

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

ALESSANDRA PIRES DUARTE

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS DE  
DNA GENÔMICO TOTAL EM AMELOBLASTOMA,  
CARCINOMA AMELOBLÁSTICO E TUMOR ODONTOGÊNICO  
ADENOMATÓIDE**

BELO HORIZONTE

2016

ALESSANDRA PIRES DUARTE

**AVALIAÇÃO DAS ALTERAÇÕES NO NÚMERO DE CÓPIAS DE  
DNA GENÔMICO TOTAL EM AMELOBLASTOMA,  
CARCINOMA AMELOBLÁSTICO E TUMOR ODONTOGÊNICO  
ADENOMATÓIDE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Medicina da UFMG como requisito parcial para obtenção do título em Mestre em Medicina Molecular.

Orientadora: Profa Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Dra Marina Gonçalves Diniz

BELO HORIZONTE

2016

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente, eu gostaria de agradecer aos meus pais e ao meu irmão que estiveram comigo nessa jornada, que me apoiaram nos momentos de tristeza e descrença, que me deram amor e se mostraram compreensivos quando eu estava ausente e estressada, que me deram forças para não desistir, que me deram princípios e sabedoria para me tornar o que eu sou hoje. Sem vocês eu realmente não teria alcançado sucesso pois não teria uma base tão sólida.

Em segundo lugar, gostaria de agradecer aos amigos e colegas do laboratório de Biologia Molecular. Sem a ajuda incondicional de vocês com certeza eu não teria concluído tão bem mais essa etapa. Fico muito feliz em poder dizer que levarei grandes amigos daqui, dentre eles Flávia, Bruna, Silvinha, Marina, Elisa, Fabrício, João, Vanessa.

Em terceiro lugar, eu gostaria de agradecer minha coorientadora, Marina pela paciência durante o meu mestrado, pela disposição em me ajudar, me explicar e me ensinar sempre que foi necessário.

Gostaria de agradecer ao Professor Ricardo pela amizade e por ter me recebido tão bem e por ter aberto as portas do seu laboratório para mim.

Agradeço também a Professora Sílvia Rogatto e o Dr Rolando André Villacis, que me receberam em São Paulo e me ajudaram na realização da técnica, bem como na interpretação dos resultados.

À Capes pelo auxílio financeiro (bolsa) durante o primeiro ano do meu

mestrado e à FAPEMIG e ao CNPq pelo financiamento do meu projeto.

Aos pacientes que aceitaram participar desse projeto e sem os quais não seria possível concretizá-lo.

Por último, eu gostaria de agradecer àquela que foi a responsável por eu estar aqui hoje: minha orientadora, professora, exemplo de profissional e, principalmente, minha amiga, Professora Carolina Cavaliere. Muito obrigada por todos esses anos de ensinamentos, de companheirismo e de amizade. Você participou não só da minha formação profissional, mas também pessoal, afinal foram seis anos de muita convivência diária e de muita doação de ambas as partes. Gostaria que soubesse que o amor que eu sinto pela área acadêmica e pela patologia bucal se deve exclusivamente à você, que me serviu de inspiração para entrar nessa jornada.

## **DEDICATÓRIA**

Dedico essa dissertação à minha família que é o meu alicerce, minha vida e que sabem as dificuldades pelas quais eu precisei passar para chegar até aqui.

"Sou o que quero ser, porque possuo apenas uma vida e nela só tenho uma chance de fazer o que quero.

Tenho felicidade o bastante para fazê-la doce, dificuldades para fazê-la forte, tristeza para fazê-la humana e esperança suficiente para fazê-la feliz.

As pessoas mais felizes não tem as melhores coisas. Elas sabem fazer o melhor das oportunidades que aparecem em seus caminhos." (Clarice Lispector)

## RESUMO

A patogênese dos tumores odontogênicos está intimamente relacionada à odontogênese, o processo de formação do dente. Dentre os tumores odontogênicos epiteliais, destacam-se o ameloblastoma e o tumor odontogênico adenomatóide (TOA). O tratamento cirúrgico dos ameloblastomas pode levar a morbidades ao paciente. O TOA e o ameloblastoma unicístico apresentam comportamento clínico menos agressivo, uma vez que são encapsulados. A contraparte maligna do ameloblastoma, o carcinoma ameloblástico, é uma neoplasia maligna rara e de patogênese molecular incerta. Podem participar da patogênese molecular das neoplasias as variações no número de cópias (do inglês *copy number variation*), CNV, que são alterações estruturais (ganhos e perdas) envolvendo fragmentos de DNA maiores do que um kilobase (Kb). O objetivo desse estudo foi identificar CNVs nesses tumores odontogênicos epiteliais e avaliar possíveis diferenças no perfil dessas alterações entre os 4 subtipos de tumores avaliados: ameloblastoma unicístico e multicístico, TOA e carcinoma ameloblástico. Além disso, identificamos quais foram as CNVs raras e os genes presentes nessas regiões que poderiam ser possíveis candidatos para a patogênese das lesões. Doze amostras (ameloblastoma unicístico, n=3; multicístico, n=4; carcinoma ameloblástico, n=1; e TOA, n=4) foram incluídas. Para análise das CNVs, utilizamos a plataforma CytoScan HD (Affymetrix) para realização da hibridização de microarray de alta sensibilidade. Essa tecnologia utiliza sondas polimórficas (SNPs) e não polimórficas que cobrem o genoma humano. No total, foram encontradas 81 alterações entre ganhos,

perdas e perdas de heterozigosidade (do inglês, *loss of heterozygosity*) do tipo *copy neutral*, cnLOH. Dentre as perdas e ganhos, sete foram consideradas raras. Não foram observadas diferenças específicas no perfil de CNVs entre os grupos de tumores. Algumas das alterações raras encontradas englobam genes potencialmente candidatos no processo de tumorigênese e para a medicina personalizada, são os genes *PPP2R5A*, *B4GALT1*, *SPINK4* e *BAG1* nos ameloblastomas unicísticos e o *IGF2BP3* nos TOAs.

**Palavras-chave:** CNV, CytoScan HD, tumores odontogênicos, cariótipo molecular, DNA genômico total.



## ABSTRACT

The pathogenesis of odontogenic tumors is closely related to odontogenesis, tooth formation process. Among epithelial odontogenic tumors, there are the ameloblastoma and the adenomatoid odontogenic tumor (AOT). The ameloblastoma surgical treatment can lead to patient morbidities. AOT and unicystic ameloblastoma have a less aggressive behavior, since they are encapsulated. The ameloblastoma's malignant counterpart, ameloblastic carcinoma, is a rare malignant neoplasia with uncertain pathogenesis. *Copy Number Variants* (CNV) is a genomic structural alteration (deletion or duplication) larger than one kilobase (Kb) that may be involved in the molecular pathogenesis of neoplasias. The aim of this study was to identify CNVs in these epithelial odontogenic tumors and to evaluate possible differences on the CNVs profiles among the four tumor subtypes included in this study (unicystic ameloblastoma, multicystic ameloblastoma, AOT and ameloblastic carcinoma). In addition, we identified the rare CNVs and the genes involved that could be possible candidates for the pathogenesis of the tumors. Twelve samples (unicystic ameloblastoma, n=3; pathogenic multicystic ameloblastoma, n=4; ameloblastic carcinoma, n=1; e AOT, n=4) were included. CNVs were analyzed by using the ultra-high resolution CytoScan-HD array (Affymetrix), a platform that uses polymorphic (SNPs) and non-polymorphic probes covering the whole genome. 81 alterations were found between losses, gains and *copy neutral* loss of heterozygosity, *cnLOH*. Only seven alterations were considered rare. No specific differences were observed in the CNVs profiles among the groups of tumors. Some of the rare

alterations encompass genes that are potentially candidates in the tumor pathogenesis and for personalized medicine, such as *PPP2R5A*, *B4GALT1*, *SPINK4* and *BAG1* genes in unicystic ameloblastoma and *IGF2BP3* gene in AOT.

**Key words:** CNV, CytoScan HD, odontogenic tumors, molecular karyotype, total genomic DNA, array.

## **ABREVIATURAS E SIGLAS**

**TOA** - Tumor odontogênico adenomatóide

**SNPs** - *Single nucleotide polymorphisms*

**CNVs** - *Copy number variants*

**LOH** - *Loss of heterozygosity*

**cnLOH** - *copy neutral LOH*

**DGV** - *Database of Genomic Variants*

**UDP** - *Uniparental disomy*

**aDGV** - *Affymetrix Database of Genomics Variants*

**nt** - nucleotídeos

**ChAS** - *Chromosome Analyses Suit*

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**DNA** - *Deoxyribonucleic acid*

**Pb** - Pares de bases

**Kb** - Kilobase

**MAPK** - *Mitogen-activated protein kinase*

**PCR** - *Polymerase Chain Reaction*

## FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Processo de desenvolvimento dental.....	24
<b>Figura 2:</b> Layout da tela de análise do <i>software</i> ChAS .....	47
<b>Figura 3:</b> Representação gráfica do cariótipo da amostra #2 após análise..	48
<b>Figura 4:</b> Métodos de avaliação, comparação e validação das alterações encontradas.....	49
<b>Figura 5:</b> Representação de como a alteração de ganho (região do triângulo azul) se apresenta na amostra #1 nos diferentes parâmetros.....	49
<b>Figura 6:</b> Representação de como a alteração de LOH do tipo <i>copy neutral</i> (região roxa) se apresenta na amostra #2 nos diferentes parâmetros.....	50
<b>Figura 7:</b> Representação de como a alteração de LOH do tipo <i>copy neutral</i> (região roxa) se apresenta na amostra #2 nos diferentes parâmetros.....	50

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	15
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b>	18
2.1 Odontogênese	18
2.2 Tumores Odontogênicos	24
2.3 Ameloblastoma	26
2.3.1 Ameloblastoma unicístico	29
2.3.2 Ameloblastoma multicístico	30
2.4 Carcinoma ameloblástico	32
2.5 Tumor odontogênico adenomatóide	33
2.6 <i>Copy Number Variation (CNV)</i>	35
<b>3. JUSTIFICATIVA</b>	38
<b>4. OBJETIVOS</b>	39
4.1 Objetivo geral	39
4.2 Objetivos específicos	39
<b>5. METODOLOGIA</b>	40
5.1 Coleta das amostras	40
5.2 Análise da variação no número de cópias genômicas	40
5.2.1 Extração de DNA	40
5.2.2 Avaliação da alteração no número de cópias genômicas	41
<b>6. RESULTADOS</b>	45
6.1. Resultados da extração de DNA	45
6.2. Amostras analisadas	45

6.3. Dados fornecidos pelo <i>Chromosome Analysis Suite</i>	46
6.4. Resultados encontrados após a análise das amostras	51
6.4.1. Alterações genômicas de ganho e perda encontradas nos ameloblastomas unicísticos	53
6.4.2. Alterações genômicas de ganho e perda encontradas nos ameloblastomas multicísticos	58
6.4.3. Alterações genômicas de ganho e perda encontradas no carcinoma ameloblástico	63
6.4.4 Alterações genômicas de perda e ganho encontradas nos tumores odontogênicos adenomatóides	65
<b>7. DISCUSSÃO</b>	69
<b>8. CONCLUSÃO</b>	77
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	78
<b>APÊNDICE 1</b>	95
<b>APÊNDICE 2</b>	99
<b>ANEXO 1</b>	101

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos constituem um grupo heterogêneo de doenças raras, incluindo desde hamartomas ou proliferações não neoplásicas à neoplasias benignas e tumores malignos com potencial para metástases (Barnes *et al.*, 2005). A patogênese dos tumores odontogênicos está intimamente ligada à odontogênese (processo de formação do dente), visto que a origem desses tumores está relacionada com os tecidos dentais, como o epitélio dental, a papila dental e o folículo pericoronário (Barnes *et al.*, 2005).

O ameloblastoma e o tumor odontogênico adenomatóide (TOA) são tumores odontogênicos benignos que acometem os ossos maxilares e cujo tratamento é a completa excisão cirúrgica com osteotomia periférica (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011). O ameloblastoma possui quatro variantes clínico-radiográficas: o extraósseo, o unicístico, o sólido ou multicístico e o desmoplásico. Destes, o extraósseo possui a menor taxa de recidivas e está associado a menor morbidade do paciente, visto que a sua localização é em tecido mole do rebordo alveolar (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011). As outras três variantes se desenvolvem dentro dos ossos maxilares, principalmente em mandíbula (variantes unicística e multicística) (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011) e, portanto, requerem um tratamento mais agressivo. Além disso, as variantes multicística e desmoplásica possuem alto grau de recidivas, pois têm capacidade infiltrativa local (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011).

O carcinoma ameloblástico é um tumor odontogênico maligno raro (Uzawa *et al.*, 2015; Akrish *et al.*, 2007) e pode ser considerado uma evolução maligna dos ameloblastomas intraósseos. Histologicamente, esse tumor, além de ter regiões com histopatologia característica de tumor maligno (pleomorfismo celular e nuclear, núcleo hipercromático, alta taxa de mitose, necrose focal e invasão perineural), também apresenta áreas com características benignas semelhantes aos ameloblastomas (Ward *et al.*, 2007).

Na atualidade, estudos que identificam polimorfismos e sua associação com variações fenotípicas e doenças têm recebido importante atenção de grandes grupos de pesquisas. Nos mamíferos, esses polimorfismos incluem os SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*), regiões de microssatélites e outras repetições, e as variações estruturais como a variação no número de cópias, CNVs (do inglês *copy number variants*) (Girirajan *et al.*, 2011).

Os CNVs são definidos como alterações estruturais (ganho e perda) de um segmento de DNA maior que um kilobase (Kb) presente em número variável de cópias quando comparado ao genoma humano de referência (Feuk *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2006). Os CNVs têm sido reconhecidos como a principal fonte das variações genéticas dentre os indivíduos e ocorrem tanto em pessoas fenotipicamente normais quanto naquelas que manifestam diferentes doenças (Feuk *et al.*, 2006; Stankiewicz *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2009).

Levando em consideração a crescente evidência da participação dos



CNVs na patogênese e evolução de diferentes neoplasias, neste estudo buscamos identificar globalmente os CNVs de DNA genômico nas variantes unicística e multicística de ameloblastoma, TOA e carcinoma ameloblástico.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Odontogênese

A odontogênese é o processo de formação do dente (Yoshida, *et al.*, 1998; Nagai *et al.*, 2001) resultante de interações entre o epitélio oral e o mesênquima formado por células migratórias derivadas da crista neural, também chamado de ectomesênquima (Thesleff *et al.*, 1995; Thesleff *et al.*, 1997). Essa interação epitélio-mesênquima é mediada pela expressão de vários genes e pela transcrição de diferentes fatores de crescimento (Jernvall *et al.*, 2000).

Nos humanos, o desenvolvimento dental se inicia no final da quinta semana de gestação intrauterina através do surgimento da lâmina dental em cada um dos ossos maxilares. Nessa fase, o tipo exato, a posição e a orientação de cada dente já está estabelecida por processos moleculares e celulares (Koussoulakou *et al.*, 2009).

Durante a odontogênese, a lâmina dentária passa por diferentes fases de diferenciação morfofuncional, sendo elas as fases de botão, capuz, campânula, aposição e maturação.

A primeira evidência de que o processo de morfogênese começou é observado quando há o espessamento de uma banda de epitélio oral que posteriormente, forma uma folha na forma de ferradura envolta da margem lateral da cavidade oral (Couborne, 1999). Esse espessamento é conhecido

como o estágio de lâmina e pode ser observado na Figura 1A (Lesot e Brook, 2009). A porção livre dessa banda dá origem a dois processos que invaginam para o interior do mesênquima subjacente (Jernvall *et al.*, 1994; Vaahtokari *et al.*, 1996. Couborne, 1999). O processo mais externo, a lâmina vestibular, irá formar o fundo de saco de vestibulo que demarca as bochechas e o lábio, separando-os da região onde o dente irá irromper. Já o processo mais interno é a lâmina dentária, que irá se desenvolver em forma de botão (Couborne *et al.*, 1999).

A fase conhecida como botão (Figura 1B), corresponde ao estágio em que a lâmina dentária forma projeções com formato semelhante a botões que invaginam em direção ao ectomesênquima subjacente (Bailleul-Forestier *et al.*, 2008; Bath-Balogh e Fehrenbach, 2008; Bei, 2009; Govorko *et al.*, 2010; Katchburian e Arana, 2004; Matalová *et al.*, 2011; Yen e Sharpe, 2008). Nesta fase as células epiteliais periféricas possuem um formato alongado e estão em contato com a membrana basal. Há também a presença de células espalhadas difusamente no interior do botão (Pourtois, 1961; Peterkova *et al.*, 1996). Observa-se também que as células ectomesenquimais próximas à membrana basal se proliferam e se aglutinam ao redor desse botão (Yen e Sharpe, 2008; Govorko *et al.*, 2010). Nessa etapa, ocorre a sinalização para a continuidade do processo de formação do órgão dental, principalmente, em direção do epitélio oral para o ectomesênquima (YU *et al.*, 2008), que por fim, adquire a capacidade de estimular os processos de morfogênese e cito diferenciação (Yen e Sharpe, 2008). Esse estímulo leva a uma proliferação mais intensa das células epiteliais periféricas, que estão em contato com as células ectomesenquimais e o botão muda de conformação e se torna

semelhante a um boné ou casquete (Peters e Balling, 1999; Govorko *et al*, 2010). Tem-se início então, a fase de capuz (Figura 1C).

O estágio de capuz corresponde à fase em que há o aumento da complexidade do epitélio, que passa a ser denominado órgão do esmalte e começa a ocorrer histo e citodiferenciação. O epitélio do órgão do esmalte se diferencia em epitélio interno do órgão do esmalte, em epitélio externo do órgão do esmalte e em retículo estrelado do órgão do esmalte (Lesot e Brook, 2009). No centro do capuz, na porção ectomesenquimal envolvida pelo epitélio odontogênico, é possível observar uma massa de células ectomesenquimais condensadas. Essa massa é denominada de papila dentária e será posteriormente responsável pela formação da dentina e da polpa dentária (Nanci, 2013). Portanto, ao final do estágio de capuz tem-se o germe dentário propriamente dito, que por sua vez, é constituído por um componente epitelial (órgão do esmalte) e um componente ectomesenquimal (papila dentária).

No último estágio da odontogênese, o de campânula (Figura 1D), observa-se que o órgão do esmalte começa a delimitar a papila dental (Lisi *et al*, 2003). Por meio de uma complexa rede de sinalização inter e intracelular, as células do epitélio interno do órgão do esmalte se diferenciam em pré-ameloblastos, que são células cilíndricas altas e com polaridade invertida, ou seja, com os núcleos voltados para o lado oposto à lâmina basal (Bath-Balogh e Fehrenbach, 2012). Após essa transformação celular, os pré-ameloblastos estimulam a diferenciação das células da papila dentária adjacente em odontoblastos através da atuação de alguns componentes da

matriz extracelular e de fatores de crescimento (Schoenwolf *et al.*, 2009). Os odontoblastos diferenciados sintetizam a primeira camada de matriz de dentina (Katchburian e Arana, 2004; Matalová *et al.*, 2011; Bath-Balogh e Fehrenbach, 2012). Acredita-se que a camada de dentina participa da indução da maturação dos ameloblastos, que passam a sintetizar a matriz orgânica de esmalte logo após o início da formação da dentina (Bath-Balogh e Fehrenbach, 2012; Katchburian e Arana, 2004).

O órgão do esmalte originará o esmalte do dente, enquanto a papila dentária originará o complexo dentino-pulpar (Katchburian e Arana, 2004; Peters e Balling, 1999; Bath-Balogh e Fehrenbach, 2012). Ao redor do capuz, nota-se uma área condensada de células ectomesenquimais, que darão origem ao folículo dentário, que são responsáveis por formar os componentes do periodonto, através dos cementoblastos, fibroblastos e osteoblastos (Bath-Balogh e Fehrenbach, 2012; Bluteau *et al.*, 2008; Couborne, 1999; Huang *et al.*, 2010; Katchburian e Arana, 2004; Yen e Sharpe, 2008).

Na fase de aposição e maturação, ocorre a formação do esmalte, conhecido como amelogênese (Nanci, 2013), a deposição dessa matriz e a calcificação completa do esmalte dental. A amelogênese ocorre em três estágios: pré secreção, secreção e maturação. No primeiro estágio, o de pré secreção, há a diferenciação das células do epitélio interno do órgão do esmalte em ameloblastos e a organização dessas células diferenciadas de forma alinhada uma ao lado da outra (Nanci, 2013). No estágio de secreção, há primeiramente a liberação de uma camada inicial sobre a camada de dentina recém secretada (pré-dentina) que não contém prismas de esmalte.

O contato desse esmalte recém secretado e a pré-dentina leva a formação da junção amelo-dentinária. A partir daí, há uma mudança na conformação interna dos ameloblastos, que passam a secretar matriz inorgânica (esmalte com prismas) e passam a se afastar cada vez mais dessa junção. Ao contrário dos ameloblastos, que vão se afastando à medida que há deposição de matriz inorgânica de esmalte, os odontoblastos formam extensões celulares ao longo da pré-dentina, chamado de processos odontoblásticos, que formarão os túbulos dentinários. No final, os corpos celulares dos odontoblastos irão integrar a polpa dentária, enquanto os corpos celulares dos ameloblastos estarão envolvidos no processo de erupção e mineralização, sendo perdidos após a erupção. Após a liberação completa da matriz de esmalte com prismas, os ameloblastos retornam a sua forma original e secretam uma última camada sem prismas (Nanci, 2013). No último estágio, o de maturação, ocorre o enrijecimento do esmalte (Nanci, 2013).

Após a formação da coroa e com o início da erupção dentária, há a formação da raiz, que é proveniente da porção mais cervical do órgão do esmalte, conhecida como loop cervical, composta pelos epitélios interno e externo do órgão o esmalte. Esta estrutura cresce e penetra o mesênquima do folículo dentário circundante, alongando-se e afastando-se da coroa, de forma a isolar o tecido da papila dentária e formar a bainha radicular de Hertwig. A função desta bainha é dar forma à raiz e induzir a formação de dentina de forma contínua à dentina da coroa (<https://teratologias.wordpress.com/about/embriologia-dentaria/>, acessado em 08/12/2015). A formação da dentina na porção radicular ocorre quando as



espessamento de uma banda do epitélio oral (A). Estágio de botão (B). Estágio de capuz (C). Estágio de campânula (D). Lâmina dentária(LD); epitélio oral (EO); epitélio externo do órgão do esmalte (EEOE); epitélio interno do órgão do esmalte (EIOE); nó primário do esmalte (NPE); nó secundário do esmalte (NSE); retículo estrelado (RE); estrato intermediário (EI); papila dental (PD). Fonte: Lesote Brook, 2009.

## 2.2 Tumores Odontogênicos

Os tumores odontogênicos podem ser originadas do epitélio odontogênico que permaneceu retido nos tecidos moles adjacentes ou nos ossos maxilares (Regezi *et al.*, 2012). Por isso, podem ser intraósseos ou localizados no tecido mole (gengiva), sobrepondo os ápices dos dentes ou a mucosa alveolar nas regiões edêntulas, sendo classificados neste caso como extraósseos ou periféricos (Barnes *et al.*, 2005). Os tumores odontogênicos formam um grupo heterogêneo de lesões que variam desde uma proliferação tecidual não neoplásica ou hamatomatosa à neoplasias benignas e malignas com potencial metastático (Barnes *et al.*, 2005).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica histologicamente os tumores odontogênicos em malignos e benignos. A classificação das lesões benignas é baseada na origem histogenética do tecido odontogênico envolvido:

-Epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro sem ectomesênquima odontogênico;

-Epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico;



-Mesênquima e/ou ectomesênquima odontogênico com ou sem epitélio odontogênico;

-Lesões relacionadas ao osso;

-Outros tumores.

Neville, Damm, Allen e Bouquot (2011), adotam uma classificação mais didática dos tumores odontogênicos, dividindo os tumores odontogênicos em:

- tumores do epitélio odontogênico, que são aqueles tumores compostos por apenas por epitélio odontogênico sem qualquer participação do ectomesênquima;

- tumores odontogênicos mistos, que são compostos tanto por epitélio odontogênico quanto por elementos ectomesenquimais e;

- tumores do ectomesênquima odontogênico, composto principalmente por elementos ectomesenquimais.

Dentre os tumores do epitélio odontogênico estão os ameloblastomas e suas variantes sólida ou multicística, extraóssea, desmoplásica e unicística; tumor odontogênico escamoso; tumor odontogênico epitelial calcificante; ameloblastoma maligno; carcinoma ameloblástico; ceratocisto odontogênico e o tumor odontogênico adenomatóide. Os tumores odontogênicos mistos incluem o fibroma ameloblástico; o fibro-odontoma ameloblástico; o fibrossarcoma ameloblástico; o odontoameloblastoma e o odontoma. O grupo dos tumores do ectomesênquima odontogênico, é constituído pelo fibroma

odontogênico central e periférico; pelo tumor odontogênico de células granulares; pelo mixoma odontogênico e pelo cementoblastoma.

### 2.3 Ameloblastoma

O ameloblastoma é o segundo tumor odontogênico benigno mais comum (Reichart *et al.*, 1995). É uma lesão de crescimento lento, localmente infiltrativa, que possui alta taxa de recidiva se não tratada corretamente (Barnes *et al.*, 2005; Morgan, 2011). De acordo com Gardner (1996) a localização do ameloblastoma na maxila posterior é preocupante, pois além da tábua óssea dessa região ser extremamente fina, o que diminui a resistência para a infiltração tumoral, essa região está muito próxima da órbita, da fossa pterigomaxilar e do crânio, que são estruturas fundamentais no indivíduo. Porém, apesar de poder ocorrer nessa região, os ameloblastomas são mais comumente observados na mandíbula (cerca de 80%), especialmente na região posterior (terceiros molares) (Barnes *et al.*, 2005; Chappelle *et al.*, 2004).

Clinicamente, as lesões podem variar de lesões pequenas e bem delimitadas a lesões maiores. Dor e parestesia são sintomatologias raras. Pode ocorrer reabsorção radicular de dentes que se localizam adjacentes a esse tumor. Algumas vezes, a lesão pode estar associada à um dente incluso (Barnes *et al.*, 2005; Gold, 1991).

Os ameloblastomas são tumores que se originam do epitélio odontogênico, podendo ser dos remanescentes da lâmina dentária, do órgão

do esmalte em desenvolvimento, do revestimento epitelial de um cisto odontogênico ou das células da camada basal da mucosa bucal (Barnes *et al.*, 2005). Podem ser intraósseos ou extraósseos. As formas intraósseas de ameloblastoma são o ameloblastoma sólido, multicístico, unicístico e a variante desmoplásica. A variante extraóssea é representada pelo ameloblastoma periférico.

O tratamento do ameloblastoma compreende a excisão cirúrgica do tumor. Quando extraósseo, a chance de recidivar é pequena, pelo fato do mesmo se encontrar aderido à mucosa. Já nas variantes intraósseas é aconselhado fazer o debridamento em torno do tumor utilizando-se a broca após a sua retirada por ressecção ou curetagem da lesão (variante multicística), devido a natureza infiltrativa e, portanto, mais recidivante dessa variante (Gardner, 1996).

Desde 1995, o índice de proliferação celular do ameloblastoma é investigado (Slootweg, 1995). A positividade nuclear para Ki67 está localizada, em sua maioria, nas células tipo ameloblastos da periferia em ameloblastomas sólidos e nas células basais de ameloblastomas unicísticos. Essa marcação não foi observada no retículo estrelado dos ameloblastomas e também no retículo estrelado dos dentes em formação, o que sugere que o crescimento desse tumor está concentrado em áreas periféricas, onde há as células tipo ameloblastos (Jääskeläinen *et al.*, 2002; Bologna-Molina *et al.*, 2008). Em 2009, Gomes *et al.*, demonstrou que os ameloblastomas sólidos/ multicísticos possuem origem monoclonal o que sugere que uma mutação inicial ou uma alteração molecular é o primeiro evento que acontece

para o desenvolvimento desse tumor.

A mutação *BRAF V600E* é a mutação mais frequente descrita em ameloblastomas (Brown *et al.*, 2015; Sweeney *et al.*, 2014). Em 2014, Sweeney *et al.* realizaram um estudo com 28 ameloblastomas em busca de mutações somáticas em genes da via *Hedgehog* e da via MAPK (do Inglês *mitogen-activated protein kinase*). Foi observada a presença de mutação no gene *SMO* em 39% e no gene *BRAF* em 46% das amostras, além de uma correlação significativa entre o tipo de mutação e a localização do ameloblastoma, sendo a mutação em *SMO* mais prevalente na maxila (9/11). Em outro estudo com 84 ameloblastomas e 40 outros tipos de tumores odontogênicos, Brown *et al.* (2014) observaram que 62% dos ameloblastomas apresentavam mutação no gene *BRAF*. Ensaio imunohistoquímico demonstraram que 100% desses possuíam a proteína mutada. Segundo Brown *et al.* (2015), a mutação do *BRAF* é específica para ameloblastomas e sugere a sua utilização como marcador potencial para o diagnóstico. Um estudo *in vitro* mostrou que mutações *BRAFV600E* levam a uma maior resistência à drogas alvo para *EGFR* (Kurppa *et al.*, 2014), o que pode gerar uma maior dificuldade no tratamento de diversos tumores que utilizam essa via como alvo para a remissão tumoral.

### 2.3.1 Ameloblastoma unicístico

Essa variante foi primeira vez descrita por Robinson e Martinez (1977) como um tipo especial de ameloblastoma. Se apresenta como um cisto,

normalmente assintomático, que pode levar ao abaulamento ósseo na região de acometimento (Gardner, 1996). Muitas vezes é confundido clinicamente com um ceratocisto odontogênico, devido à suas semelhanças clínicas e radiológicas (Isacsson *et al.*, 1986, Abrams *et al.*, 1990) ou um cisto dentífero (Isacsson *et al.*, 1986, Abrams *et al.*, 1990; Gardner, 1996) visto que a maioria dessas lesões estão associadas a um dente incluso (Gardner, 1996). Quando associada a um elemento dental não erupcionado, mais de 80% são observadas juntas à terceiros molares inferiores. A localização mais comum dessa variante é na região posterior de mandíbula (mais de 90% dos casos) (Barnes *et al.*, 2005).

Radiologicamente, esse tumor se apresenta como uma lesão unilocular, bem delimitada, radiolúcida, podendo estar associada a um dente incluso e podendo causar reabsorção radicular em alguns casos (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011; Philipsen *et al.*, 1998).

Macroscopicamente, a lesão pode variar de tamanho e quando removida intactamente se assemelha a um cisto e pode estar associado a um dente (Barnes *et al.*, 2005).

Histologicamente, podem ser encontradas três variantes: luminal, em que o tumor está confinado na superfície luminal da cápsula cística; intraluminal, em que os nódulos preenchem o interior da luz do cisto e; variante mural, em que a parede do cisto é infiltrada pelo epitélio típico folicular ou plexiforme (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011; Philipsen *et al.*, 1998).

Como apresentam um padrão cístico e, portanto, bem delimitado,

recidivas são incomuns após a completa excisão cirúrgica. Sendo assim, essa variante possui um melhor prognóstico, mas ainda requer um acompanhamento por parte do profissional (Robson *et al.*, 1977; Gardner *et al.*, 1984; Leider *et al.*, 1985; Ackerman *et al.*, 1988; Reichart *et al.*, 1995; Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Ameloblastoma multicístico

A variante multicística ou sólida do ameloblastoma possui um crescimento lento, é localmente infiltrativa e apresenta alta taxa de recorrência quando não removida adequadamente. Sua etiologia é desconhecida, mas acredita-se que essa lesão seja causada devido a desregulação de vários genes relacionados ao desenvolvimento dos dentes. Esse tumor é observado somente nos ossos maxilares e aproximadamente 80% ocorre em mandíbula, sendo que a maior predileção é pela região posterior. Clinicamente, um tumor pequeno pode ser assintomático. Em muitos casos, pode ser observado o abaulamento ósseo na região de acometimento.

Radiograficamente pode-se observar radiolucidez uni ou multilocular com bordas mal definidas. É comum a reabsorção das raízes de dentes adjacentes. Essa variante se espalha pelos espaços do osso medular e pode romper com as bordas do osso cortical. Quando o tumor se encontra na região posterior de maxila, a lesão tende a obliterar o seio maxilar e a se estender para o interior do crânio (Barnes *et al.*, 2005).

Histologicamente, há cinco tipos: o folicular, em que se observam ilhas de epitélio odontogênico em um estroma fibroso; o plexiforme, em que notam-se cordões ou placas de epitélio odontogênico anastomosados; o acantomatoso, quando observa-se alguns depósitos de ceratina nas porções centrais das ilhas de epitélio odontogênico; o padrão granular, em que algumas células epiteliais se transformam em células granulares e; por último, o de células basais, em que observa-se ninhos de células basais uniformes sem a presença de retículo estrelado no centro desses ninhos. Nota-se que as células basais da periferia dos ninhos tendem a ser cúbicas e não colunares (Neville *et al.*, 2011; Philipsen *et al.*, 1998). Segundo Neville *et al.* (2011), os padrões histopatológicos mais comuns são os folicular e plexiforme. Estudos mostram que há correlação entre os subtipos histológicos com a maior agressividade e a taxa de recorrência do ameloblastoma (Anjos *et al.*, 2003; Braunshtein *et al.*, 2003; Deshpande *et al.*, 2000; Reichart *et al.*, 1995). Anjos *et al.* (2003) e Reichart *et al.* (1995) observaram maior recidiva nos casos cujas variantes eram folicular e plexiforme, porém ambos concordam que independente da variante histológica, a conduta clínica deve ser a mesma.

#### 2.4 Carcinoma ameloblástico

O termo “carcinoma ameloblástico” foi introduzido por Elzay em 1982. Em 2005, a OMS definiu esse tumor como sendo uma malignidade odontogênica rara que combina as características histológicas de um ameloblastoma com atipia citológica, mesmo sem a presença de metástase. Pode ser proveniente de um desenvolvimento de novo (primário) ou através

de uma transformação maligna de uma ameloblastoma (secundário).

Histologicamente, o carcinoma ameloblástico do tipo primário possui características semelhantes ao do ameloblastoma, mas possui citologia atípica (Barnes *et al.*, 2005). Aproximadamente 2/3 dessas lesões correm na mandíbula, preferencialmente na região posterior e não há predileção de gênero. Geralmente, apresenta-se radiograficamente como uma área radiolúcida mal definida. Clinicamente, pode ser que ocorra expansão da cortical óssea bem como perfuração (Neville *et al.*, 2011).

Segundo Barnes *et al.* (2005), o carcinoma ameloblástico do tipo secundário (desdiferenciado) é dividido em duas variantes, a intraóssea e a periférica. A intraóssea é assim denominada quando as características morfológicas do ameloblastoma típico são observadas. Na transformação maligna nota-se principalmente mudanças clínicas, ou seja, observa-se a expansão da cortical óssea tanto bucal como lingual, com invasão nos tecidos moles adjacentes. Nota-se a maior prevalência dessa lesão em indivíduos depois da sétima década de vida. A segunda variante, periférica, é a transformação maligna do ameloblastoma benigno extraósseo. A prevalência dessa variante nos gêneros é de 1:1. Clinicamente, ele se apresenta como uma massa de tamanho variável, podendo apresentar irregularidades na sua superfície como concavidades, ser séssil ou pediculado, podendo apresentar reabsorção óssea da região alveolar (Neville *et al.*, 2011). Radiograficamente apresenta-se como uma radiolucidez entre as raízes dos dentes, podendo causar afastamento entre elas. Histologicamente se apresenta como uma ameloblastoma benigno, porém



possui características de malignidade como áreas de necrose, figuras de mitose e pleomorfismo celular e nuclear (Neville *et al.*, 2011).

Em um estudo realizado por Diniz *et al.* (2015) foi observado a presença de mutação *BRAFV600E* em carcinomas amelobásticos, porém em menor proporção do que é descrito para ameloblastomas. Esses achados levantam a questão se alguns dos carcinomas ameloblásticos positivos para *BRAFV600E* poderiam ter surgido da progressão maligna dos ameloblastomas com essa mesma mutação ou se apenas teriam uma base molecular semelhante.

## 2.5 Tumor odontogênico adenomatóide (TOA)

O TOA é um tumor de crescimento lento e progressivo e representa de 2% a 7% de todos os tumores odontogênicos (Rick, 2004; Barnes *et al.*, 2005; Philipsen *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2011). A patogênese desse tumor é desconhecida. Há autores que sugerem que esse tumor seja proveniente do órgão do esmalte (Lucas, 1957; Shear, 1962), do revestimento epitelial do cisto dentífero (Bhaskar, 1964), resto epitelial de Malassez de dentes decíduos ou permanentes (Chambers, 1973; Thoma, 1955) e de remanescentes da lâmina dental (Courtney *et al.*, 1975; Shear, 1962). Em 1992, Philipsen *et al.* levantaram a hipótese de que o *gubernaculum dentis*, que consiste em uma banda fibrosa que percorre o canal ósseo, talvez estivesse associada no processo de formação dos TOAs.

O TOA localiza-se preferencialmente na região anterior de maxila

(Rick, 2004; Barnes *et al.*, 2005; Philipsen *et al.*, 2007; Neville *et al.*, 2011) e pode ser intraósseo ou extra-ósseo, sendo que o primeiro é mais comumente observado. Quando intraósseo, pode estar associado a um dente incluso, especialmente caninos e a expansão da cortical óssea e deslocamento de dentes podem estar presentes.

A maioria desses tumores são assintomáticos. Radiograficamente apresenta-se como uma lesão radiolúcida unilocular, bem definida podendo ou não estar ao redor da coroa do dente (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011). Histologicamente, o tumor é constituído por células epiteliais fusiformes, que formam ninhos, cordões ou massas celulares num escasso estroma fibroso (Neville *et al.*, 2011). Por ser um tumor envolto por uma capsula fibrosa, a enucleação completa é facilitada e a recorrência é rara (Barnes *et al.*, 2005; Neville *et al.*, 2011).

## 2.6 Copy Number Variants (CNV)

O termo *copy number variant* (CNV) se refere a variações estruturais (ganhos e perdas) envolvendo fragmentos de DNA maiores do que um kilobase (Kb) (Feuk *et al.*, 2006; Freeman *et al.*, 2006). Os CNVs são resultados de deleções (perda), duplicações (ganho), inserções (comumente ganhos) ou translocações/ inversões que podem levar ao ganho ou perda de sequências próximas aos *breakpoints* (Feuk *et al.*, 2006). As alterações mais comuns são as de perda e ganho e, geralmente, elas levam à alteração da sensibilidade de genes (Roa *et al.*, 1991), quando afeta a dosagem ou a sua regulação (Stranger *et al.*, 2007). Os CNVs que envolvem fragmentos

genômicos que contêm um ou mais genes dose-sensitivos podem resultar em distúrbios e outras doenças complexas como autismo, câncer, deficiências imunológicas e transtornos neurodegenerativos e neuropsiquiátricos e o câncer (Nishioka *et al.*, 2006; Rovelet-Lecrux *et al.*, 2006; Farrer *et al.*, 2004; Gonzalez *et al.*, 2005; Cook *et al.*, 2008; Sabat *et al.*, 2007; Shaik *et al.*, 2009).

Os rearranjos genômicos deram origem ao termo “desordens genômicas” (Inoue *et al.*, 2002). Pelo fato de envolverem um grande número de CNVs, é comum encontrar nas desordens genômicas muitos genes duplicados ou deletados e é isso que diferem as desordens das mutações genéticas convencionais, já que nestas últimas, somente uma única região codificante de um gene é afetada (Shlien *et al.*, 2010). De acordo com Shlien *et al.* (2010), os genes que contidos em regiões de CNVs consideradas patogênicas (que levam à doença e não estão presentes em indivíduos fenotipicamente normais) podem estar associados ao fenótipo clínico apresentado pela doença.

Tradicionalmente, duas técnicas são empregadas para detectar os CNVs: FISH (*Fluorescence in situ hybridization*) e aCGH (*array comparative genomic hybridization*). Porém, por causa da baixa resolução dessas duas técnicas (até 5,10Mbp para o FISH e 10,25Kbp com um milhão de probes para aCGH), CNVs pequenos continuam difíceis de serem detectados (Yoon *et al.*, 2009).

Em 2004, após a incorporação de técnicas de alta resolução para arranjo de DNA (DNA array), foi possível detectar uma grande quantidade de

CNVs dispersos no genoma, o que culminou na afirmação de que variações genômicas inter indivíduos existe, especialmente entre aqueles indivíduos considerados saudáveis (lafrate *et al.*, 2004; Sebat *et al.*, 2004, Coughlin *et al.*, 2012). Segundo Shlien *et al.* (2010), essa variação afeta pelo menos 10% do genoma humano. Muitos estudos foram realizados e o acúmulo de dados de CNV de pacientes considerados “saudáveis” resultaram no estabelecimento de uma base de dados pública como a *Database of Genomic Variants* (DGV) (lafrate *et al.*, 2004). A empresa Affymetrix, criadora da plataforma CytoScan HD (CA, US), também possui um banco de dados com indivíduos fenotipicamente normais, o *Affymetrix Database of Variants* (aDGV), composto por 2,421 indivíduos fenotipicamente normais avaliados pela sua plataforma (<http://www.affymetrix.com/support/technical/manuals.affx>, visitado em 07/12/2015).

Um dos métodos mais robustos de identificação de CNV se dá pela plataforma CytoScan HD (Affymetrix, CA, US), que utiliza marcadores polimórficos (SNPs) e não polimórficos na hibridização de microarray. Além de perda e ganho, essa plataforma também é capaz de detectar perda de heterozigossidade do tipo copy neutral (*cnLOH*). Acredita-se que a *cnLOH* seja o resultado de uma recombinação mitótica ou de uma não disjunção nas células somáticas tumorais (Teh *et al.*, 2005). Essa recombinação pode levar a uma deleção heterozigota de um alelo ou a duplicação de um cromossomo ou região cromossomal materno ou paterno.

A plataforma CytoScan HD cobre todo o genoma com alta

especificidade e densidade. São utilizados mais de 2,6 milhões de marcadores, sendo que destes, 1,9 milhões são não polimórficos. Também inclui 750.000 SNPs.

Estudos recentes utilizam dessa técnica para detectar CNVs em diferentes tumores malignos como linfomas (Yan *et al.*, 2014), câncer colorretal (Azharet *al.*, 2014), câncer cervical (Medina-Martinez *et al.*, 2014) e câncer renal (Kovac, *et al.*, 2015).

### **3. JUSTIFICATIVA**

O ameloblastoma, o carcinoma ameloblástico e o TOA são tumores odontogênicos epiteliais de etiopatogênese desconhecida. Embora o ameloblastoma e o TOA sejam lesões benignas, estes tumores podem levar a destruição óssea dos maxilares, causando deformidades faciais e alterações funcionais do sistema estomatognático, sendo que muitas vezes acometem indivíduos jovens. Os ameloblastomas unicísticos e multicísticos apresentam comportamento clínico diferente, sendo que os unicísticos são menos agressivos. Faz-se necessário a investigação das alterações moleculares envolvidas na patogênese destes tumores. Jääskeläinen e colaboradores (2002) e Toida e colaboradores (2005) avaliaram por meio da

hibridização genômica comparativa (CGH) e/ou hibridização fluorescente *in situ* (FISH) a presença de CNVs pontuais em ameloblastomas. No entanto, estes estudos investigaram ganhos e perdas pontuais específicos e isolados em ameloblastomas, utilizando regiões alvo pré-estabelecidas. A comparação entre o perfil de alterações do número de cópias genômicas, através da avaliação genômica ampla dos ameloblastomas, carcinomas ameloblásticos e TOAs pode levar a uma melhor compreensão da patogênese molecular dos tumores odontogênicos epiteliais, assim como levantar dados que auxiliem no entendimento da evolução genômica destas neoplasias.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 Objetivo geral

Identificar alterações no número de cópias de DNA no genoma de ameloblastomas, carcinoma ameloblástico e TOAs.

### 4.2 Objetivos específicos

- Avaliar se há diferenças no perfil de alteração de CNVs entre o ameloblastoma unicístico e multicístico, o carcinoma ameloblástico e o TOA.
- Levantar quais os genes contidos nas regiões de CNVs raras com possível relevância para a patogênese dos tumores odontogênicos estudados.
- Avaliar a perda de heterozigidade do tipo *copy neutral* (cnLOH) nesses grupos de tumores.

## 5. METODOLOGIA

### 5.1 Coleta das amostras

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/656.816) (**ANEXO 1**). A coleta das amostras frescas de ameloblastoma, TOA e do carcinoma ameloblástico foram realizadas após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**ANEXO 2**), na clínica de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Foi utilizada uma amostra de conveniência.

As coletas foram feitas durante a biópsia incisional, utilizando material estéril. Somente após a biópsia excisional e com a confirmação do diagnóstico histopatológico é que os espécimes foram incluídos na pesquisa. No momento da coleta, o material foi colocado em Tissue-Tek OCT Compound (Sakura Finetek, US, INC) e armazenada em nitrogênio líquido a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 5.2 Análise da variação de CNVs

#### 5.2.1 Extração de DNA

Cortes no criostato foram feitos para confirmar a presença de epitélio no material congelado.



As amostras de ameloblastoma unicístico (n=3), multicístico (n=4), de carcinoma ameloblástico (n=1) e do TOA (n=4) tiveram o DNA isolado com o uso do kit QIAamp bood and tissue (Qiagen, Valencia, CA) de acordo com instruções do fabricante. As mesmas foram ressuspendidas utilizando-se o tampão AE do kit e quantificadas no nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA). As amostras selecionadas apresentaram o critério de pureza de ~1.8 para a relação 260/280 e entre 1.8-2.2 para a relação 260/230 (como mostrado na Tabela 1). Além disso as amostras apresentaram uma concentração mínima de 50ng/ul de DNA genômico, conforme critérios recomendados pelo fabricante do kit para avaliação de cariótipo molecular.

#### 5.2.2. Avaliação de cariótipo molecular

A avaliação do cariótipo foi realizada no laboratório CIPE, AC Camargo Cancer Center, São Paulo/Brasil.

A avaliação de CNVs e *cn*LOH foi feita usando o CytoScan HD Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA), uma plataforma de microarray com alta densidade, seguindo os protocolos dados pelo fabricante. Essa plataforma contém aproximadamente 750.000 SNPs e 1,9 milhões de sondas de oligonucleotídeos e tem sensibilidade superior a 99%, podendo detectar com segurança variações no número de cópias de 25-50kb kb em todo o genoma em alta especificidade. Os marcadores de número de cópias são reconhecidos por cobrirem todos os genes da base de dados do OMIM e RefSeq.

Em resumo, o DNA genômico total é digerido, amplificado e purificado e seguido de fragmentação. Em seguida, os fragmentos de DNA são marcados com biotina na extremidade 3'. O DNA é então colocado para hibridizar com as sondas da micromatriz presente no Chip Affymetrix, lavado e corado. Para análise da hibridização, é realizado a digitalização dos sinais do Chip seguido de interpretação.

Detalhadamente, 500 ng DNA genômico foram digeridos com a enzima Nsp1 (CytoScan™ Assay Kit, Affymetrix, CA, US) por 2 horas a 37°C e, posteriormente, purificado e ligado com primers adaptadores a 16°C por 12-16 horas. Os amplicons foram gerados por PCR, utilizando primers fornecidos pelo fabricante (Affymetrix, CA) e foram colocados no termociclador. O programa utilizado no termociclador para o PCR foi: 94°C por 3 minutos e 35 ciclos de 94°C por 30 segundos, 60°C por 45 segundos e 65°C por 1 minuto. A extensão foi à 68°C por 7 minutos. Os produtos do PCR foram novamente purificados e digeridos com DNaseI por 35 minutos à 37°C para fragmentar o DNA amplificado. Este DNA fragmentado foi, posteriormente, rotulado (labeling) com biotina através do terminal desoxi-nucleotideo transferase (TdT) por 4 horas a 37°C. 250 microgramas do DNA fragmentado foi hibridizado com o chip pré calibrado do fabricante à 50°C por 18 horas. Na etapa seguinte o chip foi lavado no GeneChip Fluidics Station 450 (Affymetrix) e corados com reagentes Affymetrix GeneChip Stain.

As análises dos resultados foram feitas de forma cega em relação aos diagnósticos, por um examinador experiente. Os resultados foram analisados utilizando o software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) 3.1. Esse software,

fornecido gratuitamente pela Affymetrix, Inc. (Santa Clara, CA, USA), permite a análise visual minuciosa das variações no número de cópias de DNA no genoma, facilitando a exclusão dos falsos positivos e a classificação das variações em comuns ou raras. Essas aberrações incluem perda ou ganho no número de cópias e *cnLOH*. A perda de heterozigiosidade identificada é a do tipo *copy neutral(cnLOH)*, também conhecida como dissomia uniparental. Nesse tipo de perda, o indivíduo recebe duas cópias de um cromossomo ou uma parte de um cromossomo de um dos pais, sem que haja a cópia do cromossomo do outro progenitor. Esse erro é considerado como não clonal ou constituinte quando ocorre na meiose I ou II do desenvolvimento embrionário e adquirido (clonal) quando ocorre devido ao *crossing over* que podem acontecer durante a multiplicação das células ao longo da vida.

Para definir ganhos de DNA genômico, foram consideradas regiões com um mínimo de 50 marcadores. Para perda, foram considerados 25 marcadores. Não há limites para um número máximo de marcadores para perda ou ganho. As regiões de *cnLOH* somente foram consideradas quando o segmento era maior que 5000kb.

Na maioria das alterações observadas foi possível a identificação dos genes, pseudogenes e/ou dos RNAs não-codificantes. Essa identificação acontece devido à quantidade de sondas que estão presentes dentro do chip. As alterações genômicas foram comparadas com o *Database of Genomic Variants* (DGV, <http://dgv.tcag.ca/dgv/app/home>, atualizado em julho de 2015) e com o *Affymetrix Database of Genomics Variants* (aDGV). O aDGV foi construído a partir da avaliação do número de cópias de 2,421 indivíduos

considerados fenotipicamente normais utilizando a mesma plataforma utilizada nesse estudo. A interpretação clínica dos CNVs (benigno, significância incerta ou patogênico) foi realizada considerando o tamanho, o tipo (ganho ou perda), os genes contidos nessa região, o padrão de herança e a frequência em indivíduos normais (Kearney *et al.*, 2011). A variação foi considerada rara quando descrita em uma frequência menor que 0.5% no aDGV e 0.05% no DGV. CNVs raros foram considerados novos quando não descritos nas duas bases de dados (aDGV e DGV). Para cada alteração de perda ou ganho genômico classificadas como raras e que foi possível a identificação do gene foram pesquisadas na literatura as implicações e a relevância da mesma. Após a análise individual de cada região cromossômica de cada amostra, os dados de ganhos e perdas genômicas e de *cnLOH* foram agrupados de acordo com o diagnóstico da lesão, afim de se avaliar a existência um padrão de alteração característico de ameloblastomas uni ou multicístico, de TOA ou de carcinoma ameloblástico.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Resultados da extração de DNA

Tabela 1: Concentração das amostras e os valores dos critérios de pureza.

Amostra	Concentração(ng/ul)	260/280	260/230
#1	222,8	2,05	1,53
#2	50,5	1,96	0,8
#3	173,3	1,99	1,85
#4	260,0	1,97	1,82
#5	176,9	1,92	1,09
#6	126,2	2,00	1,60
#7	71,3	1,80	1,50
#8	550,4	1,90	2,00
#9	61,6	1,97	0,78
#10	57,3	1,92	1,06
#11	176,9	1,92	1,09
#12	180,6	1,80	1,50

### 6.2. Amostras analisadas

Das doze amostras submetidas ao experimento, apenas oito puderam ser analisadas (#2, #3, #4, #7, #8, #9, #11 e #12). Os resultados das outras quatro foram descartados devido à quantidade de ruído durante o escaneamento do chip, impossibilitando, assim, a distinção de alterações reais ou não. Na Tabela 2 pode-se observar quais lesões foram incluídas

bem como o código atribuído a cada uma delas e os dados clínico-patológicos.

Tabela 2: Dados clínico-patológicos das amostras analisadas no experimento Cytoscan HD.

Amostra	Diagnóstico	Idade	Gênero	Localização
#1	Ameloblastoma unicístico	10	Feminino	Mandíbula posterior
#2	Ameloblastoma unicístico	10	Feminino	Mandíbula posterior
#3	Ameloblastoma multicístico	22	Feminino	Mandíbula posterior
#4	Ameloblastoma multicístico	28	Masculino	Mandíbula posterior
#5	TOA	6	Feminino	Maxila anterior
#6	Carcinoma ameloblástico	16	Masculino	Mandíbula posterior
#7	TOA	12	Feminino	Maxila
#8	Ameloblastoma multicístico	33	Feminino	Mandíbula posterior

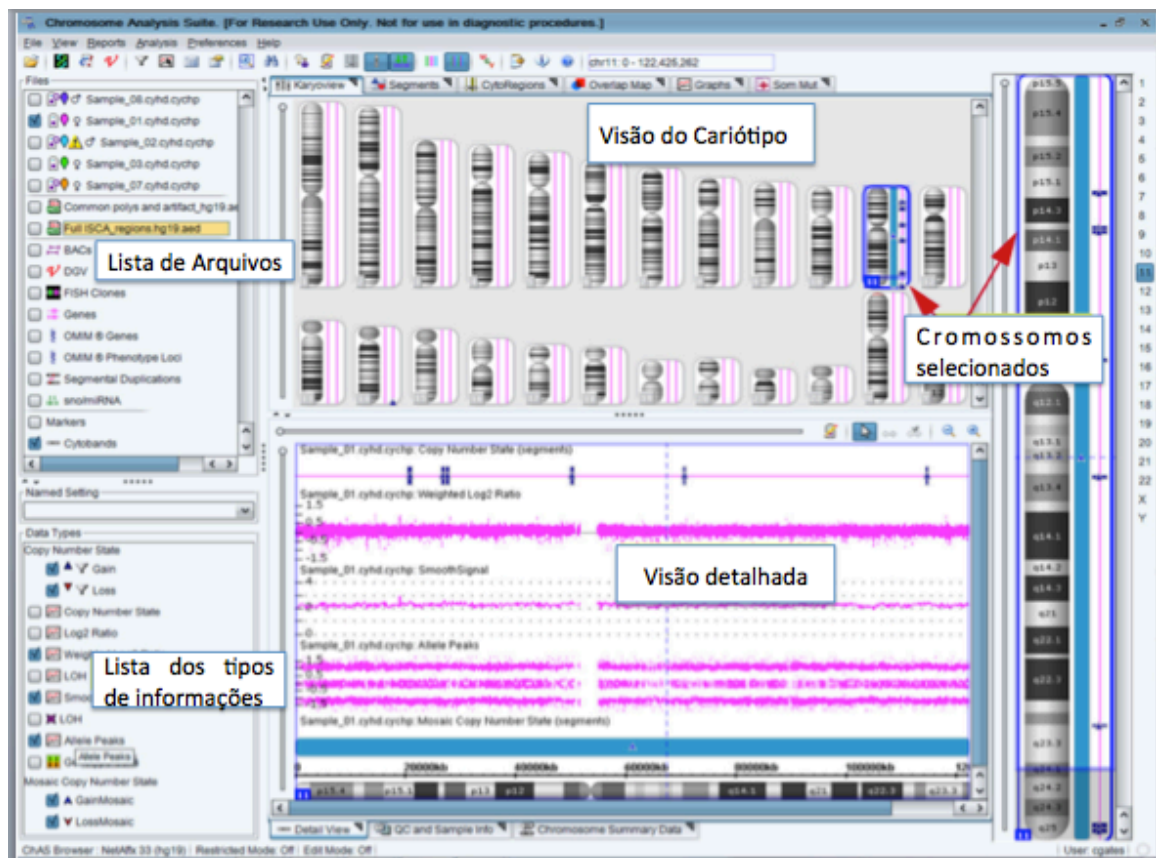
A amostra #5 é de um paciente comTOAs múltiplos

As alterações genômicas de cada uma das oito amostras listadas acima foram analisadas separadamente e os resultados encontrados foram descritos de acordo com o que foi encontrado para cada grupo de amostras.

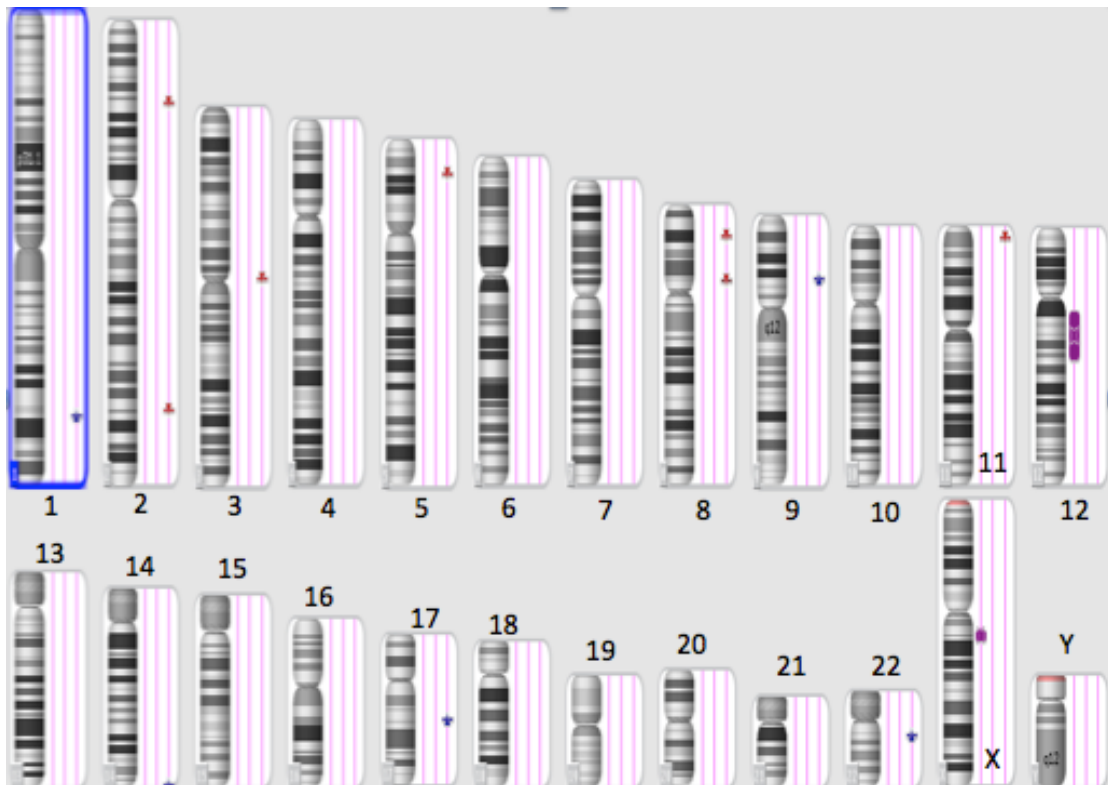
### 6.3. Dados fornecidos pelo *Chromosome Analysis Suite*

O *layout* da tela de análise das amostras do software *Chromosome Analysis Suite* (ChAS) 3.0, mostra uma visão geral das alterações encontradas, como pode ser observado na Figura 2. Na visão do cariótipo, as diferentes alterações genômicas encontradas são identificadas por

marcações de cores diferentes que aparecem paralelamente à região das citobandas cromossômicas em que a alteração está presente. As marcações em azul representam ganho, as que estão em vermelho representam perda e as que estão em roxo, *cnLOH* (Figura 3).



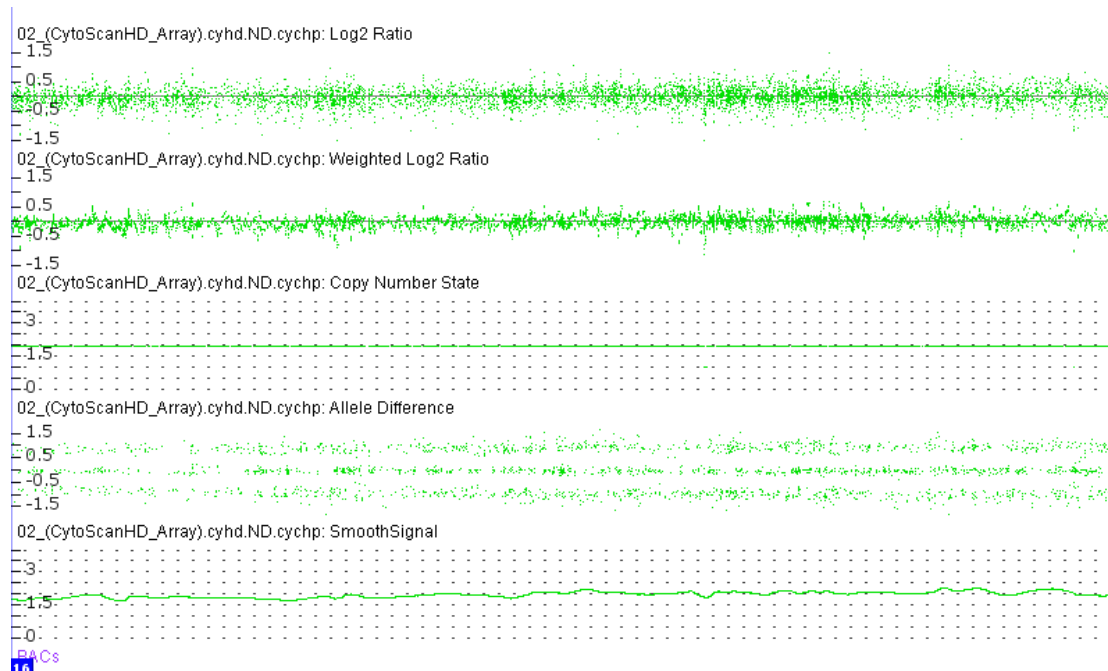
**Figura 2:** Layout da tela de análise do software ChAS.



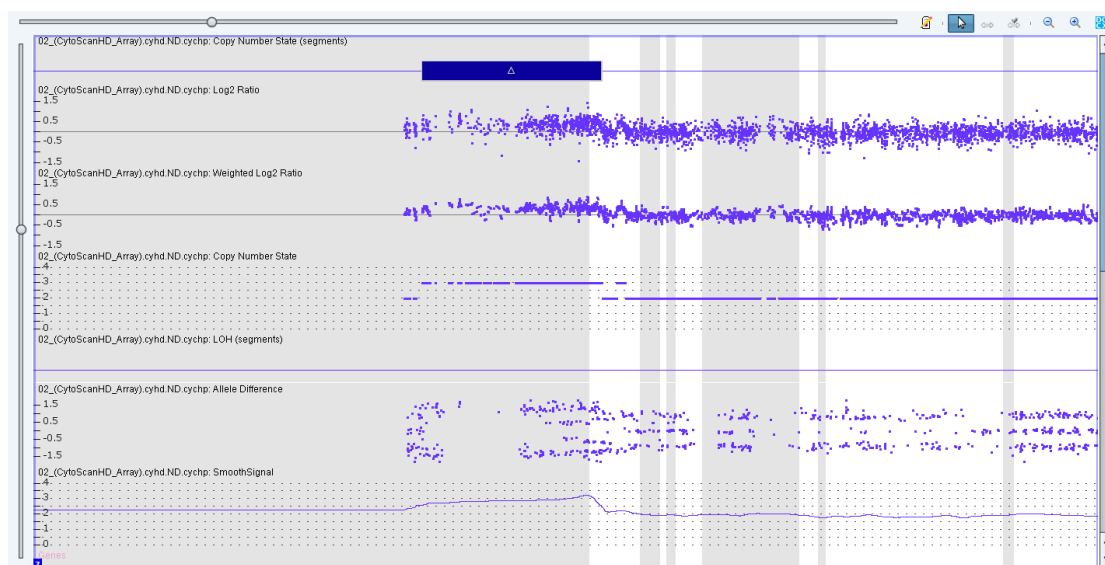
**Figura 3:** Representação gráfica do cariótipo da amostra #2 após análise. Cariótipo do ameloblastoma unicístico (amostra #2) em que foram encontrados os três tipos de alteração: nos cromossomas 1, 9, 14, 17 e 22 há ganho (azul); nos cromossomas 2, 3, 5, 8 e 11 há perda (vermelho) e, por último, nos cromossomas 12 e X observou-se LOH (roxo).

As alterações detectadas através das análises dos marcadores de oligonucleotídeos são corroboradas pela análise também dos marcadores para SNPs, validando e dando mais confiabilidade aos achados.

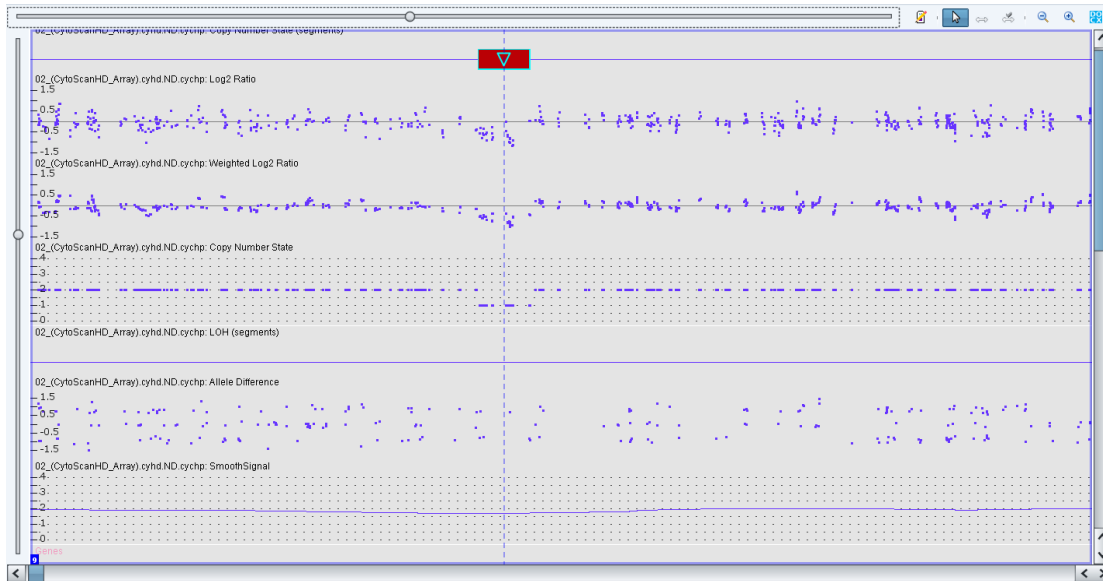




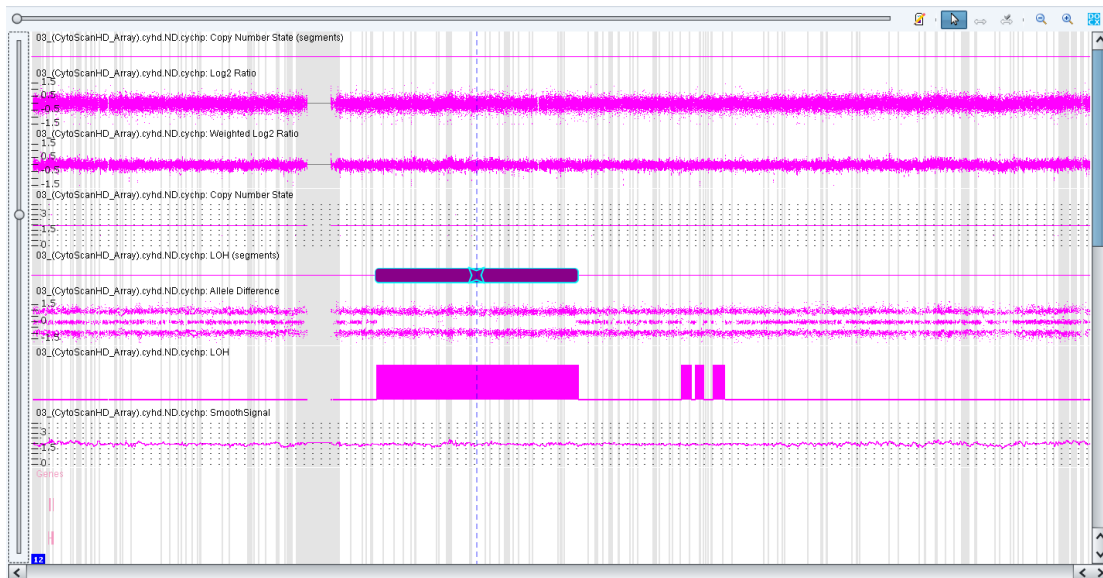
**Figura 4:** Métodos de avaliação, comparação e validação das alterações encontradas.



**Figura 5:** Representação de como a alteração de ganho (região do triângulo azul) se apresenta na amostra #1 nos diferentes parâmetros. O cromossomo em questão foi o 7, na citobanda q11.21. O ganho representado refere-se a duplicação de uma região.



**Figura 6:** Representação de como a alteração de perda (região do triângulo invertido vermelho) se apresenta na amostra #1 nos diferentes parâmetros. O cromossomo em questão foi o 9, na citobanda p24.3.



**Figura 7:** Representação de como a alteração de *cnLOH* (região roxa) se apresenta na amostra #2 nos diferentes parâmetros. O cromossomo em questão foi o 12, na citobanda q12. Essa perda pode se referir à duplicação de um cromossomo materno ou paterno, ou de uma região cromossomal, ou ainda, pela perda de um dos dois alelos.

#### 6.4. Resultados encontrados após a análise das amostras

Foram encontradas um total de 81 alterações, sendo 28 delas nos ameloblastomas unicísticos, 29 nos ameloblastomas multicísticos, sete no carcinoma ameloblástico e 17 nos TOAs.

Ganho e perda foram as alterações genômicas mais frequentes, sendo que ganho representou aproximadamente 34,5% (28 alterações) de todas elas e a perda correspondeu em torno de 60,4% (49 alterações). A *cnLOH* foi encontrada em apenas duas amostras (#2 e #3). Dois cromossomos de cada uma das amostras foram afetados, sendo que o da amostra #2 foram os cromossomos 12, na citobanda q12 e o X, na citobanda q13.1. Já na amostra #3, os cromossomos que apresentaram esse tipo de alteração foram o 5, na citobanda p13.1 e o X, na citobanda q11.1. A amostra #2 foi a que apresentou o maior número de alterações do tipo *cnLOH*, englobando 410 genes no total. Desses, 368 genes estão localizados no cromossoma 12, que representou uma alteração de 25571,731kbp de tamanho com envolvimento de 5898 marcadores. Os outros 42 genes, referentes ao cromossoma X, corresponderam a uma alteração de 5776,447kbp de tamanho com 446 marcadores envolvidos.

De todas as alterações encontradas, sete foram classificadas como raras e, portanto, potencialmente patogênicas, de acordo com os critérios adotados e mais aceitos pela comunidade acadêmica. Duas CNVs raras foram encontradas em ameloblastoma unicístico (#1 e #2), uma em ameloblastoma multicístico (#4) e uma em TOA (#7). Perda foi a alteração

mais presente (quatro). Ao todo, 15 genes estavam mapeados nas regiões de CNVs raras.