormente (KRIAUCIONIS & HEINTZ, 2009; NESTOR *et al.*, 2012). Notavelmente, altos níveis de 5hmC são observados no cérebro (KRIAUCIONIS & HEINTZ, 2009). É importante notar que a hidroximetilação do DNA representa uma marca forte e reproduzível da idade cronológica (XIONG *et al.*, 2015). No FD, parece que a diminuição da hidroximetilação global do DNA com a idade também é um fenômeno notável, no entanto, suas implicações biológicas

ainda precisam ser esclarecidas. Apesar de a distribuição celular da 5hmC ainda não estar bem documentada, Haffner *et al.* (2011) verificaram uma profunda redução do conteúdo de 5hmC em tumores da próstata, mama e cólon, sugerindo que a perda dessa base está associada à carcinogênese.

Com o aumento da idade há uma diminuição global progressiva na hidroximetilação, sendo a redução de 5hmC muito maior que a de 5mC (BUSCARLET *et al.*, 2016). Tahiliani *et al.* (2009) relatam que em células embrionárias os níveis de 5hmC vão diminuindo ao longo da diferenciação. Em relação à metilação global do DNA, uma redução nos níveis globais de 5mC desde o nascimento até a velhice foi relatada anteriormente (BUSCARLET, TESSIER, PROVOST, MOLLICA & BUSQUE, 2016). Issa JP (2003) descreve que células e tecidos normais em envelhecimento mostram perda progressiva do conteúdo de 5mC, principalmente em sequências repetidas de DNA, mas também em áreas potenciais reguladoras de genes. Esse declínio é um fenômeno bem estabelecido de hipometilação global associada à idade, anteriormente observada em seres humanos (GONZALO, 2010).

Em contrapartida Chen *et al.* (2012) examinaram os níveis globais de 5hmC no hipocampo de camundogos, e detectaram um ganho de 5hmC durante o envelhecimento, sugerindo que o 5hmc poderia atuar como marcador epigenético e não apenas como intermediário da desmetilação do DNA.

A metilação e hidroximetilação globais do DNA não se correlacionaram em nosso estudo. Tal resultado está de acordo com estudos anteriores que também não observaram correlação de 5mC e 5hmC no sangue e tecidos normais (NESTOR *et al.*, 2012; GODDERIS *et al.*, 2015). Na comparação entre sexo (feminino e masculino) e porcentagem de 5hmC ou 5mC, não houve diferença. Semelhante, outros pesquisadores não detectaram nenhuma diferença de 5hmC e 5mC em relação ao sexo em células humanas, sangue ou saliva de voluntários saudáveis (GODDERIS *et al.*, 2015; WEBER *et al.*, 2005).

A hidroximetilação e a metilação globais do DNA no FD não foram investigadas anteriormente. Além das alterações globais de metilação e hidroximetilação do DNA durante o envelhecimento, a hipermetilação específica de genes pode levar ao silenciamento de vários genes, incluindo os responsáveis pelo controle do ciclo celular (BURZYNSKI, 2005). Além de estudos que investigaram a metilação do DNA em genes-alvo em tumores odontogênicos (MOREIRA *et al.*,

2009b; GOMES *et al.*, 2010; COSTA *et al.*, 2017), poucos estudos avaliaram o padrão específico de metilação do DNA dos genes no FD (Al *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2018; GOPINATHAN, KOLOKYTHAS, LUAN & DIEKWISCH, 2013; MOREIRA *et al.*, 2009a).

A metilação do DNA é um dos mecanismos epigenéticos mais bem elucidados e entendidos (SMITH e MEISSNER, 2013), porém há escassez de dados no que se refere ao perfil de metilação do DNA em FDs. Portanto a metilação do DNA pode representar um passo fundamental no caminho pelo qual o tecido normal sofre transformação em tumor (COSTA *et al.*, 2017), e o 5hmC pode ter um papel influente na desmetilação do DNA durante o envelhecimento (TORANO *et al.*, 2016).

Além de os padrões epigenéticos do DNA sofrerem alterações durante o envelhecimento, vias de sinalização celular também podem sofrer alterações com o envelhecimento cronológico do indivíduo. As vias de sinalização MAPK/ERK regulam atividades celulares de crescimento, proliferação, diferenciação, sobrevivência, desenvolvimento e aprendizado (DHILLON *et al.*, 2007, SHAUL YD e SEGER R, 2007, XIA *et al.*, 1995) e quando desregulada podem induzir a progressão de várias doenças (PLOTNIKOV *et al.*, 2011). Em tecidos normais como no sistema nervoso central, ERK1/2 participam ativamente do desenvolvimento e plasticidade neuronais (ORBAN *et al.*, 1999; SWEATT, 2001), contribuem para a plasticidade do sistema visual (NASKA *et al.*, 2004), além de atuarem na ativação de muitos tipos celulares como linfócito T (GORGAS *et al.*, 1996). Em contra partida, Pereira *et al.* (2019) encontraram granulomas piogênicos orais com ativação da via de sinalização MAPK/ERK, ocorrendo independentemente das mutações *BRAF*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *GNA11* e *GNA14*. Nickolaychuk *et al.* (2002) encontraram pERK1/2 em cisto dentígero, cisto radicular e FDs, tanto no núcleo quanto no citoplasma. Nesse mesmo estudo seus resultados indicam que o ERK1 e sua forma fosforilada, pERK1/2, são expressos em tecidos epiteliais de origem odontogênica.

Em nosso estudo observamos ativação da via MAPK/ERK em amostras de FDs, 21/46 (46%) das amostras apresentaram menos de 10% de células positivas (incluindo uma amostra negativa), 11/46 (24%) apresentaram entre 10 e 50% de células positivas e 14/46 (30%) apresentaram mais de 50 % de células positivas. Gorgas *et al.* (1996) relatam que em camundongos a atividade ERK desses linfócitos T podem ter um declínio com o aumento da idade. Hutter *et al.* (2000) descrevem que em hepatócitos de ratos idosos a atividade ERK está reduzida se comparados a

hepatócitos de ratos jovens. Em humanos, células T mostraram atividades da ERK diminuídas durante o envelhecimento (BEIGING *et al.*, 1997).

Nos nossos resultados não foi observada diferença entre a distribuição das idades quando comparada com a imunomarcação de pERK1/2. Estudos adicionais são importantes para entender a ativação da via pERK1/2 em FDs durante seu envelhecimento.

9 CONCLUSÃO

Os resultados mostraram que o percentual de 5hmC tende a diminuir com o aumento da idade, sendo observada uma correlação inversa entre a hidroximetilação do DNA e a idade (até os 19 anos). Essa diminuição dependente da idade nos níveis de 5hmC observada não foi acompanhada de alterações nos níveis de 5mC. Estudos adicionais são necessários para determinar o significado biológico da redução da hidroximetilação global do DNA com a idade no FD.

O estudo do padrão de imunoexpressão de ERK1/2 fosforilada mostrou um padrão variável de imunoexpressão desta proteína, e diferenças não foram observadas na distribuição da idade de acordo com o padrão de pERK1/2.

Nosso estudo sugere que os FDs passam por um estado de hipometilação global do DNA com o aumento da idade cronológica do indivíduo, de forma semelhante ao que ocorre em outros tecidos normais. Além disso, sugerem que a expressão da forma fosforilada de pERK1/2, um marcador de ativação da via de sinalização celular MAPK/ERK, ocorre nas células dos FDs de forma independente da idade dos indivíduos.

REFERÊNCIAS

AAPOLA, U.; KAWASAKI, K.; SCOTT, H.S., et al. Isolation and initial characterization of a novel zinc finger gene, DNMT3L, on 21q22.3, related to the cytosine-5-methyltransferase 3 gene family Genomics. **Cytogenet Cell Genet.**, p. 65293–298, 2000.

AAPOLA U, LYLE R, KROHN K, ANTONARAKIS SE, PETERSON P. Isolation and initial characterization of the mouse Dnmt3l gene. **Cytogenet Cell Genet.**, 92, p.122–126, 2001.

ADCOCK IA, TSAPROUNI L, BHAVSAR P, ITO K. Epigenetic regulation of airway inflammation. **Curr Opin Immunol.**, 19, p. 694-700, 2007.

ADELSPERGER et al . Early soft tissue pathosis associated with impacted third molars without pericoronal radiolucency. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, 89, p.402-6, 2000.

ADINA-SIMONA COȘARCĂ et al. The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors Rom **J Morphol Embryol.**, v.57, n.2, p.407–412, 2016.

AYRANCI F, OMEZLI MM, SIVRIKAYA EC, RASTGELDI ZO. Prevalence of Impacted Wisdom Teeth in Middle Black Sea Population. **J Clin Exp Invest.**, v.8, n.2, p.50-3, 2017.

Al-ZOUBI *et al.* Frequency and types of canine impactions. A retrospective radiographic study using orthopantomograms. **European Journal of Dentistry**, v.11, n.1, Jan.-Mar. 2017.

AI, T., ZHANG, J., WANG, X., ZHENG, X., QIN, X., ZHANG, Q., ... CHEN, F. DNA methylation profile is associated with the osteogenic potential of three distinct human odontogenic stem cells. **Signal Transduct Target Ther**, 12,1, 2018.

ARAÚJO, J. P., KOWALSKI, L. P., RODRIGUES, M. L., DE ALMEIDA, O. P., LOPES PINTO, C. A., & ALVES, F. A. Malignant Transformation of an Odontogenic Cyst in a Period of 10 Years. **Case Reports in Dentistry.**, p. 1–5, 2014.

ARANTES, L. M. et al. Methylation as a biomarker for head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 50, n. 6, p. 587-92, Jun 2014.

ATTWOOD JT, YUNG RL, RICHARDSON BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. **Cellular and Molecular Life Sciences**., v.59, n.2, p.241-57, Fev. 2002.

AZEVEDO et al.. Análise histológica e radiográfica de folículos pericoronários de terceiros molares não irrompidos. **R. Ci. méd. biol.**, v.8, n.2, p.132-141, Mai.-Ago 2009.

BARRETO et al.. Pericoronal space mensurement in lower third molars. **Brazilian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.6, n.3, p. 57 - 62, Jul./Set. 2006.

BASTOS et al., Bringing benign ectomesenchymal odontogenic tumours to the lab: an in vitro study using an organotypic culture model. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.48, p. 174-179, 2019.

BAYKUL et al. Incidence of cystic changes in radiographically normal impacted lower third molar follicles. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, p.542-545, 2005.

BALIC A., THESLEFF IPN. Tissue interactions regulating tooth development and renewal. **Current Topics in Developmental Biology**.,157-186, 2015.

BELL JT, PAI AA, PICKRELL JK, GAFFNEY DJ, PIQUE-REGI R, DEGNER JF, GILAD Y, PRITCHARD JK. DNA methylation patterns associate with genetic and gene expression variation in HapMap cell lines. **Genome Biol.**, v.12, n.6, p. 405, 2011.

L. BEIQING KW, CARLE, R.L. WHISLER. Reductions in the activation of ERK and JNK are associated with decreased IL-2 production in T cells from elderly humans stimulated by the TCR/CD3 complex and co-stimulatory signals. **Cell Immunol.**, v.182, p. 79-88, 1997.

BOLAT, I., KEKLIKOGU, N.. Immunoreactivity of AFT-2 and Fra-2 in human dental follicle. **Folia Histochemica et cytobiologica**, v.48, n. 2, p. 197-201, 2010.

BODNER, L., MANOR, E., SHEAR, M., & VAN DER WAAL I. (2011) Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in an odontogenic cyst: a

clinicopathologic analysis of 116 reported cases. **J Oral Pathol Med**, 40(10), 733-738.

BLOKZIJL, F., DE LIGT, J., JAGER, M., SASSELLI, V., ROERINK, S., SASAKI, N., VAN BOXTEL, R. Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. **Nature**, v. 538, n.7624, p.260–264, 2016.

BRANDSTETTER, L.R.G. Perfil da ativação das MAP quinases ERK 1/2 no intestino delgado de Equinos submetidos à isquemia e reperfusão. 2006. **Tese (Mestrado) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Goiás**, Goiânia, 2006.

BREITLIG LP, YANG R, BERNHARD K, BURWINKEL B, BRENNER H. Tobacco-smoking-related differential DNA methylation: 27k discovery and replication. **The americ. J Human Gen.**, v. 88, p.450-457, Abril, 2011.

BROWN et al. Activating FGFR2–RAS–BRAF Mutations in Ameloblastoma. **Clin Cancer Res.**, v. 20, n.21, Nov. 2014.

BROOKES E, SHI Y. Diverse epigenetic mechanisms of human disease. **Annu Rev Genet.**, v.48, p. 237-68, 2014.

BRKIC, A. Dental Follicle: Role in development of odontogenic cysts and tumours. **The journal of the Dental Faculty of Istanbul.**, v.48, n.1, p.89-96, April, 2014.

BUSCARLET et al. Human blood cell levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmc) decline with age, partly related to acquired mutations in *TET2*. **Experimental Hematology.**, v.44, p. 1072-1084, 2016.

CANTWELL-DORRIS ER, O'LEARY JJ, SHEILS OM. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. **Review. Mol Cancer Ther.**, v.10, n.3, p.385-94, 2011.

CABBAR, F. et al. Determination of potential cellular proliferation in the odontogenic epithelia of the dental follicle of the asymptomatic impacted third molars. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 10, p. 2004-11, Oct 2008.

CICCARONE, F., TAGLIATESTA, S., CAIAFA, P., & ZAMPIERI, M. DNA methylation dynamics in aging: how far are we from understanding the mechanisms? **Mechanisms of Ageing and Development.**, V.174, p.3–17, 2018.

CHUNG ET AL . Decreased Extracellular-Signal-Regulated Kinase and Increased Stress-Activated MAP Kinase Activities in Aged Human Skin In Vivo. **The Journal of Investigative Dermatology.**, v. 115, n. 2 august 2000.

COLBERT *et al.*. Squamous cell carcinoma arising in dentigerous cysts. **Journal of Cranio-Maxillo-Facial Surgery.**, v.40, p. 355-357, 2012.

COȘARCĂ, A. S. et al. The evaluation of Ki67, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of the dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. **Rom J Morphol Embryol.**, v.57, n. 2, p. 407-12, 2016.

COSTA SF, PEREIRA NB, ALVES KM, CAMPOS K, DE CASTRO WH, DINIZ MG, GOMES CC, GOMEZ RS. DNA methylation pattern of apoptosis-related genes in ameloblastoma. **Oral Diseases**, v. 23, p. 779-783, 2017.

COSTELLO JF, PLASS C. Methylation matters. **J Med Genet.**, v.38, n.5, p.285-303, Maio. 2001.

COBOURNE et al. The genetic control of early odontogenesis **British Journal of Orthodontics.**, v. 26, p.21-28, 1999.

COURA *et al.* . Modern Pathology. KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. **Modern Pathology**, v. 32, p. 799-806, 2019.

CHRETIEN, P.B., CARPENTER, D.F., WHITE, N.S., HARRAH, J.D., & LIGHTBODY, P.M. Squamous carcinoma arising in a dentigerous cyst. Presentation of a fatal case and review of four previously reported cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 30(6), 809-816, 1970.

CRIDER K, YANG TP, BERRY RJ, BAILLEY LB. Folate and DNA Methylation: A Review of molecular mechanisms and the evidence for folate's role. **Advances in Nutrition**, v. 3, n.1, p. 21-38, 2012.

CHRISTENSEN BC, HOUSEMAN, E. A., MARSIT, C. J., ZHENG, S., WRENSCH, M. R., WIEMELS, J. L., KELSEY, K. T. Aging and Environmental Exposures Alter Tissue-Specific DNA Methylation Dependent upon CpG Island Context. **PLoS Genetics**, v.5, n.8. 2009.

DANIELI M, TOLLEFSBOL TO. Epigenetic linkage of aging, cancer and nutrition. **J Exp Biol.**, v.1, n. 218, p. 59-70, Jan. 2015.

DAVIES, H., BIGNELL, G. R., COX, C., STEPHENS, P., EDKINS, S., CLEGG, S, BOTTOMLEY, W. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature.** p. 949–954. 2002.

DE OLIVEIRA, M. G. et al. Odontogenic epithelium: immunolabeling of Ki-67, EGFR and survivin in pericoronal follicles, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. **Head Neck Pathol.**, v. 5, n. 1, p. 1-7, Mar 2011.

DHILLON et al . MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene.**, v.26, p. 3279–3290, 2007.

DINIZ, M. G., GOMES, C. C., GUIMARÃES, B. V. A., CASTRO, W. H., LACERDA, J. C. T., CARDOSO, S. V., GOMEZ, R. S. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. **Tumor Biology.**, v.36, n.7, p. 5649–5653. 2017.

DINIZ *et al.* . Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. **Oral Oncology**, v.72, p.165–173. 2017.

DONG *et al.* DNA methylation as an early diagnostic marker of cancer. **Biomedical Reports**, v.2, p.326-330, 2014.

DOROTHEOU, D. et al. Tooth eruption: altered gene expression in the dental follicle of patients with cleidocranial dysplasia. **Orthod Craniofac Res.**, v. 16, n. 1, p. 20-7, Feb 2013.

DUTRA, ROJAS, MODOLO et al. Incidence of the soft tissue changes around unerupted or impacted third molars. **Rev Odontol UNESP**, v. 44, n.1, p. Jan.-Feb 18-23. Jan.-Feb. 2015.

DUNN KL, ESPINO, PS, DROBIC B, HE S., & DAVIE, JR. The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n.1, p. 1–14, 2005.

DUPONT C, ARMANT DR, BRENNER CA. Epigenetics: Definition, Mechanisms and Clinical Perspective. **Semin Reprod Med.**, v.27, n.5, p. 351–357, 2009.

EDAMATSU et al. Apoptosis-related factors in the epithelial components of dental follicles and dentigerous cysts associated with impacted third molars of the mandible. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v.99, p. 17-23, 2005.

EKSTROM AM, HELD M, HANSSON LE, ENGSTRAND L, NREN O. Helicobacter pylori in gastric cancer established by CagA immunoblot as a marker of past infection. **Gastroenterology**, v.121:784–9, 2001.

ESPADA J. Non-catalytic functions of DNMT1. **Epigenetics**. v. 7, p. 115– 118, 2012.

FARAH CS, NW SAVAGE. Pericoronal radiolucencies and the significance of early detection. **Australian Dental Journal**, v.47, n.3, p. 262-265, 2012.

FRATTINI M, FERRARIO C, BRESSAN P, et al. Alternative mutations of BRAF, RET and NTRK1 are associated with similar but distinct gene expression patterns in papillary thyroid cancer. **Oncogene**, v.23, p. 7436-40, 2004.

FREGNANI et al. BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. **Histopathology**, v. 70, p.473–484, 2017.

GARDNER, A.F. (1975). A survey of odontogenic cysts and their relationship to squamous cell carcinoma. **Dent J**, 41(3), 161-167.

GARNETT MJ, MARAIS R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene. **Cancer Cell**, v. 6, p. 313-319, 2004.

GIBNEY ER, NOLAN CM. Epigenetics and gene expression. **Heredity**., v.105, p. 4–13, 2010.

GODDERIS, L., SCHOUTEDEN, C., TABISH, A., POELS, K., HOET, P., BACCARELLI, A.A., & VAN LANDUYT, K. Global Methylation and Hydroxymethylation in DNA from Blood and Saliva in Healthy Volunteers. **Biomed Res Int**, 845041, 2015.

GOLL MG, BESTOR TH. Eukaryotic cytosine methyltransferases. **Annu Rev Biochem.**, v. 74, p. 481–514, 2005.

GOMES C.C, DINIZ M.G, DE MENEZES G.H, CASTRO W.H, GOMEZ R.S. BRAFV600E mutation in melanotic neuroectodermal tumor of infancy: toward personalized medicine? **Pediatrics**, v. 136, p. 267–269, 2015.

GOMES, C. C., DE SOUSA, S. F., DE MENEZES, G. H. F., DUARTE, A. P., PEREIRA, T. DOS S. F., MOREIRA, R. G., GOMEZ, R. S. Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. **Oral Oncology**, v. 56, p. 3–5, 2016.

GONZALO, S. Epigenetic alterations in aging. **Journal of applied physiology** (1985), 109(2), 586-597, 2010.

GOPINATHAN, G., KOLOKYTHAS, A., LUAN, X., & DIEKWISCH, T.G. Epigenetic marks define the lineage and differentiation potential of two distinct neural crest-derived intermediate odontogenic progenitor populations. **Stem Cells Dev**, 22(2), 1763-1778, 2013.

GORGAS G, BUTCH ER, GUAN KL, MILLER RA. Diminished activation of the MAP Kinase pathway in CD-3-stimulated T lymphocytes from old mice. **Mechanisms of Ageing AND Development.**, v.94, n1., p 71-83, 1996.

GUILLER N et al. Ki-67 and MCM-2 in Dental Follicle and Odontogenic Cysts: The Effects of Inflammation on Proliferative Markers. **The Scientific World Journal.**, p. 8, 2012.

GLOSSER, JW, & CAMPBELL, JH Pathologic change in soft tissues associated with radiographically “normal” third molar impactions. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.37, n.4, p. 259–260, 1999.

HANKEY, G.T., & PEDLER, J.A. Primary squamous-cell carcinoma of mandible arising from epithelial lining of dental cyst. **Proc R Soc Med**, 50(9), 680-681, 1957.

HAFFNER, M. C., CHAUX, A., MEEKER, A. K., ESOP, D. M., GERBER, J., PELLAKURU, L., G., et al, Global 5-hydroxymethylcytosine content is significantly reduced in tissue stem/progenitor cell compartments and in human cancers, **Oncotarget.**,v.2, n.8, p. 627-637, 2011.

HATTAB FN, ALHAIJA ES. Radiographic evaluation of mandibular third molar eruption space. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 88, n.3, p.285-291, sep. 1999.

HANDKIEWICZ-JUNAK D, CZARNIECKA A, JARZAB B. Molecular prognostic markers in papillary and follicular thyroid cancer: Current status and future directions. **Mol Cell Endocrinol.**, v.322, n.1. p.8-28, 2010.

HAGHANIFAR, S. et al. Can the Follicle-Crown Ratio of the Impacted Third Molars be a Reliable Indicator of Pathologic Problem? **J Dent (Shiraz)**, v. 15, n. 4, p. 187-91, Dec 2014.

HANDEL, A. E.; EBERS, G. C.; RAMAGOPALAN, S. V. Epigenetics: molecular mechanisms and implications for disease. **Trends Mol Med.**, v. 16, n. 1, p. 7-16, Jan 2010.

HEIKINHEIMO, K., KURPPA, K. J., & ELENIOUS, K. Novel Targets for the Treatment of Ameloblastoma. **Journal of Dental Research.**, v.94, n.2, 237–240, 2019.

HERVOUET E, CHERAY M, VALLETTE FM, CARTRON PF. DNA methylation and apoptosis resistance in cancer cells. **Cells.**, v.2, n.3, p. 545-573, 2013.

HERMANN A, GOWHER H, JELTSCH A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. **Cell Mol Life Sci.**,v. 61, n.19- 20 p. 2571-2587, Oct. 2004.

HUTTER D, YO Y, CHEN W, LIU P, HOLBROOK NJ, ROTH GS, LIU Y. Age-related decline in Ras/ERK Mitogen-activated protein kinase cascade is linked to a reduced association between Sch and EGF receptor. **The journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v.55, n. 3, p. 125-134, 2000.

IDE, F., MISHIMA, K., YAMADA, H., HORIE, N., SAITO, I., SHIMOYAMA, T., & KUSAMA, K. Unsuspected small ameloblastoma in the alveolar bone: a collaborative study of 14 cases with discussion of their cellular sources. **J Oral Pathol Med.**, 37(4), 221-227, 2008.

IDE, F., SHIMOYAMA, T., HORIE, N., & KANEKO, T. Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin from reduced enamel epithelium. **J Oral Pathol Med.**, 28(9), 420-422, 1999.

ISSA JP. Age-related epigenetic changes and the immune system. **Clinical Immunology.**, v.109, p.103–108, 2003.

JAENISCH & BIRD. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome integrates intrinsic and environmental signals. **Nature Genetics Supplement.**, v.33, march 2003.

JARELL AD, LAWRENCE D, TSAO H. The Ras/mitogen active protein (MAP) Kianse pathway in melanoma biology and therapeutics. **Biologics.**, v.1, n.4, p. 407-414, Dec. 2007.

JIANG, T., ZONG, L., ZHOU, L., HOU, Y., ZHANG, L., ZHENG, X., ... ZHAO, C. Variation in global DNA hydroxymethylation with age associated with schizophrenia. **Psychiatry Res.**, 257, 497-500, 2017.

JONES PA. An epigenetic approach for finding tumor suppressors. **Cell Cycle.**, v.2, n.1, p. 25-26, Fev 2003.

KNAPOWSKI, J., WIECZOROWSKA-TOBIS, K. and WITOWSKI, J. Pathophysiology of ageing. **Journal Physiology and Pharmacology**, v.53, p.135-146, 2002.

KIM, EK., & CHOI, E. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v.1802, n.4, p. 396–405, 2010.

KIM J, ELLIS GL. Dental follicular tissue: Misinterpretation as odontogenic tumors. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 51, p. 762–767, 1993.

KHOJASTE, A. et al. Hypermethylation of p16 tumor-suppressor gene in ameloblastic carcinoma, ameloblastoma, and dental follicles. **J Oral Maxillofac Surg.**, v. 71, n. 1, p. 62-5, Jan 2013.

KLOSE R, BIRD A. Genomic DNA methylation: the mark and its mediators. **Trends Biochem Sci.**, v. 31, n.2, p.89-97. Fev 2006.

KUMAMOTO et al. K-Ras gene status and expression of Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling molecules in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med.**,v. 33, p. 360–367, 2004.

KUCUKKOLBASI, H.; ESEN, A.; ERINANC, O. H. Immunohistochemical analysis of Ki-67 in dental follicle of asymptomatic impacted third molars. **J Oral Maxillofac Pathol.**, v. 18, n. 2, p. 189-93, May 2014.

KURPPA *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma **J Pathol.**, v. 232, p. 492–498, 2014.

KNAPOWSKI J., WIECZOROWSKA-TOBIS, K. and WITOWSKI J. Pathophysiology of 721 ageing. **J Physiol Pharmacol.**, v. 53, p. 135-146, 2002.

KOCHMANSKI, J., MARCHLEWICZ, E.H., CAVALCANTE, R.G., SARTOR, M.A., & DOLINOY, D.C. Age-related epigenome-wide DNA methylation and hydroxymethylation in longitudinal mouse blood. **Epigenetics**, 13(7), 779-792, 2018.

KRAMER, H.S., & SCRIBNER, J.H. Squamous-cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 19, 555-561, 1965.

KRIAUCIONIS S, HEINTZ N. The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinie neurons and the brain. **Science**, v. 324, n.5929, p. 929-30, 2009.

LEE, K.W., & LOKE, S.J. Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. **Cancer**, 20(12), 2241-2244, 1967.

LI H, RAUCH T, CHEN ZX, SZABÓ PE, RIGGS AD, PFEIFER GP. The histone methyltransferase SETDB1 and the DNA methyltransferase DNMT3A interact directly and localize to promoters silenced in cancer cells. **J Biol Chem.**, v.281, n.28, p.19489-500, Jul 2006.

LI, Q., GUO, Y., YAO, M., LI, J., CHEN, Y., LIU, Q., ... FENG, Y. Methylation of Cdkn1c may be involved in the regulation of tooth development through cell cycle inhibition. **J Mol Histol**, 49(5), 459-469, 2018.

LI W. e LIU M. Distribution of 5-Hydroxymethylcytosine in Different Human Tissues. **Journal of Nucleic Acids**, p. 1–5, 2011.

LIU, KZ GUYTON M. GOROSPE, *et al.* Age-related decline in mitogen-activated protein kinase activity in epidermal growth factor-stimulated rat hepatocytes **J Biol Chem.**, v.271, n.7, p. 3604-3607, 1996.

LOPEZ NJ, SMITH PC, GUTIERREZ J. Periodontal therapy may reduce the risk of preterm low birth weight in women with periodontal disease: a randomized controlled trial. **Journal of Periodontology**, v. 73, n.8, p.911-924, 2002.

LOPEZ V, FERNÁNDEZ AF, FRAGA MF. The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases. **Ageing Research Reviews**, v.37, p. 28-38, 2017.

McCAIM J. The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. **P T.**, v. 38, n.2, p. 96-108, Feb. 2013.

MANSOUR SJ, MATTEN WT, HERMAN AS, CANDIA JM, RONG S, FUAKSAMA K, VANDE WOUDE GF, AHN NG. Transformation of mammalian cells by constitutively active MAP kinase kinase. **Science**, Stanford, v.265, n 5174, p. 966-970, 1994.

MEADOW, S.R. Malignant change in a dental cyst. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 21(3), 282-285, 1966.

MILLER CS, BEAN LR. Pericoronal radiolucencies with and without radiopacities **Dent Clin North Am.**, v. 38, n.1, p. 51-61, Jan. 1994.

MIREMADI A, OESTERGAARD MZ, PHAROAH PD, CALDAS C. Cancer genetics of epigenetic genes. **Hum Mol Genet.**, v. 16, p. 28–49, 2007.

MOSS TJ, WALLRATH LL. Connections between epigenetic gene silencing and human disease. **Mutation Research**, v.618, p. 163-174, 2007.

MATSUMOTO et al. Expression of cell cycle regulatory proteins in epithelial components of dental follicles . **J Mol Hist.**, v. 37, p.127–131, p.2006.

MAEGAWA S, HINKAL G, KIM HS, SHEN L, ZHANG L, ZHANG J, et al. Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. **Genome Res.**, v. 20, n.3, p.332– 340, 2010.

MANGANARO, A.M., CROSS, S.E., & STARTZELL, J.M. Carcinoma arising in a dentigerous cyst with neck metastasis. **Head Neck**, 19(5), 436-439, 1997.

MCCAIN. THE MAPK (ERK) Pathway. Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. **P T.**, v. 38, n.2, p.96-108, Feb. 2013.

M. ROTHOVA´ et al. Fate map of the dental mesenchyme: Dynamic development of the dental papilla and follicle. **Developmental Biology**, v.366 p. 244–254, 2012.

MELETI, M.; VAN DER WAAL, I. Clinicopathological evaluation of 164 dental follicles and dentigerous cysts with emphasis on the presence of odontogenic epithelium in the connective tissue. The hypothesis of "focal ameloblastoma". **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** v. 18, n. 1, p. 60-64, Jan 2013.

MENDONÇA *et al.* Distribution of 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine in bovine fetal tissue of the placenta. **Pesq. Vet. Bras.**, v.38, n.10, p. 2012-2018, Out 2018.

MEHROTRA V., DAVID MA. Pathologic changes in dental follicle associated with third molar impactions-a study. **Pakistan Oral & Dental Journal**. v.30, n. 2, 2010.

MELLO-PALMA et al. Study of Pathological Changes in the Dental Follicle of Disease- Free Impacted Third Molars . **J. Maxillofac. Oral Surg.**, v.17, n.4, p.611–615, Oct-Dec. 2018.

MELLO, F. W., MELO, G., KAMMER, P. V., SPEIGHT, P., & CORREA RIVERO, E. R. Prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 47, n.6, p. 996-1002, Jun 2019.

MOREIRA, P. R. et AL(a). Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 1, p. 99-103, Jan 2009.

MOREIRA, P. R. et al (b). Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. **Arch Oral Biol.**, v. 54, n. 10, p. 893-7, Oct 2009.

MOREIRA, P. R. et al (c). Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. **Braz Dent J.**, v. 22, n. 5, p. 422-7, 2011.

MORGAN A E, DAVIES T J, & Mc AULEY M T. The role of DNA methylation in ageing and cancer. **Proceedings of the Nutrition Society.**, p.1–11, 2018.

NARLIKAR, GJ, FAN, HY, & KINGSTON, RE. Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. **Cell.**, v.108, n.4, 475–487, 2002.

NICKOLAYCHUK et al. Evidence for a role of mitogen-activated protein kinases in proliferating and differentiating odontogenic epithelia of inflammatory and developmental cysts. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.**, v. 93, p.720-729, 2002.

NASKA S, CENNI MC, MENNA E, MAFFEI L. ERK signaling is required for eye-specific retino-geniculate segregation. **Development**, v 131. P. 3559-70. 2004.

NESTOR, C.E., OTTAVIANO, R., REDDINGTON, J., SPROUL, D., REINHARDT, D., DUNICAN, ... MEEHAN, R.R. Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. **Genome Res.**, 22(3), 467-477, 2012. doi:10.1101/gr.126417.111

NUCERA C, GOLDFARB M, HODIN R, PARANGI S. Role of B-Raf(V600E) in differentiated thyroid cancer and preclinical validation of compounds against B-Raf(V600E). **Biochim Biophys Acta**, v.1795, p.152-161, 2009.

OKANO M, TAKEBAYASHI S, OKUMURA K, LI E. Assignment of cytosine-5 DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b to mouse chromosome bands 12A2-A3 and 2H1 by in situ hybridization. **Cytogenet Cell Genet.**, v. 86, n.3-4, p. 333-410, 1999.

OLIVEIRA NF, DAMM GR, ANDIA DC, SALMON C, NOCITI FH JR, LINE SR, DE SOUZA AP. DNA methylation status of the IL8 gene promoter in oral cells of smokers and non- smokers with chronic periodontitis. **J Clin Periodontol.**, v.36, n.9, p. 719-715, Set. 2009.

ORBAN PC, CHAPMAN PF, BRAMILLA R. Is the Ras-MAPK signaling pathway necessary for long-term memory formation? **Trends Neurosci**, n.22, p. 38-44. 1999

PANNEERSELVAM, K., PARAMESWARAN, A., KAVITHA, B., & PANNEERSELVAM, E. Primary intraosseous squamous cell carcinoma in a dentigerous cyst. **South Asian J Cancer**, 6(3), 105, 2017.

PEREIRA *et al.* Oral pyogenic granulomas show MAPK/ERK signaling pathway activation, which occurs independently of *BRAF*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS*, *GNA11*, and *GNA14* mutations. **Journal Oral Pathology e Medicine**, v.00, p.1-5, 2019.

PENN, N. W., SUWALSKI, R., O'RILEY, C., BOJANOWSKI, K., & YURA, R. The presence of 5-hydroxymethylcytosine in animal deoxyribonucleic acid. **Biochemical Journal**, v. 126, n.4, p. 781-790, 1972.

POLLOCK PM, HARPER UL, HANSEN KS, et al. High frequency of BRAF mutations in nevi. **Nat Genet.**, v.33, p. 19–20, 2003.

PLOTNIKOV et al. The MAPK cascades: Signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. **Biochim Biophys Acta**, v. 1813, p. 1619-1633, 2011.

RAMSAHOYE BH, BINISZKIEWICZ D, LYKO F, CLARK V, BIRD AP, JAENISCH R. Non-CpG methylation is prevalent in embryonic stem cells and may be mediated by DNA methyltransferase 3a. **Proc Natl Acad Sci USA**, p. 5242 – 5242, 2000.

REICHART, P.A., PHILIPSEN, H.P. (2004). Odontogenic tumors and allied lesions. London: **Quintessence Publishing Co**, 25–270, 2004.

ROMANOV, G.A., & VANYUSHIN, B.F. Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. **Biochim Biophys Acta**, 27, 204-218, 1981.

RONG et al. Differential activation of ERK signaling in HPV-related oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Cancers**, v.11, 2019.

SALNIKOW K, COSTA M. Epigenetic mechanisms of nickel carcinogenesis. **J. Environ. Pathol Toxicol Oncol.**, v.19, n.3, p. 307-18, 2000.

SALHIA B, BAKER A, AHMANN G, AUCLAIR D, FONSECA R, CARPENT J. DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors. **Cancers Res.**, v. 70 n.17, 6934-6944, Sep. 2010.

SATHEESAN, E., TAMGADGE, S., TAMGADGE, A., BHALERAO. S., & PERIERA, T. Histopathological and Radiographic Analysis of Dental Follicle of Impacted Teeth Using Modified Gallego's Stain. **J Clin Diagn Res.**, 10(5), 106-111, 2016.

SEARS, R. C., NEVIS, J. R., Signalling networks that link cell proliferation and cell fate. **The Journal of Biological Chemistry**, p. 277, n. 14, p. 11617-11620, 2002.

SHARMA S, KELLY TK, JONES P. Epigenetics in cancer. **Journal of Carcinogenesis**, v.31, n.1, p. 27–36, 2010.

SCIUBBA, J.J., FANTASIA, J.E., KAHN, L.B. Atlas of tumor pathology, 3rd series: tumors and cysts of the jaw. Washington, DC: **Armed Forces Institute of Pathology**, 71–127, 2001.

STEPHENS, R.G., KOGON, S.L., & REID, J.A. The unerupted or impacted third molar--a critical appraisal of its pathologic potential. **J Can Dent Assoc**, 55(3), 201-207. Erratum in *J Can Dent Assoc* 1989 Jun;55(6):453, 1989.

SOARES P, TROVISCO V, ROCHA AS, et al. BRAF mutations and RET/PTC rearrangements are alternative events in the etiopathogenesis of PTC. **Oncogene**, v. 22, p.4578-4580, 2003.

SONG, C.X., SZULWACH, K.E., FU, Y., DAI, Q., YI, C., LI, X., LI, Y., CHEN, C.H., ZHANG, W., JIAN, X., WANG, J., ZHANG, L., LOONEY, T.J., ZHANG, B., GODLEY, L.A., HICKS, L.M., LAHN, B.T., JIN, P., HE, C. Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. **Nat. Biotechnol.**, v.29, p.68–72, 2011.

SUBRAMANIAM D, THOMBRE R, DHAR A, ANANT S. DNA Methyltransferases: A Novel Target for Prevention and Therapy *Front. Oncol.*, v.4, p.80, 2014.

SUTER CM, MARTIN DI, WARD RI. Hypomethylation of L1 retrotransposons in colorectal cancer and adjacent normal tissue. **Int J Colorectal Dis.**, v.19, n.2, p. 95-101, 2004.

SHAUL YD, SEGER R. the mek/erk cascade: from signaling specificity to diverse functions. **Biochimica et Biophysica acta**, N. 1773. P. 1213-1226., 2007.

SHIAO YH, CRAWFORD EB, ANDERSON LM, PATEL P, KO K. Allele-specific germ cell epimutation in the spacer promoter of the 45S ribosomal RNA gene after Cr(III) exposure. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.205, n.3, p. 290– 296, 2005.

SHIN SM, CHOI EJ, MOON SY. Prevalence of pathologies related to impacted mandibular third molars. **Springerplus**, v.5, n.1, p. 915, 2016.

STANLEY, H. R., KROGH, H., & PANNKUK, E. Age changes in the epithelial components of follicles (dental sacs) associated with impacted third molars. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology.**, v.19, n.1, p.128–139, 1965.

SWEATT JD. The neuronal MAP kinase cascade: a biochemical signal integration system subserving synaptic plasticity and memory. **J Neurochem.**, v.76, p. 1-10, 2001.

SWEENEY, R. T., MCCLARY, A. C., MYERS, B. R., BISCOCHO, J., NEAHRING, L., KWEI, K. A., WEST, R. B. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. **Nature Genetics**, v.46, n.7, p.722–725, 2014.

TAKIUSHI M, ACHANZAR WE, QU W, Li G, WALLKES MP. Effects of cadmium on DNA- (Cytosine-5) methyltransferase activity and DNA methylation status during cadmium- induced cellular transformation. **Exp Cell Res.**, v.286, p. 355- 365, 2003.

TASCI et al. The use of proliferation markers of the infamatur and developmental odontogenic cysts. **J Dent Fac Atatürk Uni.**, p. 415-422, 2015.

T. A° BERG et al. Runx2 mediates FGF signaling from epithelium to mesenchyme during tooth morphogenesis. **Developmental Biology.**, v. 270 p.76–93, 2014.

TANG KT, LEE CH. BRAF mutation in papillary thyroid carcinoma: pathogenic role and clinical implications. **J Chin Med Assoc.**, v.73, p. 113-28, 2010.

TORANO et al. Age-associated hydroxymethylation in human bone-marrow mesenchymal stem cells. **J Transl Me.**, v.14, p.207, 2006.

TROVISCO V, SOARES P, SOBRINHO-SIMÕES M. B-RAF mutations in the etiopathogenesis, diagnosis, and prognosis of thyroid carcinomas. **Hum Pathol.**, v.37, n.7, p. 781-786, 2006.

VEURIN M, KOSTER M, BERG LT. The history of DES, lessons to be learned. **Pharm World Sci.**, v.27, n.3, p.139-143, 2005.

VILLALBA L et al. Pericoronal Follicles of Asymptomatic Impacted Teeth: A Radiographic, Histomorphologic, and Immunohistochemical Study. **International Journal of Dentistry.**, p. 1-6, 2012.

XIA Z, DICKENS M, RAINGEAUD J, DAVIS RJ, GREENBERG ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. **Science**, v.270, n.5240, p. 1326-1331, 1995.

XING MZ. BRAF mutation in papillary thyroid cancer: Pathogenic role, molecular bases, and clinical implications. **Endocr Rev.**, v.28, p.742-762, 2007.

XIONG, J., JIANG, H.P., PENG, C.Y., DENG, Q.Y., LAN, M.D., ZENG, H., ... YUAN, B.F.. DNA hydroxymethylation age of human blood determined by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/mass spectrometry. **Clin Epigenetics**, 23, 72, 2015,

XUJ, WU HF, ANG ES, YIP K, WOLOSZYN M, ZHENG MH, TAN RX. NF-kappaB modulators in osteolytic bone diseases. **Cytokine Growth Factor Rev.**, v.20, n.1, p.7-17, Feb. 2009.

WALDRON, C.A., & MUSTOE, T.A. Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin in an odontogenic cyst. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 67(6), 716-724, 1989.

WEBER, M., DAVIES, J.J., WITTIG, D., OAKELEY, E.J., HAAS, E. M., LAM, W.L., & SCHÜBELER, D. Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. **Nat Genet**, 37(8), 853-862, 2005.

WEIDMAN JR, DOLINOY DC, MURPHY SK, JIRTLE RL. Cancer susceptibility: epigenetic manifestation fo environmental exposures. **The Cancer Journal**, Philadelphia, v.13, n.1, p. 9-16, 2007.

WILLIAMS, I.E., & NEWMAN C.W. Squamous-cell carcinoma associated with a dentigerous cyst of the maxilla. Review and report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 16, 1012-1016, 1963. doi:10.1016/0030-4220(63)90206-8

WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, JOHNSON GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. **Physiol Rev.**, Bethesda, v.79, n.1, p.143-180, 1999.

YOO CB, JONES P A. Epigenetic therapy of cancer: past, present and future, **Nature Reviews**, v.5, p.37-50, 2006.

YOON S., & SEGER R. The extracellular signal-regulated kinase: Multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**, v. 24, n.1, p.21–44, 2006.

YOSHIOKA, H., MINAMIZAKI, T., & YOSHIKO, Y. The dynamics of DNA methylation and hydroxymethylation during amelogenesis. **Histochem Cell Biol**, 144(5), 471-478, 2015.

ZHANG W, LIU TH. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v.12, n.1, p. 9-18, 2012.

ZHANG *et al.* Akt/eNOS and MAPK Signaling Pathways Mediated the Phenotypic Switching of Thoracic Aorta Vascular Smooth Muscle Cells in Aging/Hypertensive Rats .**Physiol. Res.**, v.67, p. 543-553, 2018.

ANEXO A – Parecer do Cômite de Ética e Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANALISE DO PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL EM FOLÍCULOS PERICORONÁRIOS DE DENTES IMPACTADOS

Pesquisador: Ricardo Santiago Gomez

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 69000217.2.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE MINAS GERAIS

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.144.768

Apresentação do Projeto:

O Foliculo dental é um tecido conjuntivo frouxo, derivado do ectomesênquima odontogênico. Participa na reabsorção e formação óssea, contribuindo para a erupção dentária e também na formação dos tecidos periodontais, cemento, ligamento periodontal e osso alveolar. O foliculo dental apresenta em sua estrutura, ilhas de epitélio remanescente, que mantêm alguma capacidade proliferativa podendo estar envolvida com o desenvolvimento de lesões císticas e tumorais. Alterações epigenéticas, como a metilação do DNA, podem alterar a expressão de genes supressores de tumores e contribuir para o desenvolvimento de lesões neoplásicas. Nos folículos dentais a metilação em alguns genes pode alterar o seu ciclo celular, podendo levar a formação de alterações patológicas, embora esse fenômeno não tenha sido provado em estudos experimentais.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação da idade com o perfil de metilação global em folículos pericoronários de dentes inclusos.

Objetivo Secundário:

a) Avaliar o perfil de metilação global do DNA no foliculo dental;b)Comparar o perfil de metilação global do DNA entre amostras de pacientes jovens e adultos.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos,6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.144.768

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Toda pesquisa tem risco de acordo com.

Os riscos envolvidos na pesquisa consistem em nos riscos de um exodontia de dentes impactados tais como: hemorragias após a cirurgia, edema, parestesia do nervo alveolar inferior e infecções. Esses riscos podem ser minimizados com planejamento prévio e correto das técnicas cirúrgicas.

Benefícios:

Alterações epigenéticas, como a metilação, são eventos descritos em tumores odontogênicos e em folículos dentais. Com esse projeto pretendemos conhecer o efeito da idade e envelhecimento no perfil de metilação global de genes. Essas informações poderão ser úteis na análise crítica das políticas de saúde sobre extração profilática de dentes impactados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo que pretende-se investigar o perfil de metilação global em folículos pericoronários de dentes inclusos, os resultados poderão ser úteis na análise crítica das políticas de saúde sobre extração profilática de dentes impactados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos apresentados foram: TCLE, parecer consubstanciado do departamento, informações básicas do projeto, projeto original, folha de rosto.

Nas informações básicas do projeto não está relatado os riscos da pesquisa.

Recomendações:

Recomendamos que seja inserido os riscos da pesquisa no termo das informações básicas do projeto semelhante ao que está relatado no TCLE.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis à aprovação do projeto "ANALISE DO PERFIL DE METILAÇÃO GLOBAL EM FOLÍCULOS PERICORONÁRIOS DE DENTES IMPACTADOS" do pesquisador responsável Prof Ricardo Santiago Gomez.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.144.768

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_902628.pdf	29/05/2017 21:31:51		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/05/2017 21:31:26	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Folha de Rosto	20170523185553806.pdf	24/05/2017 10:55:38	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	21/05/2017 20:55:42	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	20170519184322986.pdf	20/05/2017 22:49:40	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	69000217aprovacaoassinada.pdf	28/06/2017 16:05:40	Vivian Resende	Aceito
Outros	69000217parecerassinado.pdf	28/06/2017 16:05:46	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 28 de Junho de 2017

Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad Sl 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

ANEXO B – Artigo Científico Publicado durante o Doutorado no Periódico *Archives of Oral Biology*

Archives of Oral Biology 113 (2020) 104523



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/archoralbio



Assessing pathogenic mutations in dental follicles as an attempt to identify early events in odontogenic tumours tumourigenesis



Bruna Pizzio Coura^{a,1}, Taynara Asevedo Campos de Resende^{b,1},
Vinícius César Barbosa de Menezes^b, Vanessa Fátima Bernardes^a, Silvia Ferreira de Sousa^b,
Marina Gonçalves Diniz^a, Ricardo Santiago Gomez^{b,*}, Carolina Cavalieri Gomes^{a,*}

^a Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

^b Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Benign tumour
Genetics
Normal tissue
Mutation
Odontogenic tumour
Odontogenesis

ABSTRACT

Objective: Driver oncogenic mutations have been reported in several benign neoplasms. While ameloblastomas show *BRAF* p.V600E mutations, adenomatoid odontogenic tumours harbour either *KRAS* p.G12R or p.G12V. The lack of understanding of the core molecular changes involved in tumour initiation and progression represents a critical barrier to developing new strategies for cancer detection and prevention. Considering the fact that ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumours can originate from dental follicles, we hypothesized that the *BRAF* and *KRAS* mutations might be early events in odontogenic tumours tumourigenesis. We aimed to assess *BRAF* and *KRAS* mutations in dental follicles associated with asymptomatic impacted teeth.

Design: Forty-eight dental follicles containing odontogenic epithelial remnants were included in the study. As ameloblastomas most often occur in the posterior mandible and adenomatoid odontogenic tumours have a predilection for the anterior jaws, we assessed by allele-specific qPCR the presence of *BRAF* p.V600E in 32 dental follicles associated with impacted 3rd mandibular molar teeth and *KRAS* p.G12V and *KRAS* p.G12R mutations in 16 dental follicle specimens obtained from around impacted anterior teeth. Sanger sequencing was used as an additional method.

Results: None of the dental follicle cases tested positive for the mutations.

Conclusion: In conclusion, we tried to detect the early genetic events associated with odontogenic tumours development in dental follicles, but we were unable to showcase that *BRAF* p.V600E and *KRAS* p.G12R or p.G12V mutations are the early genetic events associated with odontogenic tumours development.

1. Introduction

Driver oncogenic mutations have been reported in several benign neoplasms, including odontogenic tumours (Diniz et al., 2017; Kato et al., 2016; Marino-Enriquez & Fletcher, 2014). Recurrent pathogenic mutations in *BRAF* and *KRAS* occur in a high proportion of two epithelial odontogenic tumours, ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumours, respectively. While ameloblastomas show *BRAF* p.V600E mutations (Diniz et al., 2015; Kurppa et al., 2014), adenomatoid odontogenic tumours harbour either *KRAS* p.G12R or p.G12V (Coura et al., 2019; Gomes et al., 2016).

KRAS mutations occur in 70% of adenomatoid odontogenic tumours

(Coura et al., 2019). The frequency of the *BRAF* mutation in ameloblastomas ranges from approximately 60 to 80% (Diniz et al., 2015; Kurppa et al., 2014), whereas in ameloblastic carcinomas, their malignant counterpart, this frequency is 38% (Diniz et al., 2015). The higher frequency of the *BRAF* mutation in the benign tumour in comparison to the malignant counterpart is in line with the scenario described in other organs, illustrated by a higher frequency of this *BRAF* mutation in benign nevi (80%) than in dysplastic nevi (60%) or melanoma (40–50%) (Kato et al., 2016).

While ameloblastomas more frequently occur in the posterior region of the jaws, adenomatoid odontogenic tumours most often develop in the anterior jaws. Ameloblastomas represent an interesting model to

Abbreviations: qPCR, ²quantitative polymerase chain reaction; TCGA, ³the Cancer Genome Atlas; FFPE, ⁴formalin-fixed, paraffin embedded; gDNA, ⁵genomic DNA
* Corresponding authors at: Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil.

E-mail addresses: rsgomez@ufmg.br (R.S. Gomez), carolinacgomes@ufmg.br (C.C. Gomes).

¹ Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104523>

Received 1 March 2019; Received in revised form 10 April 2019; Accepted 11 August 2019
0003-9969/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

ANEXO C – Artigo Científico Submetido durante o Doutorado para publicação no periódico Archives of Oral Biology

Title: Effects of aging on DNA hydroxymethylation and methylation in human dental follicles

Running title: Aging and dental follicles

Vinícius César Barbosa **de Menezes**^{*a}, vcmenezes@hotmail.com

Elisa Carvalho de **Siqueira**^{*b}, elisadesiqueira@hotmail.com

Sara Ferreira dos Santos **Costa**^a, costa.sfs@gmail.com

Fabício Tinôco Alvim **de Souza**^a, ftadesouza@gmail.com

Renan Pedra de **Souza**^c, renanrps@yahoo.com.br

Ricardo Santiago **Gomez**^a, rsgomez@ufmg.br

Carolina Cavaliéri **Gomes**^{**b}, carolinacgomes@ufmg.br

*These authors contributed equally

^a Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brazil. CEP: 31270-901.

^b Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brazil. CEP: 31270-901.

^c Grupo de Pesquisa em Bioestatística e Epidemiologia Molecular, Department of Genetics, Ecology and Evolution, Biological Sciences Institute, Universidade Federal

de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brazil. CEP: 31270-901.

**** Correspondence should be addressed to:**

Carolina Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brazil. CEP: 31270-901

Phone: +55 31 3409.2895 Email: carolinacgomes@ufmg.br

Abstract

Objective Despite the high frequency of impacted teeth and increased frequency of lesions in dental follicles (DF) with aging, DF age-changes remain unclear. We compared the global methylation and hydroxymethylation profiles in DF in relation to age.

Design DF associated with impacted lower third molars were obtained from 59 individuals. Global DNA methylation (5mC content) and hydroxymethylation (5hmC) were evaluated by ELISA. We tested the correlation between 5mC and 5hmC content, and the correlation of each with patients' age. The differences in age, 5mC, and 5hmC in DF from males/females, and location (left/right mandible) was tested.

Results The mean age of the 59 individuals was 19.56 ± 3.92 , ranging from 13 to 31 years, and most were women (n=39). 5hmC content and age up to 19 years were inversely correlated (Spearman's correlation coefficient=-0.552, $p=0.0003$, $n=38$). There was no relationship between 5hmC and 5mC content. There was no difference in the medians of age ($p=0.25$), 5hmC ($p=0.33$) and 5mC ($p=0.86$) between males and females, nor in the medians of age ($p=0.39$), 5hmC ($p=0.99$) and 5mC ($p=0.22$) between the left/right side of the tooth extraction.

Conclusion An inverse correlation between 5hmC and age was established, with no correlation between 5mC and 5hmC content in DF. The biological meaning of such a decrease of global DNA hydroxymethylation with age in DF remains to be clarified.

Keywords: 5hC; 5hmC; DNA methylation; aging; dental follicles; epigenetics

1 Introduction

Cases of impacted teeth are highly prevalent worldwide, showing an approximate prevalence of 16% in the adult population, with the third molars being the most frequently impacted teeth (Dachi & Howell, 1961; Al-Zoubi, Alharbi, Ferguson & Safar, 2017). Dental follicles (DF) or pericoronal follicular tissue are composed of epithelial (reduced enamel organ) and ectomesenchymal structures that surround the crown of the tooth after enamel formation. DFs are retained in cases of impacted teeth and can be studied when extracting third molars or other impacted teeth. Despite the high frequency of impacted teeth, there exists a paucity of research regarding DF biological changes.

After enamel formation, DF reduced epithelium suffers squamous metaplasia, while the remnants of the dental lamina tend to disappear with age (Stanley, Krogh & Pannkuk, 1965; de Mello Palma et al., 2018). In retrospective studies of DF submitted for histopathological evaluation, odontogenic cysts and tumors are eventually diagnosed in addition to carcinomas. This indicates the significant role of these structures in the development of significant and even life-threatening diseases (Eversole, 1999; Curran, Damm & Drummond, 2002; Yildirim, Ataoğlu, Mihmanli, Kiziloğlu & Avunduk, 2008; Slater, 2009). A recent systematic review and meta-analysis concluded that the prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars is 5.3%, and this prevalence is higher among individuals older than 40 years (Mello, Melo, Kammer, Speight & Rivero, 2019).

Some advocate the elective removal of impacted teeth based on the significant risk of destructive cysts and tumor development from DF tissues (Assael, 2002). Additionally, the incidence of both locally destructive and life-threatening diseases originating from DF tissues increases with age. On this basis, the early removal of impacted teeth is desirable, and histopathological evaluation of the

associated DF is highly recommended (Assael, 2002; Curran, Damm & Drummond, 2002; Yildirim, Ataoğlu, Mihmanli, Kiziloğlu & Avunduk, 2008; Slater, 2009; Mello et al., 2019). However, managing impacted teeth is a clinical dilemma, and oral surgeons are frequently discouraged from sending DF for pathologic examination by insurance companies that may refuse to pay the pathology bill (Carl, Goldfarb & Finley, 1995; Assael, 2002; Curran, Damm & Drummond, 2002). Although it is known that the frequency of pathologic lesions in DF increases with aging, published information on the genetic and epigenetic background of DF is unavailable, and it remains unknown if there are considerable changes in this profile with aging. The occurrence of genetic and epigenetic alterations in DF with subjects' aging has never been explored, thereby remaining completely obscure.

We have previously assessed the presence of three hotspot mutations, *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V, and p.G12R in DF associated with asymptomatic impacted teeth. These mutations are highly frequent in two epithelial odontogenic tumors—ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor—and we hypothesized that they could be detected in some DF. However, our hypothesis was not confirmed since we did not identify these mutations (Coura et al., 2019).

Besides somatic mutations, epigenetic events, including DNA methylation, lead to inappropriate expression or silencing of genes without a change in their coding sequence (Holliday & Pugh, 1975; Egger, Liang, Aparicio and Jones, 2004). Epigenetic patterns change during the aging process (Christensen et al., 2009) and, notably, comparing newborn CpG methylation and centenarian methylomes, a trend towards demethylation over a lifetime has been reported (Heyn et al., 2012). DNA global hypomethylation is usually accompanied by local hypermethylation during aging (Jung & Pfeifer, 2015). Some studies have investigated the methylation pattern

of targeted genes in DF and observed the presence of methylation in the *P16*, *P27*, and *RB1* genes (Moreira et al., 2009). However, the pattern of global DNA methylation in DF has not been previously investigated. Methylation of the C⁵ position of cytosine residues (5-methylcytosine, 5mC) in DNA has been recognized as an epigenetic silencing mechanism of fundamental importance (Holliday & Pugh, 1975; Valinluck & Sowers, 2007). 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) results from the oxidation of 5mC, and its levels are approximately 0.1% in mammalian tissues, with great variation (Globisch et al., 2015). The functional significance of 5hmC as an epigenetic mark is poorly understood, but it seems to be associated with activated transcription (Breiling & Lyko, 2015).

Since alterations occur in the global methylation profile of different tissues with advancing age, we compared the global methylation and hydroxymethylation profiles in DF samples from young and older individuals. We hypothesized that the global DNA methylation and hydroxymethylation in DF can be changed throughout the aging process.

2 Materials and Methods

2.1 Sample selection and clinical data

The study was approved by the Ethics Committee of the Federal University of Minas Gerais (UFMG) (protocol 2.144.768). Written informed consent was obtained from all patients, and the study was performed in accordance with the Declaration of Helsinki. A convenience sample of DF associated with impacted lower third molars was obtained from 59 healthy individuals, irrespective of sex or age, or inclusion position at the Oral Surgery Clinics of UFMG. Individuals who did not want to participate in the study, reported antibiotics or anti-inflammatory use in the past six

months, were smokers, showed systemic alterations or were immunocompromised, and cases of mandibular 3rd molars erupted or with semi-inclusion were excluded from the study.

Each DF sample was cut into two parts. One fragment was formalin-fixed paraffin-embedded for diagnosis confirmation. The other piece was stored in a tube containing 1mL of nucleic acid preservation solution (RNAholder, BioAgency, Brazil) and stored at -80°C until the time of sample processing. Clinical data including age, sex, and location of the teeth were obtained from all patients.

2.2 DNA isolation

Genomic DNA (gDNA) was isolated from DF using the DNeasy® Blood & Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) according to the manufacturer instructions. gDNA concentration (ng/μL), as well as its purity considering the absorbance ratios $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ of ~1.8 and $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ of ~2.0 (Wilfinger, Mackey & Chomczynski, 1997), were determined using a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). The DNA was stored at -20°C for subsequent analysis.

2.3 Global DNA methylation

The levels of 5mC and 5hmC were evaluated by submitting 100 ng of gDNA of each sample to an enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The ELISA assay was carried out using the Quest 5mC™ DNA ELISA Kit (catalog number D5325) and Quest 5hmC™ DNA ELISA Kit (catalog number D5425), both from Zymo Research Corp. (Irvine, CA, USA), following the manufacturer's protocol. For each ELISA assay, 5mC and 5hmC, all samples were evaluated at the same time and in the same experiment. Colorimetric analysis was performed to identify the percentage of DNA methylation and hydroxymethylation of each sample. These percentual values

were obtained based on the standard curve provided by the kits and the individual absorbance. To determine the absorbance of each sample, an Epoch™ Microplate Spectrophotometer (BioTek, Winooski, USA) was used with absorbance read at 405 nm. Global DNA methylation and hydroxymethylation were expressed as the percentage of 5mc and 5hmc, respectively.

2.4 Statistical analyses

Descriptive and inferential statistics were carried out on R (version 3.6.1). Locally estimated scatterplot smoothing (LOESS) were created to evaluate the relationship between numerical variables. Spearman correlation coefficient was estimated where a linear association was observed. Normality was evaluated using Shapiro-Wilk test. Median differences of 5mC and 5hmC between sex and side of extraction of DF tissue were analyzed using Mann-Whitney test for independent samples. The level of statistical significance was set at 0.05. *A priori* and *post hoc* power analysis was conducted on G-power version 3.1.9.4 using observed ratios and effect-sizes to calculate sample size to reach 80% power and obtained power, respectively.

3 Results

The clinical data of the individuals from whom DF were collected are shown in **Table 1**. The mean age of the 59 individuals was 19.56 ± 3.92 (range 13-31) years, and most were women (n=39). A similar proportion of cases occurred in each mandibular side (left n=30; right n=29). The median value of global DNA hydroxymethylation (5hmC) of all DF samples was zero, while the median value of global methylation (5mC) in DNA was 66.89% (**Table 2**).

Figure 1 shows the relationship between 5hmC, 5mC, and the individuals' ages. The relationship between 5hmC vs age and 5mC vs age was not typically linear over time (**Figure 1A** and **B**). An inversely proportional relationship was observed between 5hmC content and age up to 19 years (Spearman's correlation coefficient=-0.552, $p=0.0003$, $n=38$) (**Figure 1A**). There was no relationship between 5hmC and 5mC content (**Figure 1C**). Additionally, there was no difference in the medians of age ($p=0.25$), 5hmC ($p=0.33$) and 5mC ($p=0.86$) between men and women (**Figure 2A** and **C**). Similarly, there was no difference in the medians of age ($p=0.39$), 5hmC ($p=0.99$) and 5mC ($p=0.22$) between the left and right sides of the tooth extraction (**Figure 2B** and **D**). Obtained power ranged from 0.05 to 0.34 since reflecting low nominal differences between evaluated groups.

4 Discussion

Occasionally, DF cells for yet-unknown reasons lead to the formation of cysts and tumors, which include but are not restricted to dentigerous cysts, odontogenic keratocysts, and central epithelial odontogenic tumors, such as ameloblastomas and intraosseous squamous cells carcinomas (Hankey & Pedler, 1957; Williams & Newman, 1963; Kramer & Scribner, 1965; Meadow, 1966; Lee & Loke, 1967; Chretien, Carpenter, White, Harrah & Lightbody, 1970; Gardner 1975; Stephens, Kogon & Reid, 1989; Waldron & Mustoe, 1989; Manganaro, Cross & Startzell, 1997; Glosser & Campbell, 1999; Ide, Shimoyama, Horie & Kaneko, 1999; Sciubba, Fantasia & Kahn, 2001; Reichart & Philipsen, 2004; Ide et al., 2008; Bodner, Manor, Shear & van der Waal, 2011; Colbert, Brennan, Theaker & Evans, 2012; Araujo, Kowalski, Rodrigues, de Almeida, Lopes-Pinto & Alves, 2014; Gay-Escoda, Camps-Font, López-Ramírez & Vidal-Bel, 2015; Panneerselvam, Parameswaran, Kavitha & Panneerselvam, 2017). Evidence of pathologic transformation of the DF tissues is

derived either from case reports of cysts and tumors originating in these tissues or from observational clinicopathological investigations (Satheesan, Tamgadge, Tamgadge, Bhalerao & Periera, 2016). The incidence of pathological alterations is higher among older individuals compared to younger ones (Baykul, Saglam, Aydin & Başak, 2005), with a strong correlation between the incidence of cystic alterations in follicular tissues and age (Adelsperger, Campbell, Coates & Tomich, 2000).

Aging is one of the main known risk factors for diseases since epigenetic patterns change over time (Lopez, Fernández & Fraga, 2017). Age plays an important role in the changes that occur in DNA methylation patterns (Romanov & Vanyushin, 1981; Knapowski, Wieczorowska-tobis & Witowski, 2002), which are related to the aberrant expression or silencing of genes (Sharma, Kelly & Jones, 2010). DNA methylation is often dysregulated in tumor cells (Yoo & Jones, 2006), including odontogenic tumors (Moreira et al., 2009). Furthermore, dynamic changes in 5mC and 5hmC may be critical for the regulation of amelogenesis (Yoshiota, Minamizaki & Yoshiko, 2015).

In the present study, the global DNA methylation and hydroxymethylation patterns were evaluated in DF associated with impacted third molars. The global DNA methylation (percentage of 5mC) and global DNA hydroxymethylation (percentage of 5hmC) and the correlation between the values of both with age were tested in order to search for changes in this pattern during aging. An inverse correlation was observed between 5hmC content and age up to 19 years. This decline in 5hmC with aging is consistent with the established phenomenon of age-associated global hypo-hydroxymethylation previously observed in humans (Xiong et al., 2015; Buscarlet, Tessier, Provost, Mollica & Busque, 2016; Toraño et al., 2016) as well as in mice (Kochmanski et al., 2018). Others, however, observed a positive

correlation between age and 5hmC levels in healthy patients' blood (Jiang et al., 2017). This discrepancy may be due to several factors that are known to influence methylation, but most probably reflects the highly variable global contents of 5hmC content in different normal human tissues and cell lines previously reported (Kriaucionis & Heintz, 2009; Nestor et al., 2012). Notably, high 5hmC levels are observed in the brain (Kriaucionis & Heintz, 2009). Of note, DNA hydroxymethylation represents a strong and reproducible mark of chronological age (Xiong et al., 2015). In DF, it seems that the decrease in global DNA hydroxymethylation with age is also a remarkable phenomenon, however, its biological implications remain to be clarified.

Regarding global DNA methylation, a reduction in global 5mC levels from birth to old age has been previously reported (Buscarlet, Tessier, Provost, Mollica & Busque, 2016). This decline is a well-established phenomenon of age-associated global hypomethylation previously observed in humans (Gonzalo, 2010). In our study, the percentage of 5mC and age was not associated with time, precluding the correlation evaluation.

Global DNA methylation and hydroxymethylation were not correlated in our study. This result is in line with previous studies that also did not observe a correlation of 5mC and 5hmC in blood and normal tissues (Nestor et al., 2012; Godderis et al., 2015). When comparing sex (women vs. men) with the percentage of 5hmC or 5mC, no difference was observed. Similar to our findings, other investigators did not detect any differences in sex in human cells, blood or saliva from healthy volunteers (Weber et al., 2005; Godderis et al., 2015). Considering previous work showed differences in third molar agenesis frequency between right and left jaw sides (Sujon, Alam & Rahman, 2016; Trakinienė et al., 2018), we compared the tooth extraction side (right vs. left) with the percentage of 5hmC or

5mC and did not observe any difference. We aimed to test the correlation of global methylation and hydroxymethylation with age in human DF. Although global DNA methylation changes with chronological aging, global DNA methylation and hydroxymethylation can also be influenced by environmental exposures, including chemical and nonchemical stressors, in addition to nutritional factors (Dao et al., 2014; Martin & Fry, 2018), which could not be addressed in our study.

Global DNA hydroxymethylation and methylation in DF have not been previously investigated. Besides global DNA methylation/hydroxymethylation changes during aging, gene-specific hypermethylation can lead to the silencing of several genes, including those responsible for cell cycle control (Burzynski, 2005). There are studies that investigated DNA methylation in target genes in odontogenic tumors (Moreira et al., 2009; Gomes et al., 2010; Costa et al., 2017), and few studies have evaluated specific DNA methylation patterns of genes in DF (Moreira et al., 2009; Gopinathan, Kolokythas, Luan & Diekwisch, 2013; Ai et al., 2018; Li et al., 2018).

In the present DF cohort, the relationship between 5mC and 5hmC with age was not linear over time, and an inverse correlation between DNA hydroxymethylation and age (up to 19 years) was found. This age-dependent decrease in 5hmC levels observed was not accompanied by changes in the levels of 5mC, as there was no correlation between 5mC and 5hmC content in DF. In conclusion, we provide evidence of global DNA hydroxymethylation changes with age in human DF. Further studies are necessary to determine the biological significance of decreased global DNA hydroxymethylation with age in DF.

Acknowledgments: CCG, RPS, and RSG are research fellows at the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil.

Funding sources: This work was supported by grants from CNPq/Brazil, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/ Brazil, and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil. The authors have no conflicts of interest to declare.

5 References

- Adelsperger, J., Campbell, J.H., Coates, D.B., Summerlin, D.J., & Tomich, C.E. (2000). Early soft tissue pathosis associated with impacted third molars without pericoronal radiolucency. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 89(4), 402-406. [https://doi:10.1016/s1079-2104\(00\)70119-3](https://doi:10.1016/s1079-2104(00)70119-3)
- Ai, T., Zhang, J., Wang, X., Zheng, X., Qin, X., Zhang, Q., ... Chen, F. (2018). DNA methylation profile is associated with the osteogenic potential of three distinct human odontogenic stem cells. *Signal Transduct Target Ther*, 12,1. <https://doi:10.1038/s41392-017-0001-6>
- Al-Zoubi, H., Alharbi, A.A., Ferguson, D.J., & Zafar, M.S. (2017). Frequency of impacted teeth and categorization of impacted canines: A retrospective radiographic study using orthopantomograms. *Eur J Dent*, 11(1), 117-121. https://doi:10.4103/ejd.ejd_308_16
- Araújo, J.P., Kowalski, L.P., Rodrigues, M.L., de Almeida, O.P., Lopes Pinto, C.A., & Alves, F.A. (2014). Malignant transformation of an odontogenic cyst in a period of 10 years. *Case Rep Dent*, 2014:762969. <https://doi:10.1155/2014/762969>
- Assael, L.A. (2002). Impacted teeth: reflections on Curran, Kugelberg, and Rood. *J Oral Maxillofac Sur*, 60(6), 611-612. <https://doi:10.1053/joms.2002.33624>
- Baykul, T., Saglam, A.A., Aydin, U., & Başak, K. (2005). Incidence of cystic changes in radiographically normal impacted lower third molar follicles. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 99(5), 542-545. <https://doi:10.1016/j.tripleo.2004.08.010>
- Bodner, L., Manor, E., Shear, M., & van der Waal, I. (2011). Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in an odontogenic cyst: a clinicopathologic analysis of 116 reported cases. *J Oral Pathol Med*, 40(10), 733-738. <https://doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01058.x>
- Breiling, A., & Lyko, F. (2015). Epigenetic regulatory functions of DNA modifications: 5-methylcytosine and beyond. *Epigenetics Chromatin* 8, 24. <https://doi.org/10.1186/s13072-015-0016-6>
- Buscarlet, M., Tessier, A., Provost, S., Mollica, L., & Busque, L. (2016). Human blood cell levels of 5-hydroxymethylcytosine (5hmC) decline with age, partly related to acquired mutations in TET2. *Exp Hematol*, 44(11), 1072-1084. <https://doi:10.1016/j.exphem.2016.07.009>
- Carl, W., Goldfarb, G., & Finley, R. (1995). Impacted teeth: prophylactic extractions or not? *N Y State Dent J*, 61(1), 32-35.
- Chretien, P.B., Carpenter, D.F., White, N.S., Harrah, J.D., & Lightbody, P.M. (1970). Squamous carcinoma arising in a dentigerous cyst. Presentation of a fatal case and review of four previously reported cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 30(6), 809-816. [https://doi:10.1016/0030-4220\(70\)90345-2](https://doi:10.1016/0030-4220(70)90345-2)

Christensen, B.C., Houseman, E.A., Marsit, C.J., Zheng, S., Wrensch, M.R., Wiemels, J.L., ... Kelsey, K.T. (2009). Aging and environmental exposures alter tissue-specific DNA methylation dependent upon CpG island context. *PLoS Genet*, 5(8):e1000602. <https://doi:10.1371/journal.pgen.1000602>

Cohen, J. (1983). The Cost of Dichotomization. *Appl Psychol Meas*, 7(3), 249–253.

Colbert, S., Brennan, P.A., Theaker, J., & Evans. B. (2012). Squamous cell carcinoma arising in dentigerous cysts. *J Craniomaxillofac Surg*, 40(8), 355-357. <https://doi:10.1016/j.jcms.2012.01.020>

Costa, S., Pereira, N.B., Pereira, K., Campos, K., de Castro, W.H., Diniz, M.G., ... Gomez, R.S. (2017). DNA methylation pattern of apoptosis-related genes in ameloblastoma. *Oral Dis*, 23(6), 779-783. <https://doi:10.1111/odi.12661>

Coura, B.P., de Resende, T.A.C., de Menezes, V.C.B., Bernardes, V.F., de Sousa, S.F., Diniz, M.G., ... Gomes, C.C. (2019). Assessing pathogenic mutations in dental follicles as an attempt to identify early events in odontogenic tumours tumourigenesis. *Arch Oral Biol*, 14:104523. <https://doi:10.1016/j.archoralbio.2019.104523>

Curran, A.E., Damm, D.D., & Drummond, J.F. Pathologically significant pericoronal lesions in adults: histopathologic evaluation. (2002). *J Oral Maxillofac Surg*, 60(6), 613-617. <https://doi:10.1053/joms.2002.33103>.

Dachi, S.F., & Howell, F.V. (1961). A survey of 3, 874 routine full-month radiographs. II. A study of impacted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 14, 1165-1169. [https://doi:10.1016/0030-4220\(61\)90204-3](https://doi:10.1016/0030-4220(61)90204-3)

Dao, T., Cheng, R. Y., Revelo, M. P., Mitzner, W., & Tang, W. (2014). Hydroxymethylation as a Novel Environmental Biosensor. *Current Environ Health Rep*, 1(1), 1–10. <https://doi.org/10.1007/s40572-013-0005-5>

de Mello Palma, V., Danesi, C.C., Arend, C.F., Venturini, A.B., Blaya, D.S., Neto, M.M., ... Ferrazzo, K.L. (2018). Study of Pathological Changes in the Dental Follicle of Disease-Free Impacted Third Molars. *J Maxillofac Oral Surg*, 17(4), 611-615. <https://doi:10.1007/s12663-018-1131-2>

Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., & Jones, P.A. (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*, 27, 457-463. <https://doi:10.1038/nature02625>

Eversole, L.R. (1999). Malignant epithelial odontogenic tumours. *Semin Diagn Pathol*, 16(4), 317-324.

Gardner, A.F. (1975). A survey of odontogenic cysts and their relationship to squamous cell carcinoma. *Dent J*, 41(3), 161-167.

Gay-Escoda, C., Camps-Font, O., López-Ramírez, M., & Vidal-Be, I A. (2015). Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in dentigerous cyst: Report of

2 cases and review of the literature. *J Clin Exp Dent*, 7(5), 665-670. <https://doi:10.4317/jced.52689>

Globisch, D., Munzel, M., Muller, M., Michalakakis, S., Wagner, M., Koch, S., ... Carell, T. (2015). Tissue distribution of 5-hydroxymethylcytosine and search for active demethylation intermediates. *PLoS One*, 5(12), e15367. <https://doi:10.1371/journal.pone.0015367>

Glosser, J.W., & Campbell, J.H. (1999). Pathologic change in soft tissues associated with radiographically 'normal' third molar impactions. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 37(4), 2592-60. <https://doi:10.1054/bjom.1999.0061>

Godderis, L., Schouteden, C., Tabish, A., Poels, K., Hoet, P., Baccarelli, A.A., & Van Landuyt, K. (2015). Global Methylation and Hydroxymethylation in DNA from Blood and Saliva in Healthy Volunteers. *Biomed Res Int*, 2015:845041. <https://doi:10.1155/2015/845041>

Gomes, C.C., Brito, J.A., Andrade, C.I., & Gomez, R.S. (2010). DNA methyltransferase expression in odontogenic cysts and tumours. *Oncol Lett*, 1(1), 143-146. https://doi:10.3892/ol_00000026

Gonzalo, S. (2010). Epigenetic alterations in aging. *Journal of applied physiology* (1985), 109(2), 586-597. doi:10.1152/jappphysiol.00238.2010

Gopinathan, G., Kolokythas, A., Luan, X., & Diekwisch, T.G. (2013). Epigenetic marks define the lineage and differentiation potential of two distinct neural crest-derived intermediate odontogenic progenitor populations. *Stem Cells Dev*, 22(2), 1763-1778. <https://doi:10.1089/scd.2012.0711>

Hankey, G.T., & Pedler, J.A. (1957). Primary squamous-cell carcinoma of mandible arising from epithelial lining of dental cyst. *Proc R Soc Med*, 50(9), 680-681.

Heyn H1, Li N, Ferreira HJ, Moran S, Pisano DG, Gomez A, ... Esteller M. (2012). Distinct DNA methylomes of newborns and centenarians. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(26), 10522-10527. <https://doi:10.1073/pnas.1120658109>

Holliday, R., & Pugh, J.E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science*, 187, 226-232.

Ide, F., Mishima, K., Yamada, H., Horie, N., Saito, I., Shimoyama, T., & Kusama, K. (2008). Unsuspected small ameloblastoma in the alveolar bone: a collaborative study of 14 cases with discussion of their cellular sources. *J Oral Pathol Med*, 37(4), 221-227. <https://doi:10.1111/j.1600-0714.2007.00628.x>

Ide, F., Shimoyama, T., Horie, N., & Kaneko, T. (1999). Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin from reduced enamel epithelium. *J Oral Pathol Med*, 28(9), 420-422. <https://doi:10.1111/j.1600-0714.1999.tb02114.x>

Jiang, T., Zong, L., Zhou, L., Hou, Y., Zhang, L., Zheng, X., ... Zhao, C. (2017). Variation in global DNA hydroxymethylation with age associated with

- schizophrenia. *Psychiatry Res*, 257, 497-500. <https://doi.org/10.1016/j.psychres.2017.08.022>
- Jung, M., & Pfeifer, G.P. (2015). Aging and DNA methylation. *BMC Biol*, 13, 13-17. <https://doi.org/10.1186/s12915-015-0118-4>
- Kochmanski, J., Marchlewicz, E.H., Cavalcante, R.G., Sartor, M.A., & Dolinoy, D.C. (2018). Age-related epigenome-wide DNA methylation and hydroxymethylation in longitudinal mouse blood. *Epigenetics*, 13(7), 779-792. <https://doi.org/10.1080/15592294.2018.1507198>
- Kramer, H.S., & Scribner, J.H. (1965). Squamous-cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 19, 555-561. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90019-8](https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90019-8)
- Kriaucionis, S., & Heintz, N. (2009). The nuclear DNA base 5-hydroxymethylcytosine is present in Purkinje neurons and the brain. *Science*, 15, 929-930. <https://doi.org/10.1126/science.1169786>
- Lee, K.W., & Loke, S.J. (1967). Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Cancer*, 20(12), 2241-2244. doi:10.1002/1097-0142(196712)20:12<2241::aid-cncr2820201226>3.0.co;2-f
- Li, Q., Guo, Y., Yao, M., Li, J., Chen, Y., Liu, Q., ... Feng, Y. (2018). Methylation of Cdkn1c may be involved in the regulation of tooth development through cell cycle inhibition. *J Mol Histol*, 49(5), 459-469. <https://doi.org/10.1007/s10735-018-9785-0>
- Lopez, V., Fernández, A.F., & Fraga, M.F. (2017). The role of 5-hydroxymethylcytosine in development, aging and age-related diseases. *Ageing Res Rev*, 37, 28-38. <https://doi.org/10.1016/j.arr.2017.05.002>
- Maegawa, S., Hinkal, G., Kim, H.S., Shen, L., Zhang, L., Zhang, J., ... Issa, J.P. (2010). Widespread and tissue specific age-related DNA methylation changes in mice. *Genome Res*, 20(3), 332-340. <https://doi.org/10.1101/gr.096826.109>
- Manganaro, A.M., Cross, S.E., & Startzell, J.M. (1997). Carcinoma arising in a dentigerous cyst with neck metastasis. *Head Neck*, 19(5), 436-439. doi:10.1002/(sici)1097-0347(199708)19:5<436::aid-hed12>3.0.co;2-5
- Martin, E. M., & Fry, R. C. (2018). Environmental Influences on the Epigenome: Exposure- Associated DNA Methylation in Human Populations. *Annu Rev Pub Health*, 39, 309–333. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040617-014629>
- Meadow, S.R. (1966). Malignant change in a dental cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 21(3), 282-285. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(66\)90058-2](https://doi.org/10.1016/0030-4220(66)90058-2)
- Mello, F.W., Melo, G., Kammer, P.V., Speight, P.M., & Rivero, E.R.C. (2019). Prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars: A systematic review and meta-analysis. *J Craniomaxillofac Surg*, 47(6), 996-1002. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2019.03.026>

Moreira, P.R., Guimarães, M.M., Gomes, C.C., Diniz, M.G., Brito, J.A., de Castro, W.H., & Gomez, R.S. (2009). Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol*, 54(10), 893-897. doi:10.1016/j.archoralbio.2009.07.006

Nestor, C.E., Ottaviano, R., Reddington, J., Sproul, D., Reinhardt, D., Dunican, ... Meehan, R.R. (2012). Tissue type is a major modifier of the 5-hydroxymethylcytosine content of human genes. *Genome Res*, 22(3), 467-477. https://doi:10.1101/gr.126417.111

Panneerselvam, K., Parameswaran, A., Kavitha, B., & Panneerselvam, E. (2017). Primary intraosseous squamous cell carcinoma in a dentigerous cyst. *South Asian J Cancer*, 6(3), 105. https://doi:10.4103/2278-330X.214579

Reichart, P.A., Philipsen, H.P. (2004). *Odontogenic tumors and allied lesions*. London: Quintessence Publishing Co, 25–270.

Romanov, G.A., & Vanyushin, B.F. (1981). Methylation of reiterated sequences in mammalian DNAs. Effects of the tissue type, age, malignancy and hormonal induction. *Biochim Biophys Acta*, 27, 204-218. https://doi:10.1016/0005-2787(81)90156-8

Salhia, B., Baker, A., Ahmann, G., Auclair, D., Fonseca, R., & Carpten, J. (2010). DNA methylation analysis determines the high frequency of genic hypomethylation and low frequency of hypermethylation events in plasma cell tumors. *Cancer Res*, 70(17), 6934-6944. https://doi:10.1158/0008-5472.CAN-10-0282

Satheesan, E., Tamgadge, S., Tamgadge, A., Bhalerao, S., & Periera, T. (2016). Histopathological and Radiographic Analysis of Dental Follicle of Impacted Teeth Using Modified Gallego's Stain. *J Clin Diagn Res*, 10(5), 106-111. https://doi:10.7860/JCDR/2016/16707.7838

Sciubba, J.J., Fantasia, J.E., Kahn, L.B. (2001). *Atlas of tumor pathology, 3rd series: tumors and cysts of the jaw*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 71–127.

Slater, L.J. (2009). Comments on “Pathologic changes in the soft tissues associated with asymptomatic impacted third molars”. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 107(1), 5. https://doi:10.1016/j.tripleo.2008.08.055

Stanley, H.R., Krogh, H., & Pannkuk, E. (1965). Age changes in the epithelial components of follicles (dental sacs) associated with impacted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 19, 128-139. https://doi:10.1016/0030-4220(65)90226-4

Stephens, R.G., Kogon, S.L., & Reid, J.A. (1989). The unerupted or impacted third molar--a critical appraisal of its pathologic potential. *J Can Dent Assoc*, 55(3), 201-207.

Sujon, M.K., Alam, M.K., & Rahman, S.A. (2016). Prevalence of Third Molar Agenesis: Associated Dental Anomalies in Non-Syndromic 5923 Patients. *PLoS One*. 11(8), e0162070. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162070

- Szulwach, K.E., Li, X., Li, Y., Song, C.X., Wu, H., Dai, Q., ... Jin, P. (2011). 5-hmC-mediated epigenetic dynamics during postnatal neurodevelopment and aging. *Nat Neurosci*, 14(12), 1607-1616. <https://doi.org/10.1038/nn.2959>
- Toraño, E.G., Bayón, G.F., Del Real, Á., Sierra, M.I., García, M.G., Carella, A., ... Fernández, A.F. (2016). Age-associated hydroxymethylation in human bone-marrow mesenchymal stem cells. *J Transl Med*, 14(1), 207. <https://doi.org/10.1186/s12967-016-0966-x>
- Trakinienė, G., Šidlauskas, A., Andriuškevičiūtė, I., Šalomskienė, L., Švalkauskienė, V., Smailienė, D., & Trakinis, T. (2018). Impact of genetics on third molar agenesis. *Scientific reports*, 8(1), 8307. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-26740-7>
- Valinluck, V., & Sowers, L.C. (2007). Endogenous cytosine damage products alter the site selectivity of human DNA maintenance methyltransferase DNMT1. *Cancer Res*, 67(3), 946-950. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-3123>
- Xiong, J., Jiang, H.P., Peng, C.Y., Deng, Q.Y., Lan, M.D., Zeng, H., ... Yuan, B.F. (2015). DNA hydroxymethylation age of human blood determined by capillary hydrophilic-interaction liquid chromatography/mass spectrometry. *Clin Epigenetics*, 23, 72. <https://doi.org/10.1186/s13148-015-0109-x>
- Waldron, C.A., & Mustoe, T.A. (1989). Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin in an odontogenic cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 67(6), 716-724. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(89\)90014-5](https://doi.org/10.1016/0030-4220(89)90014-5)
- Weber, M., Davies, J.J., Wittig, D., Oakeley, E.J., Haas, E.M., Lam, W.L., & Schübeler, D. (2005). Chromosome-wide and promoter-specific analyses identify sites of differential DNA methylation in normal and transformed human cells. *Nat Genet*, 37(8), 853-862. <https://doi.org/10.1038/ng1598>
- Wen, L., Li, X., Yan, L., Tan, Y., Li, R., Zhao, Y., ... Qiao, J. (2014). Whole-genome analysis of 5-hydroxymethylcytosine and 5-methylcytosine at base resolution in the human brain. *Genome Biol*, 15(3), 49. <https://doi.org/10.1186/gb-2014-15-3-r49>
- Wilfinger, W.W., Mackey, K., & Chomczynski, P. (1997). Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity. *Biotechniques*, 22(3), 474-481. doi: 10.2144/97223st01.
- Williams, I.E., & Newman C.W. (1963). Squamous-cell carcinoma associated with a dentigerous cyst of the maxilla. Review and report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 16, 1012-1016. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(63\)90206-8](https://doi.org/10.1016/0030-4220(63)90206-8)
- Yildirim, G., Ataoğlu, H., Mihmanli, A., Kiziloğlu, D., & Avunduk, M.C. (2008). Pathologic changes in soft tissues associated with asymptomatic impacted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 106(1), 14-18. <https://doi.org/10.1016/j.tripleo.2007.11.021>
- Yoo, C.B., & Jones, P.A. (2006). Epigenetic therapy of cancer: past, present and future. *Nat Rev Drug Discov*, 5(1), 37-50. <https://doi.org/10.1038/nrd1930>

Yoshioka, H., Minamizaki, T., & Yoshiko, Y. (2015). The dynamics of DNA methylation and hydroxymethylation during amelogenesis. *Histochem Cell Biol*, 144(5), 471-478. <https://doi.org/10.1007/s00418-015-1353-z>

Table 1. Clinical data of the 59 samples of dental follicles associated with impacted lower third molars.

Sample #	Clinical Information		
	Age	Sex	Side
1	21	Female	Right
2	16	Female	Right
3	25	Female	Left
4	20	Female	Left
5	23	Female	Left
6	17	Female	Right
7	17	Male	Left
8	17	Female	Right
9	18	Male	Right
10	17	Female	Right
11	19	Female	Left
12	16	Male	Left
13	20	Female	Right
14	30	Female	Right
15	31	Male	Right
16	27	Male	Left
17	17	Female	Left
18	17	Male	Left
19	20	Male	Right
20	17	Male	Right
21	17	Male	Right
22	17	Female	Right
23	17	Female	Right
24	20	Female	Left
25	19	Female	Right
26	16	Male	Left
27	16	Male	Right
28	15	Male	Left
29	17	Female	Right
30	19	Female	Left
31	23	Male	Right
32	17	Female	Right
33	17	Female	Left
34	23	Female	Left
35	25	Female	Left
36	19	Female	Left
37	15	Female	Left
38	17	Male	Right
39	22	Female	Right
40	13	Female	Right
41	19	Male	Right
42	18	Female	Right
43	18	Female	Left
44	24	Male	Left
45	17	Male	Left

46	22	Female	Right
47	18	Female	Left
48	27	Female	Left
49	18	Female	Left
50	17	Male	Left
51	22	Female	Left
52	24	Female	Left
53	19	Female	Right
54	22	Female	Right
55	18	Female	Right
56	17	Male	Left
57	18	Female	Left
58	30	Male	Left
59	17	Female	Right

Table 2. Percentage of DNA methylation and hydroxymethylation of the dental follicles, according to sex, age and side of extraction.

Variable	Group		n	Mean	SD	Median	Min	Max	Range	Obtained power
Hydroxymethylation %	Total		59	0.04	0.01	0	0	0.32	0-0.32	-
	Sex	Men	20	0.04	0.06	0	0	0.20	0-0.20	0.13 ¹
		Women	39	0.03	0.07	0	0	0.32	0-0.32	
	Age (y.o.)	≤20	42	0.04	0.05	0	0	0.20	0-0.20	- ²
		21-25	12	0.03	0.09	0	0	0.32	0-0.32	
		≥26	5	0.05	0.09	0.01	0	0.20	0-0.20	
	Side	Right	29	0.03	0.06	0	0	0.32	0-0.32	0.14 ³
		Left	30	0.04	0.07	0	0	0.20	0-0.20	
Methylation %	Total		59	65.82	4.31	66.89	0	100	0-100	-
	Sex	Men	20	65.86	34.76	67.44	0	100	0-100	0.05 ⁴
		Women	39	65.80	32.65	62.44	0	100	0-100	
	Age (y.o.)	≤20	42	70.58	30.94	74.11	0	100	0-100	- ²
		21-25	12	56.37	31.42	31.42	21.33	100	21.33-100	
		≥26	5	48.53	49.61	49.61	0	100	0-100	
	Side	Right	29	71.32	30.31	68	0	100	0-100	0.34 ⁵
		Left	30	60.50	35.24	56.89	0	100	0-100	

¹Sample size required to reach 80% power would be 813 women and 417 men (using 1.95 women: men observed ratio). ²Categorized age is presented for descriptive purposes only. Data analysis was performed using age as continuous variable. (Cohen, 1983). ³Sample size required to reach 80% power would be 560 right and 544 left teeth (using 1.03 right left observed ratio). ⁴Sample size required to reach 80% power would be 6,032,823 women and 3,093,755 men (using 1.95 women: men observed ratio). ⁵Sample size required to reach 80% power would be 123 right and 119 left teeth (using 1.03 right left observed ratio).

Figure legends

Figure 1. Relationship between global DNA methylation, global DNA hydroxymethylation and the individuals' ages estimated using locally estimated scatterplot smoothing (blue line) and 95% confidence interval around smooth (grey area around the blue line). (A) The relationship between 5hmC and age was not linear over time (presence of sparse data points and the shape of blue curve). An inverse correlation was observed between 5hmC content and age up to 19 years (red dotted line) (Spearman's correlation coefficient = -0.552, $p = 0.0003$, $n = 38$). (B) The relationship between 5mC and age was not linear over time (presence of sparse data points and the shape of blue curve) and no correlation could be tested. (C) There was no relationship between 5hmC and 5mC content. The 5hmC and 5mC contents are expressed as percentages.

Figure 2. Distribution of DNA methylation and global DNA hydroxymethylation across sex and side of extraction of impacted teeth/dental follicles. Vertical lines represent median values of 5hmC or 5mC percentage based on sex or side of extraction. (A) 5hmC median does not appear to be different according to sex (Mann-Whitney test, $p = 0.33$). (B) 5hmC median does not appear to be different according to the side of tooth extraction (Mann-Whitney test, $p = 0.99$). The median value lines are overlapped at 0. (C) 5mC median does not appear to be different according to sex (Mann-Whitney test, $p = 0.86$). (D) 5mC median does not appear to be different according to the side of tooth extraction (Mann-Whitney test, $p = 0.22$).

Figure 1.

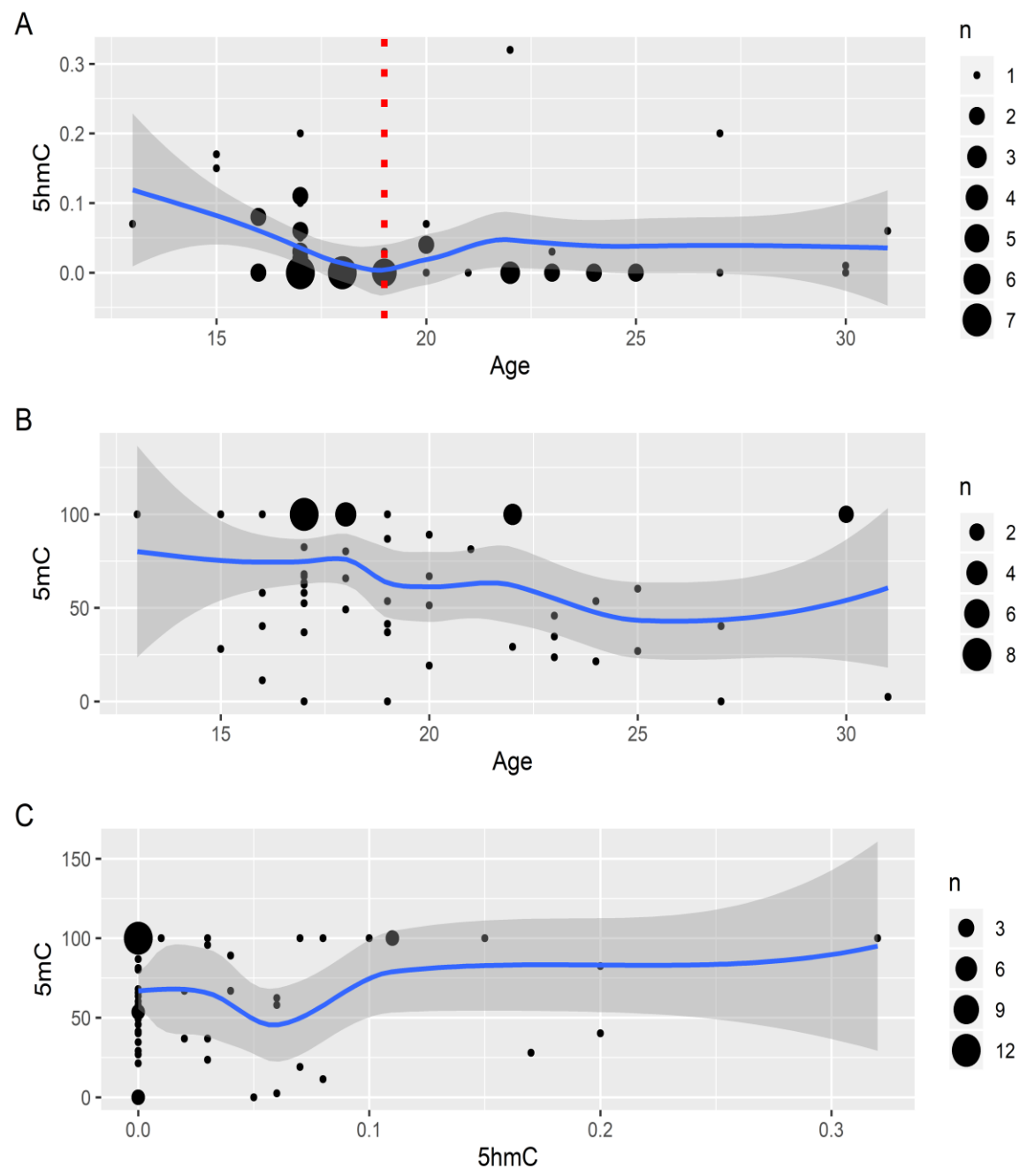


Figure 2.

