

CLARICE FERREIRA GALVÃO

**Estudo da perda de heterozigosidade de genes
supressores de tumor em tumores odontogênicos mistos**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

Belo Horizonte

2012

CLARICE FERREIRA GALVÃO

**Estudo da perda de heterozigosidade de genes
supressores de tumor em tumores odontogênicos mistos**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da
Universidade Federal de Minas Gerais como requisito
parcial para a obtenção do título de Mestre em Medicina
Molecular.**

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Dra. Vanessa de Fátima Bernardes

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

Belo Horizonte

2012

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação primeiramente a Deus, que me conduz e me ampara pelos caminhos da vida. A minha mãe, e minhas irmãs, Cris e Viví, por estarem sempre ao meu lado e ao Gu pelo amor, carinho e por toda dedicação durante todos estes anos. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

Durante todos esses anos, venho pedindo muitas coisas a Deus: paciência, sabedoria, tranquilidade, paz, perseverança, coragem e alegria. Dentre essas e muitas outras coisas nada nunca me faltou. Hoje, em especial, venho agradecê-lo por tudo que me deste, principalmente por estar ao meu lado e ter colocado pessoas tão especiais na minha vida.

Agradeço a minha mãe por ser meu exemplo de coragem e determinação e por me apoiar sempre que precisei.

Às minhas irmãs, Cris e Viví, minhas melhores amigas.

Ao Gu, pelo companheirismo, paciência e amor.

Ao meu tio Ademar que me apoia e me dá tanto carinho.

A toda minha família, avó, tios, tias, primos e primas pela alegria de cada dia.

A Ione e ao Marcílio, por todo apoio e amizade que sempre me dedicaram.

Aos meus amigos Manu, Anna Cristina, Bruno Meira, Fabiana, Lúbia e Tálita pelo apoio incondicional.

À todos os meus amigos e colegas de trabalho, Elizete, Renata, Silvinha, Fabrício, Gefer, Thiago Fonseca, Lucyana,

Kelma, Jeane , Ana Carolina, João Artur, Líssur, Marcela, Natália, Nayara, Leonardo e Alessandra pelo companheirismo e amizade. Agradeço principalmente à Marina, pelos conhecimentos compartilhados e às professoras Carolina Cavalieri e Vanessa Bernardes que sempre me apoiaram, principalmente na conclusão deste trabalho.

Agradeço às funcionárias do laboratório Maria Inês e Daniele, pela dedicação e carinho.

A Claudia Maria, Paula Rocha, Paula Serele e Telminha que fizeram parte desta equipe e com as quais convivi e pude contar durante todo o tempo que estiveram presente, muito obrigada.

Agradeço em especial ao prof. Ricardo Santiago Gomez que esteve ao meu lado na conquista deste projeto e por ter me dado a oportunidade de fazer parte desta equipe me recebendo de braços abertos.

Aos professores Paulo Eduardo e Rodrigo Vilamarim pela amizade e confiança.

Ao prof. Luiz Armando pelo incentivo, e a todos os professores e funcionários da UFMG que direta ou indiretamente contribuíram na realização deste trabalho.

Desde já, agradeço imensamente aos professores Adriano Loyola e Fabrício do Amaral que com tanta gentileza aceitaram compor a banca e a compartilhar seus conhecimentos.

Enfim, obrigada a TODOS que colaboram com este projeto e que fazem parte da minha vida.

A vida é uma longa viagem e sei que não viajo sozinha, ao meu lado existem vocês, que fazem tudo ter mais sentido. Esta é apenas mais uma etapa desta viagem e sei que muita estrada ainda estará por vir...

RESUMO

Os tumores odontogênicos representam um grupo de lesões derivadas de tecidos que formam os dentes e exibem características clínicas e patológicas variáveis. A avaliação da perda de heterozigosidade (*Loss of Heterozygosity*- LOH) pode permitir a identificação de alterações em tumores e lesões pré-cancerosas. Embora a LOH em regiões supressoras de tumor seja importante na compreensão do processo de formação das neoplasias, poucos estudos foram realizados com esta abordagem nos tumores odontogênicos. Neste trabalho, investigou-se a LOH através de um painel de nove marcadores para regiões microssatélites próximas a genes supressores de tumor nos cromossomos 3p, 9p, 11p, 11q e 17p em onze tumores odontogênicos mistos, incluindo cinco casos de fibroma ameloblástico (FA), três fibro-odontoma ameloblástico (FOA) e três de fibrossarcoma ameloblástico (FSA). Os *loci* mais frequentemente deletados foram dos genes *TP53* (17p13, 62%) e *CHRNA1* (17p13, 55%). LOH nas regiões cromossômicas 3p24.3, 9p21 e 9p22 foram observadas apenas nos FSA. Nenhuma amostra apresentou LOH nos *loci* cromossômicos 3p21.2 e 11q13.4. Para a região 9p22-p13, LOH ocorreu em apenas uma amostra de FOA. A média da frequência de perda alélica (*fractional allelic loss*) nas lesões benignas (FA e FOA) foi de 22%, enquanto nas lesões malignas (FSA) foi de 74,6%. Os resultados demonstraram alta frequência de perda alélica no fibrossarcoma ameloblástico comparado aos tumores benignos. Estes dados sugerem que a LOH pode ser útil no diagnóstico e na compreensão da patogênese dos tumores odontogênicos mistos.

Palavras chave: Tumores odontogênicos, perda de heterozigosidade, microssatélites, genes supressores de tumor, fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico, fibrossarcoma ameloblástico.

ABSTRACT

Odontogenic tumors represent a group of lesions with clinical and pathological variables, derived from tissues that form the teeth. The evaluation of the loss of heterozygosity (LOH Loss of heterozygosity-) allows identifying changes in tumors and precancerous lesions. Although loss of heterozygosity (LOH) in regions of tumor suppressor is important for understanding the process of formation of neoplasms, few studies have been performed with this approach in the odontogenic tumors. In this study, LOH in a panel of nine markers for tumor suppressor regions on chromosomes 3p, 9p, 11p, 11q and 17p were analyzed in five samples of ameloblastic fibroma, three samples of ameloblastic fibro-odontoma and three samples of ameloblastic fibrosarcoma. The most frequently lost genetic *loci* were p53 (17p13, 62%) and CHRN1 (17p13, 55%). LOH at the chromosome regions 3p24.3, 9p21 and 9p22 was identified only in ameloblastic fibrosarcoma. No sample showed LOH at the chromosomal loci 3p21.2 and 11q13.4. For the region 9p22-p13, LOH occurred in one sample of ameloblastic fibro-odontoma. The fractional allelic loss was calculated for each sample. The mean fractional allelic loss of the benign lesions (i.e., ameloblastic fibroma and ameloblastic fibro-odontoma) was 22%, whereas the mean fractional allelic loss of the malignant lesions (i.e., ameloblastic fibrosarcoma) was 74.6%. In conclusion, our results show a higher fractional allelic loss of ameloblastic fibrosarcoma compared to its benign counterparts. These data suggest that LOH may be useful in the diagnosis and understanding of the pathogenesis of mixed odontogenic tumors.

Key-words: Odontogenic tumors; loss of heterozygosity; tumor suppressor gene, ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro odontoma, ameloblastic fibrosarcoma, mixed odontogenic tumors.

LISTA DE SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micromolar
11p	Braço curto do cromossomo 11
11q	Braço longo do cromossomo 11
17p	Braço curto do cromossomo 17
3p	Braço curto do cromossomo 3
9p	Braço curto do cromossomo 9
AC	Altura do alelo curto
AL	Altura do alelo longo
BAX	<i>BCL2-associated X protein</i> (BCL-2 associado à proteína X)
BDMF	<i>Bone dysplasia with medullary fibrosarcoma</i> (Displasia óssea com fibrossarcoma medular)
CA	Citosina e adenina
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (quinase dependente de ciclina)
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A</i> (inibidor 2A de quinase dependente de ciclina)
CHRNB1	<i>Cholinergic receptor, nicotinic, beta 1</i> (receptor colinérgico nicotínico beta 1)
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
Di	Dinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Deoxinucleotídeos fosfato

EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i> (receptor de fator de crescimento epidérmico)
FA	Fibroma ameloblástico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FCHSD2	<i>FCH and double SH3 domains 2</i> (FCH e 2 domínios duplos SH3 2)
FHIT	<i>Fragile histidine triad</i> (Tríade de histidina frágil)
FOA	Fibro-odontoma ameloblástico
FSA	Fibrossarcoma ameloblástico
GATA	Guanina, adenosina, timina, adenosina
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (perda de heterozigosidade)
MAGI-1	<i>Membrane associated guanylate kinase WW and PDZ domain containing 1</i> (Membrana associada guanilato quinase WW e PDZ contendo 1 domínio)
Min	Minuto
MLH1	MutL homolog 1
Mm	Milimolar
Ng	Nanograma
NUP98	<i>Nucleoporin 98-KD</i> (nucleoporina 98KD)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pRB	<i>Protein retinoblastoma</i> (proteína retinoblastoma)
RARβ	<i>β-retinoic acid receptor gene</i> (gene receptor de ácido retinóico- β)
Seg	Segundos

SH3GL2	<i>SH3-domain GRB2-like 2 gene</i>
SLC24A2	<i>Solute carrier family 24 (sodium/potassium/calcium exchanger), member 2</i>
Tetra	Tetranucleotídeo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Unid	Unidade
VHL	<i>Von Hippel Lindau</i>

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Classificação histológica dos tumores odontogênicos de acordo com a OMS (2005)	4
Tabela 2	Características clinicopatológicas	20
Tabela 3	Dados dos primers utilizados para as regiões 3p, 9p, 11p, 11q e 17p	22
Tabela 4	Condições térmicas de PCR.....	23
Tabela 5	Frequência de perda alélica para cada amostra de fibroma, fibro-odontoma e fibrosarcoma ameloblástico.....	29
Tabela 6	Média da frequência de perda alélica em todos os <i>loci</i> avaliados.....	29

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem histológica de Fibroma ameloblástico.....	7
Figura 2	Imagem histológica de Fibro-odontoma ameloblástico.....	8
Figura 3	Imagem histológica de Fibrossarcoma ameloblástico.....	10
Figura 4	Regiões cromossômicas 3p, 9p,11p, 11q e 17p mostrando a localização dos genes supressores de tumor e os marcadores de microssatélites relacionados.....	13
Figura 5	p16 e pRb na regulação do crescimento celular.....	15
Figura 6	p53 bloqueando o ciclo celular através da regulação de GST.....	18
Figura 7	Imagem ilustrativa de um eletroferograma em que a correção de <i>stutter</i> é necessária. Ao lado os passos e fórmulas necessárias para correção do alelo 1.	25
Figura 8	Exemplo representativo da análise de microssatélite apresentando LOH na região 17p13 (p53).....	26
Figura 9	Análise da LOH em nove marcadores de microssatélites em fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico e fibrosarcoma ameloblástico.....	27

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	1
1.1	Tumores odontogênicos.....	1
1.1.1	Classificação dos tumores odontogênicos.....	2
1.2	Fibroma ameloblástico.....	5
1.3	Fibro-odontoma ameloblástico.....	7
1.4	Fibrossarcoma ameloblástico.....	8
1.5	Perda de heterozigosidade (<i>Loss of heterozygosity-LOH</i>).....	11
1.5.1	Cromossomo3: região 3p	14
1.5.2	Cromossomo9: região 9p	12
1.5.3	Cromossomo11: regiões 11p e 11q	16
1.5.4	Cromossomo17: região 17p	17
2.	OBJETIVOS	19
2.1	Objetivo geral.....	19
2.2	Objetivos específicos.....	19
3.	MATERIAIS E MÉTODOS	20
3.1	Seleção de amostras.....	20
3.2	Microdissecção dos tecidos incluídos em parafina.....	21
3.3	Extração de DNA.....	21
3.4	Método para análise de LOH.....	22
4.	RESULTADOS	27
4.1	Análise de LOH.....	27
5.	DISCUSSÃO	30
6.	CONCLUSÃO	40
7.	REFERÊNCIAS	41

8.	ANEXO.....	47
8.1	Aprovação do comitê de ética e pesquisa (COEP)	47
8.2	Artigos publicados	48
8.3	Artigo aceito para publicação	48
8.4	Resumos publicados em anais de congresso	48
8.5	Ata da defesa	49
9.	APÊNDICE.....	50

1. INTRODUÇÃO

1.1 Tumores odontogênicos

Os Tumores Odontogênicos compreendem um grupo de lesões heterogêneas que se originam de tecidos epiteliais e/ou ectomesenquimais que formam os dentes (KRAMER *et al.*, 1992; PAPAGERAKIS *et al.*, 1999, SLOOTWEG, 2006). Caracteristicamente trata-se de lesões incomuns que exibem características clínicas e patológicas variáveis (AVELAR *et al.*, 2008; BARNES *et al.*, 2005).

Clinicamente os tumores odontogênicos acometem pacientes com diferentes idades tanto na região mandibular quanto maxilar podendo estar central ou periféricamente localizados. Algumas lesões são assintomáticas e descobertas ao acaso por meio de radiografias rotineiras. Outras são identificadas devido à expansão local da região afetada ou tumefação facial (ADEBAYO *et al.*, 2002; BARNES *et al.*, 2005). O comportamento biológico inclui proliferação hamartomatosa, tumores benignos e tumores malignos (BUCHNER *et al.*, 2006; SLOOTWEG, 2006).

Os tumores benignos normalmente manifestam-se como lesões indolores e de crescimento lento. Entretanto, alguns destes tumores podem demonstrar agressividade local com invasão celular podendo, embora raramente, ocorrer transformação maligna e metástase (PAPAGERAKIS *et al.*, 1999).

Nos tumores odontogênicos malignos, o primeiro e mais comum sintoma é a dor, seguida pela tumefação no local e, posteriormente, rápido crescimento e desenvolvimento (NEVILLE *et al.*, 2009). Radiograficamente, estes tumores

podem apresentar aspecto radiolúcido e/ou radiopaco dependendo da presença de tecidos moles ou duros (KRAMER *et al.*, 1992).

A etiopatogenia dos tumores odontogênicos é desconhecida e características clínicas como gênero, idade e localização podem ser úteis no diagnóstico diferencial (BARNES *et al.*, 2005).

Muitas controvérsias existem em relação ao surgimento dessas lesões e vários estudos para identificar alterações celulares, genéticas e moleculares são realizados na tentativa de explicar os mecanismos da oncogênese, citodiferenciação e progressão tumoral (PAPAGERAKIS *et al.*, 1999; MOSQUEDA-TAYLOR 2008; MOREIRA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010).

1.1.1 Classificação dos tumores odontogênicos

Desde a publicação da primeira edição sobre a classificação dos tumores odontogênicos pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o grande e contínuo interesse por estas lesões vem intensificando a investigação pelo assunto e estimulando o desejo de publicar novas descobertas (KRAMER, 1992; PHILIPSEN, 1997).

Em 2005, a OMS publicou uma nova classificação dos tumores odontogênicos baseando-se primeiramente no comportamento biológico dessas lesões, classificando-os em benignos, malignos e não neoplásicos. A subdivisão das lesões benignas depende do tipo de tecido odontogênico que compõe a lesão: epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro sem ectomesênquima; epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido duro, sendo estas lesões também conhecidas como tumores

odontogênicos mistos; tecido mesenquimal e/ou ectomesenquimal com ou sem a presença de epitélio odontogênico (BARNES *et al.*, 2005) (Tabela 1).

Neste estudo serão abordados três tumores odontogênicos mistos; o fibroma ameloblástico (FA), o fibro-odontoma ameloblástico (FOA) e o fibrossarcoma ameloblástico (FSA). O FA e FOA fazem parte do grupo de tumores odontogênicos benignos derivados do epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido duro; o FSA faz parte do grupo dos tumores odontogênicos malignos/sarcomas odontogênicos, que podem surgir de um FA pré-existente (BARNES *et al.*, 2005; SLOOTWEG 2006). Tais lesões são raras e apresentam comportamentos clínicos e radiográficos distintos (PHILIPSEN, 1997; SLOOTWEG 1991).

Tabela 1: Classificação dos tumores odontogênicos de acordo com a OMS (2005).

TUMORES BENIGNOS									
Epitélio odontogênico com estroma fibroso maduro sem ectomesênquima odontogênico	<ul style="list-style-type: none"> Ameloblastoma Tumor odontogênico escamoso Tumor odontogênico epitelial calcificante Tumor odontogênico adenomatóide Tumor odontogênico queratocístico 	<ul style="list-style-type: none"> Sólido Extraósseo Desmoplásico Unicístico 	<ul style="list-style-type: none"> → multicístico → periférico 						
				Epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido duro	<ul style="list-style-type: none"> Fibroma Ameloblástico Fibro-dentinoma Ameloblástico Fibro-odontoma Ameloblástico Odontoma Odontoameloblastoma Tumor odontogênico calcificante cístico Tumor dentinogênico de células fantasmas 	<ul style="list-style-type: none"> Complexo Composto 			
							Mesênquima e/ou ectomesênquima odontogênico com ou sem epitélio odontogênico	<ul style="list-style-type: none"> Fibroma odontogênico Mixoma/mixofibroma odontogênico Cementoblastoma 	
									Lesões relacionadas ao osso
TUMORES MALIGNOS									
Carcinomas odontogênicos	<ul style="list-style-type: none"> Ameloblastoma metastatizante Carcinoma ameloblástico Carcinoma de células escamosas intraósseo primário Carcinoma odontogênico de células claras Carcinoma odontogênico de células fantasmas 	<ul style="list-style-type: none"> Tipo primário Tipo secundário Tipo sólido Derivado de queratocisto Derivado de cisto odontogênico 	<ul style="list-style-type: none"> Intraósseo Periférico 						
				Sarcomas odontogênicos	<ul style="list-style-type: none"> Fibrossarcoma ameloblástico Fibro-dentinoma e fibro-odontosarcoma ameloblástico 				
						OUTROS TUMORES			
				Tumor neuroectodérmico melanótico da infância					

1.2 Fibroma ameloblástico

O fibroma ameloblástico (FA) é um tumor odontogênico benigno em que os elementos epiteliais e ectomesenquimais são neoplásicos. Segundo a OMS (2005), este tumor é classificado como “neoplasia constituída por ectomesênquima odontogênico semelhante à papila dental com ninhos e cordões epiteliais semelhantes à lâmina dentária e ao órgão do esmalte” (BARNES *et al.*, 2005).

Desde os primeiros relatos de FA por Kruse, em 1891, diversos outros casos foram publicados e ainda hoje vêm sendo documentados na literatura (PHILIPSEN *et al.*, 1997; PITAK-ARNNOP *et al.*, 2009). Entretanto, a frequência com que este tumor é encontrado na população é difícil de ser avaliada, uma vez que algumas lesões diagnosticadas anteriormente podem não representar um verdadeiro FA, mas um odontoma em desenvolvimento (GARDNER *et al.*, 1984; SLOOTWEG, 1981; PHILIPSEN *et al.*, 1997) .

Clinicamente o FA manifesta-se como uma lesão indolor, de baixo crescimento e expansão tumoral, podendo estar localizada intra-óssea ou periféricamente. Contudo, a presença deste tumor em tecidos moles representa um fenômeno raro (PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA, 1999; FUMIO *et al.*, 2008).

Trata-se de uma lesão incomum que acomete crianças e adolescentes na primeira e segunda década de vida, com média de 14,6 a 15,5 anos de idade, apresentando uma leve predileção pelo gênero masculino (TAKEDA, 1999). Cerca de 70% a 80% dos casos ocorrem na região posterior da mandíbula e são descobertos ao acaso em radiografias rotineiras, associados a dentes não erupcionados (TAKEDA, 1999; NELSON 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Radiograficamente observa-se uma área radiolúcida bem delimitada podendo estar relacionada a um dente não erupcionado (BARNES *et al.*, 2005). A imagem radiolúcida pode ser uni ou multilocular, apresentando bordas radiopacas em alguns casos. Entretanto, a aparência multilocular é frequentemente visualizada em tumores grandes, enquanto o padrão unilocular é característico de lesões pequenas (NEVILLE *et al.*, 2009).

Histologicamente caracteriza-se por apresentar tecido ectomesenquimal rico em células que lembram a papila dentária primitiva, associado a cordões de epitélio odontogênico. O padrão epitelial mais comum consiste de cordões longos e delgados anastomosados, revestidos por uma camada de células colunares ou cúbicas. Em outro padrão, as células epiteliais formam pequenas e discretas ilhas lembrando o estágio folicular do desenvolvimento do órgão do esmalte, exibindo grande número de células frouxamente arranjadas que lembram o retículo estrelado (figura 1). O grau de celularidade varia dentro do próprio tumor e entre tumores diferentes. A atividade mitótica é incomum e a degeneração cística não é vista usualmente (TAKEDA, 1999; COHEN *et al.*, 2004; NEVILLE *et al.*, 2009). O tratamento consiste na remoção cirúrgica conservadora da lesão e acompanhamento do paciente (NELSON 2009; PITAK-ARNNOP *et al.*, 2009; VASCONCELOS *et al.*, 2009).

Figura 1: Imagem histológica de fibroma ameloblástico.



(100x)



(400x)

1.3 Fibro-odontoma ameloblástico

O fibro-odontoma ameloblástico (FOA) é uma lesão com características histológicas similares ao fibroma ameloblástico, mas com mudanças indutivas que levam à formação de esmalte e dentina (BARNES *et al.*, 2005). Alguns autores questionam se o FOA não seria um odontoma em desenvolvimento; contudo, dados clínicos como localização e agressividade, além dos aspectos radiográficos, são necessários para complementar a análise histológica e diferenciar estas duas lesões (GARDNER *et al.*, 1984; SLOOTWEG, 1981; PHILIPSEN *et al.*, 1997).

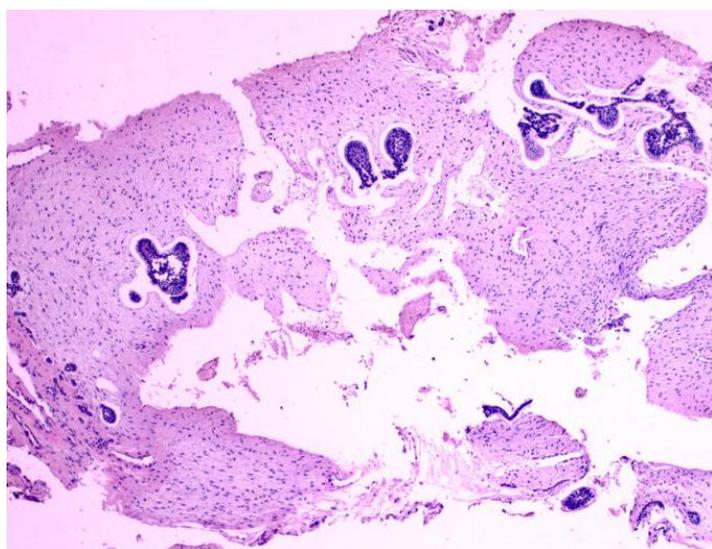
Clinicamente, o FOA acomete crianças com média de dez anos de idade e é descoberto ao acaso em radiografias rotineiras por estar associado a dentes não erupcionados. Trata-se de uma lesão assintomática que acomete frequentemente a região posterior de mandíbula (SILVA *et al.*, 2006; PONTES *et al.*, 2008).

Radiograficamente observa-se uma lesão com um aspecto radiolúcido unilocular, ou raramente multilocular, bem circunscrito, centralmente localizado, com

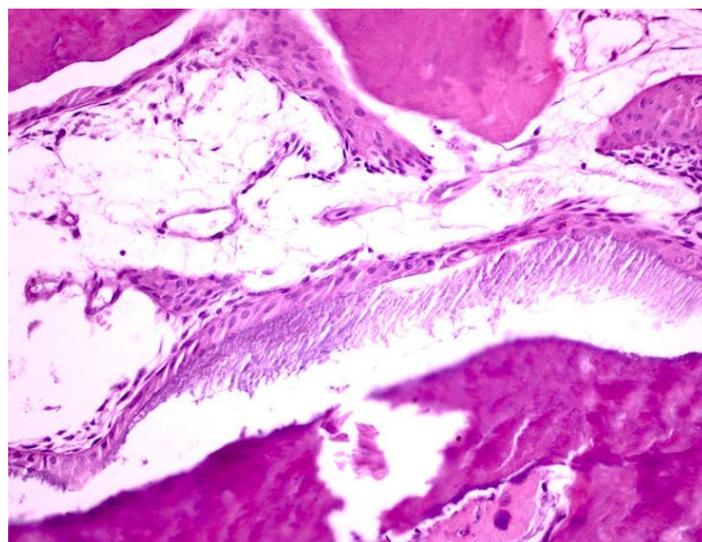
uma massa calcificada compatível com estrutura dentária (UCHIYAMA *et al.*, 2009; TOLENTINO *et al.*, 2010) .

Histologicamente, o FOA apresenta características semelhantes ao FA, porém, com a formação de esmalte e dentina em íntima relação com as estruturas epiteliais (figura 2). Algumas lesões que apresentam apenas material dentinóide são denominadas fibro-dentinoma ameloblástico, entretanto, ainda há questionamentos se esta lesão seria uma entidade separada ou apenas uma variante do FOA (PHILIPSEN *et al.*, 1997; COHEN *et al.*, 2004).

Figura 2: Imagem histológica de fibro-odontoma ameloblástico.



(100x)



(400x)

O tratamento consiste na enucleação cirúrgica conservadora, uma vez que a massa tumoral destaca-se facilmente da estrutura óssea não invadindo o osso. O prognóstico é ótimo e recidivas são extremamente raras (SILVA *et al.*, 2006, ZOUHARY *et al.*, 2008).

1.4 Fibrossarcoma ameloblástico

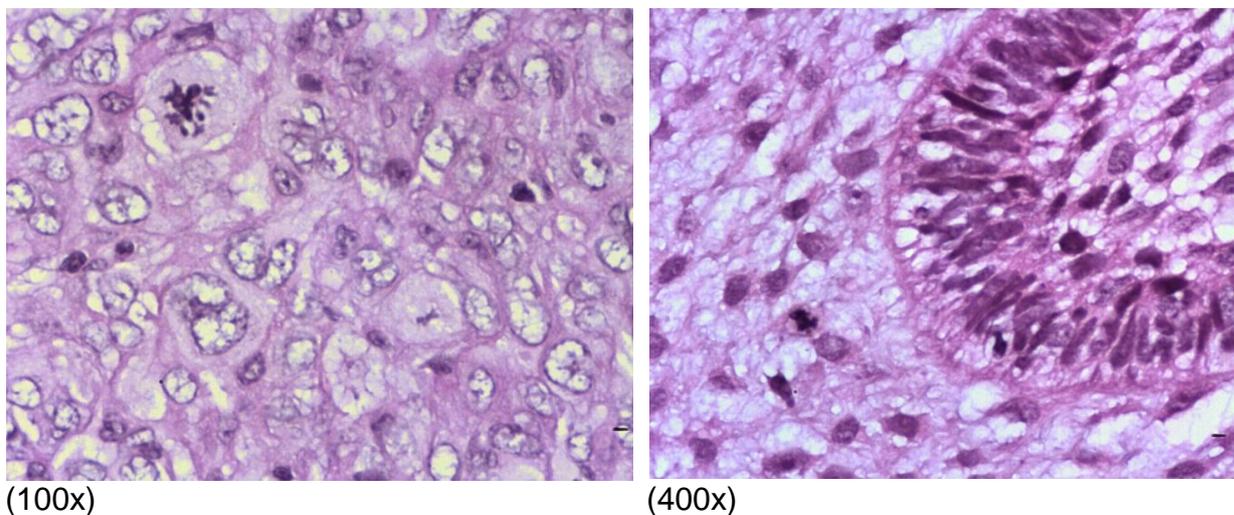
O fibrossarcoma ameloblástico (FSA), considerado a contraparte maligna do FA, é uma rara neoplasia derivada de tecido ectomesenquimal em que o epitélio odontogênico é benigno enquanto o ectomesênquima é maligno com características sarcomatosas (BARNES *et al.*, 2005). Segundo a literatura, até o ano de 2003, 63 casos de FSA foram documentados (KOBAYASHI *et al.*, 2005). Contudo, em uma revisão breve até o ano de 2011 mais 7 casos foram relatados (WILLIAMS *et al.*, 2007; KOUSAR *et al.*, 2009; PONTES *et al.*, 2010)

Clinicamente, o FSA surge com frequência na região mandibular (80%) de jovens adultos com média de 27,5 anos de idade apresentando uma maior predileção pelo sexo masculino. Aumento de volume, dor e crescimento rápido são as queixas mais comuns relatadas pela maioria dos pacientes (BREGNI *et al.*, 2001; WILLIAMS *et al.*, 2007). Embora localmente agressivo, o FSA apresenta baixo potencial de metástase (KOUSAR *et al.*, 2009; PONTES *et al.*, 2010).

Radiograficamente, o FSA pode apresentar várias características, mas, na maioria das vezes, observa-se uma imagem radiolúcida mal definida compatível com a formação de um processo maligno (MULLER *et al.*, 1995; WILLIAMS *et al.*, 2007).

O padrão histológico consiste de ilhas e cordões anastomosados com elementos epiteliais ameloblásticos sem atipia citológica. O componente mesenquimal é altamente celularizado, com células hipercromáticas e grande pleomorfismo (figura 3). Após recorrência local, o componente epitelial pode tornar-se menos proeminente ou desaparecer (DE PAULA *et al.*, 2003; KOUSAR *et al.*, 2009). Em alguns casos, dentina displásica ou pequena quantidade de esmalte podem ser formados, sendo denominados dentinosarcoma ameloblástico ou fibro-odontosarcoma ameloblástico, respectivamente (BARNES *et al.*, 2005).

Figura 3: Imagem histológica de fibrossarcoma ameloblástico.



O tratamento de escolha para o FSA, como para outros sarcomas, é a ressecção cirúrgica radical com remoção total dos tecidos moles adjacentes. Caso contrário, poderá ocorrer recidiva da lesão em curto espaço de tempo (BARNES *et al.*, 2005; WILLIAMS, 2007).

O FSA pode surgir *de novo* ou em recorrência previamente documentada de um FA pré-existente representando cerca de um terço dos casos (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2003; KOBAYASHI *et al.*, 2005; WILLIAMS, 2007)

Radioterapia e quimioterapia podem ser usadas nos casos com múltiplas recorrências. Contudo, apesar de localmente agressivo, acredita-se que apenas o tratamento com cirurgia radical seja uma técnica adequada devido ao baixo potencial de metástases. Entretanto, o prognóstico muitas vezes é considerado indeterminado devido aos poucos casos relatados na literatura com o acompanhamento adequado do paciente (MULLER *et al.*, 1995; DE PAULA *et al.*, 2003; KOUSAR *et al.*, 2009). Os casos fatais parecem estar associados à infiltração local incontrolável e a numerosas recorrências (TAKEDA, 1999).

1.5 Perda de heterozigosidade (*Loss of heterozygosity* - LOH)

A análise de LOH permite identificar, através da comparação entre DNA normal e tumoral, alterações no balanço alélico de tumores e lesões pré-cancerosas (VAN HOUTEN *et al.*, 2000). A LOH pode surgir através de deleção, conversão gênica, recombinação, duplicação e perda cromossômica, provocando modificações na função normal da célula, que poderá conduzir ao crescimento neoplásico e à transformação maligna (FIELD *et al.*, 1996; VAN HOUTEN *et al.*, 2000; SZUKALA *et al.*, 2006; NAKAMURA *et al.*, 2009; SONG *et al.*, 2010).

Uma das formas para detectar LOH é através da utilização de marcadores para regiões de microssatélites, próximas a genes supressores de tumor. Os microssatélites são pequenas sequências repetitivas, altamente polimórficas na população e suscetíveis a erros durante a replicação do DNA (Li *et al.*, 2004; MIGALDI *et al.*, 2008). Estudos apontam que os microssatélites podem ter um grande potencial para predizer o risco de desenvolvimento dos tumores e que a LOH é um dos importantes eventos para a inativação de um gene supressor de tumor levando ao crescimento neoplásico (VAN HOUTEN *et al.*, 2000; COLLIN-CHAVAGNAC *et al.*, 2010; SONG *et al.*, 2010).

Contudo, muitas vezes a LOH isolada não é suficiente para suprimir completamente a expressão de um gene supressor de tumor, uma vez que alguns destes podem ser expressos de forma monoalélica, sendo necessária a inativação das duas cópias do gene. Um indivíduo pode tornar-se mais suscetível ao desenvolvimento de tumores quando uma das cópias de um gene supressor de tumor já se encontra alterada na linhagem germinal ou somática por mutação, metilação, translocações cromossômicas ou outras alterações genéticas ou

epigenéticas, que se somadas à LOH, contribuem para o crescimento neoplásico (WALI, 2010).

Sabe-se que os tumores odontogênicos surgem dos tecidos que formam os dentes e que alterações moleculares, genéticas e epigenéticas estão diretamente relacionadas ao processo de desenvolvimento destes tumores (KUMAMOTO *et al.*, 2006; MOREIRA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010). Estudos relacionados à associação de eventos moleculares durante o desenvolvimento dos dentes já identificaram que existem mais de 200 genes, tanto no epitélio quanto no ectomesênquima, desempenhando um papel na odontogênese (BARNES *et al.*, 2005). Contudo, constantemente vêm sendo realizadas novas pesquisas na tentativa de explicar os mecanismos da oncogênese, citodiferenciação e progressão tumoral.

Investigadores sugerem que genes supressores de tumor podem estar envolvidos no desenvolvimento dos tumores odontogênicos através de alterações no controle da proliferação celular (KUMAMOTO, 2006; MOREIRA *et al.*, 2009).

Os genes supressores de tumor encontram-se distribuídos por todo o genoma humano, e algumas regiões cromossômicas como 3p, 9p, 11p, 17p são relatadas na literatura como deletadas em uma série de tumores como câncer de mama, pulmão, melanoma, carcinoma de cabeça e pescoço e ameloblastomas (FIELD *et al.*, 1995; ROWLEY *et al.*, 1996; MIGALDI *et al.*, 2008; SINHA *et al.*, 2008;). Alguns destes estudos têm correlacionado a LOH com um pior prognóstico do tumor (BREMNER *et al.*, 2008; FIELD *et al.*, 1995; LEE *et al.*, 2010).

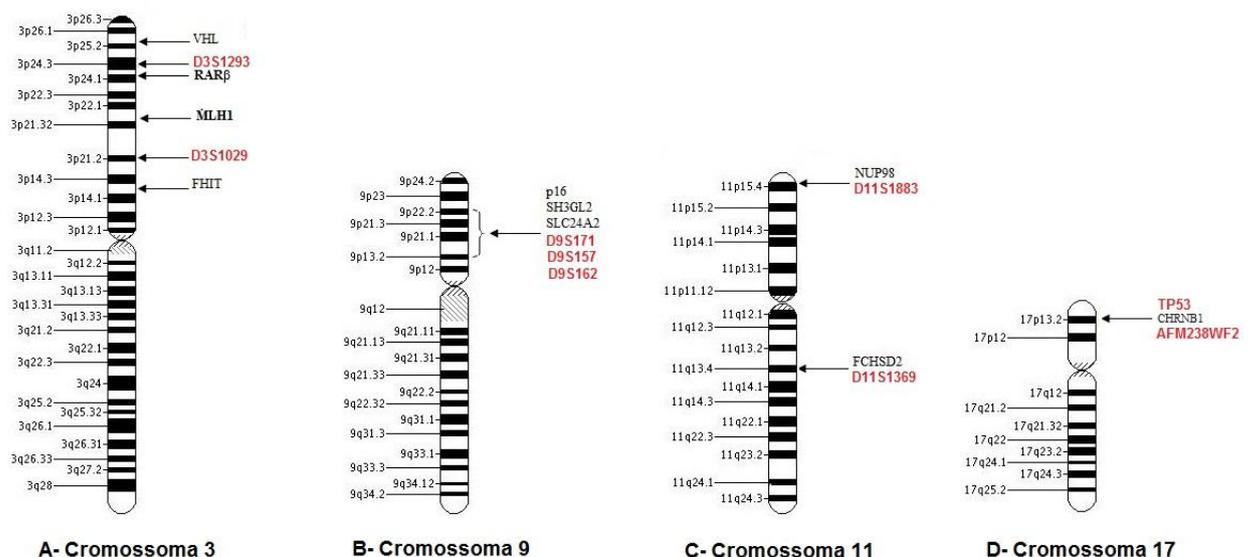
A análise de LOH em ameloblastoma demonstrou que este é um evento comum e que tais deleções podem ajudar a determinar o prognóstico e o comportamento clínico desta lesão (NODIT *et al.*, 2004; MIGALDI *et al.*, 2008). Tais

eventos podem ser comuns não apenas em ameloblastomas, mas também em outros tumores odontogênicos.

Neste estudo, sugere-se que identificar LOH em FA, FOA e FSA possa contribuir para o desenvolvimento de novos marcadores de diagnóstico, além de aprimorar o conhecimento sobre sua patogênese.

Para isso foi realizada uma revisão de literatura a fim de selecionar marcadores de microssatélites em regiões próximas a genes supressores de tumor que foram frequentemente descritos em tumores humanos. Foi selecionado um painel de nove marcadores localizados nos cromossomos 3p, 9p, 11p, 11q e 17p (Figura 4). Os mais conhecidos nestas regiões cromossômicas serão descritos nos parágrafos a seguir.

Figura 4: Regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p mostrando a localização dos genes supressores de tumor e os marcadores de microssatélites relacionados.



1.5.1 Cromossomo 3: região 3p

No braço curto do cromossomo 3, encontram-se genes supressores de tumor como o *VHL* (*Von Hippel Lindau*- 3p25.3), *FHIT* (*fragile histidine triad*- 3p14.2), *RAR β* (*β -retinoic acid receptor gene*- 3p24) e genes relacionados ao mecanismo de reparo, como o *MLH1*(*mutL homolog 1*- 3p21.3) que, quando alterados, participam do desenvolvimento de vários tipos de tumores incluindo o carcinoma bucal (WALI 2010; FIELD *et al.*, 1994; QIU *et al.*, 2001). Dois marcadores selecionados para este estudo encontram-se na região 3p. O D3S1293 (3p24.3) e D3S1029 (3p21.2).

1.5.2 Cromossomo 9: região 9p

O CDKN2A (*cyclin-dependent kinase inhibitor 2A*), também conhecido como *P16*, é um gene frequentemente alterado em tumores humanos que se localiza na região 9p21, sendo o gene supressor de tumor mais bem caracterizado e estudado dentro do cromossomo 9 (MARIATOS *et al.*, 2000). Sabe-se que o gene *P16* age bloqueando a interação entre CDKs (quinases dependente de ciclina) do tipo 4 e 6, com ciclinas do tipo D. As ciclinas CDK4 e 6, quando ligadas a ciclinas do tipo-D, levam à hiperfosforilação de pRB que, nesta condição, não interage com a molécula E2F, que então passará a super-regular a expressão de genes envolvidos na proliferação do ciclo celular (YEUDALL & JAKUS, 1995) (Figura 5). Outro gene localizado nesta região é o *SH3GL2* (9p22), considerado candidato a supressor de tumor. Este gene, além de estar envolvido no papel da endocitose, pode iniciar um papel chave no ciclo celular promovendo a degradação do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR- *epidermal growth factor receptor*), prevenindo uma sinalização de crescimento descontrolada e regulando a proliferação celular (SINHA

et al., 2008). Três marcadores para o cromossomo 9 foram selecionados para este estudo, D9S171 (9p22-p21), D9S157 (9p22), D9S162 (9p22-p13).

Figura 5: p16 e pRb na regulação do crescimento celular.

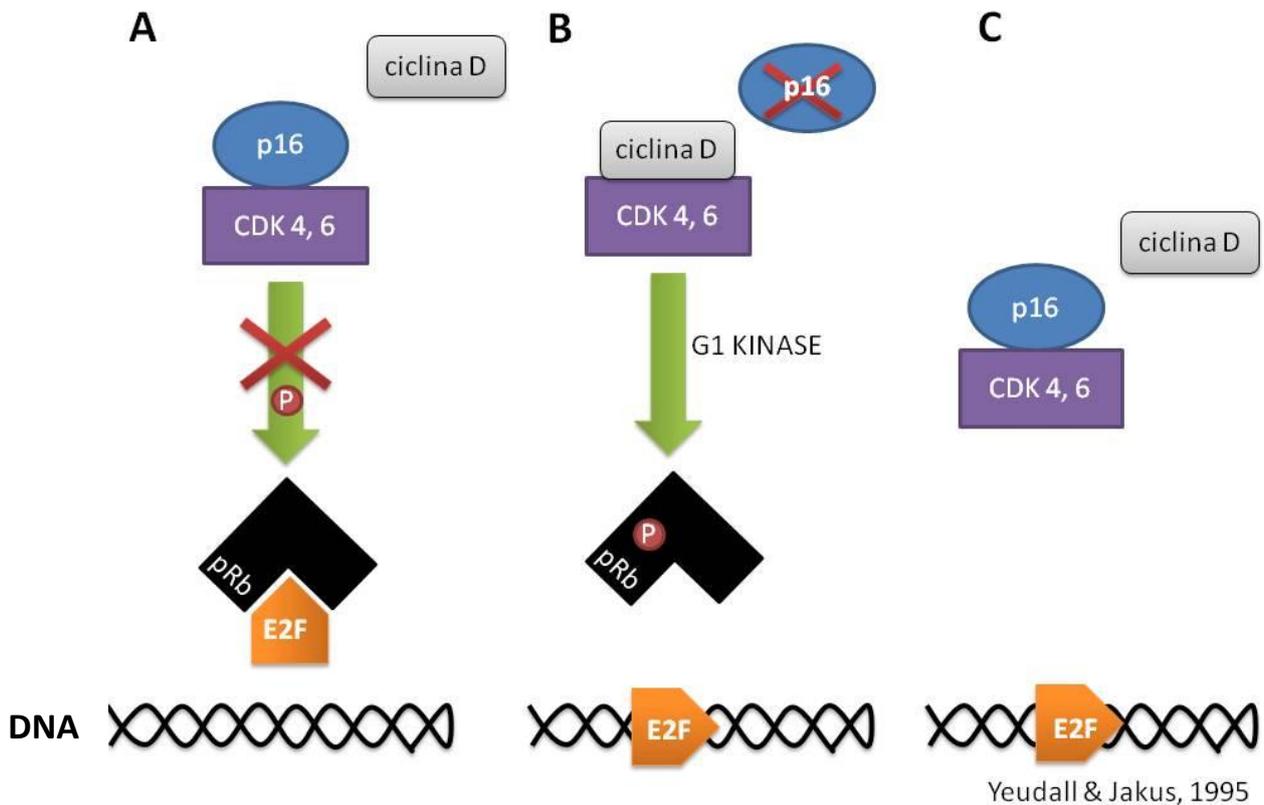


Fig. 5 (A): p16 impedindo a fosforilação de pRb pela ciclina quinase. pRb permanece hipofosforilado, sequestrando a molécula E2F, suprimindo o crescimento. (B): Ausência da função de p16 favorece a ligação de CDK 4 e 6, à ciclina do tipo D que ativa o complexo para fosforilar pRb que não se liga à E2F. Assim, o fator de transcrição E2F é liberado e ativa a transcrição. (C): Ausência da função pRb permite a ativação transcritcional por E2F, e p16 fica incapaz de modular a via.

1.5.3 Cromossomo 11: Regiões 11p e 11q

Alterações na região 11p15.5 têm sido associadas à síndrome *Beckwith-Wiedemann*, tumor de Wilms, carcinoma adrenocortical, câncer de pulmão, ovário e mama. Nesta região, importante como supressor de tumor, localiza-se o gene *NUP98*, um dos vários genes do *imprinting* genômico, um fenômeno genético em que certos genes estão expressos apenas por um alelo, enquanto o outro está inativado. *Splicing* alternativo deste gene também já foi identificado e resulta em variantes na transcrição, entretanto, nem todas as variantes foram completamente descritas (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/4928>)

Pouco se tem relatado na literatura sobre o gene *FCHSD2*, localizado na região 11q13.4. O *FCHSD2* pode interagir com *MAGI-1*, gene que codifica uma proteína que participa do complexo multiproteína da superfície externa da membrana plasmática podendo desempenhar um papel como proteína “andaime” em junções célula-célula. As junções das células epiteliais estão implicadas na transdução de sinal que regula a proliferação celular. Desordens na formação destas junções podem resultar em oncogênese (OHNO *et al.*, 2003).

Os marcadores selecionados que se encontram envolvidos no cromossomo 11 são D11S1883 (11p15.5) e D11S1369 (11q13.4).

1.5.4 Cromossomo 17: região 17p

O gene *TP53*, localizado no cromossomo 17p, produz a proteína p53 que atua como um supressor de tumor participando de várias vias de sinalização essenciais para a regulação do crescimento celular e da apoptose (LEVINE *et al.*, 1991). Quando o DNA de uma célula torna-se danificado por agentes como as substâncias químicas tóxicas e radiação ou luz ultravioleta, esta proteína é ativada. Se o DNA puder ser reparado, a proteína p53 ativa genes responsáveis para reparar os danos; caso contrário, essa proteína impede a célula de se dividir, induzindo a apoptose e, portanto, prevenindo o desenvolvimento de tumores (PETITJEAN *et al.*, 2007). Trata-se de um potente mecanismo supressor de tumor capaz de parar o ciclo celular e impedir a proliferação da célula. Entretanto, a via do gene *TP53* encontra-se frequentemente inativada por vários mecanismos da gênese do câncer humano e cerca de 50% dos tumores apresentam alterações neste gene, o que contribui para o crescimento neoplásico (JACKSON *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2011; PETITJEAN *et al.*, 2007) (Figura 6). Para avaliar esta região, foram selecionados dois marcadores: AFM238WF2 e TP53, ambos localizados na região 17p13.1.

Figura 6: p53 bloqueando o ciclo celular através da regulação de genes supressores de tumor.

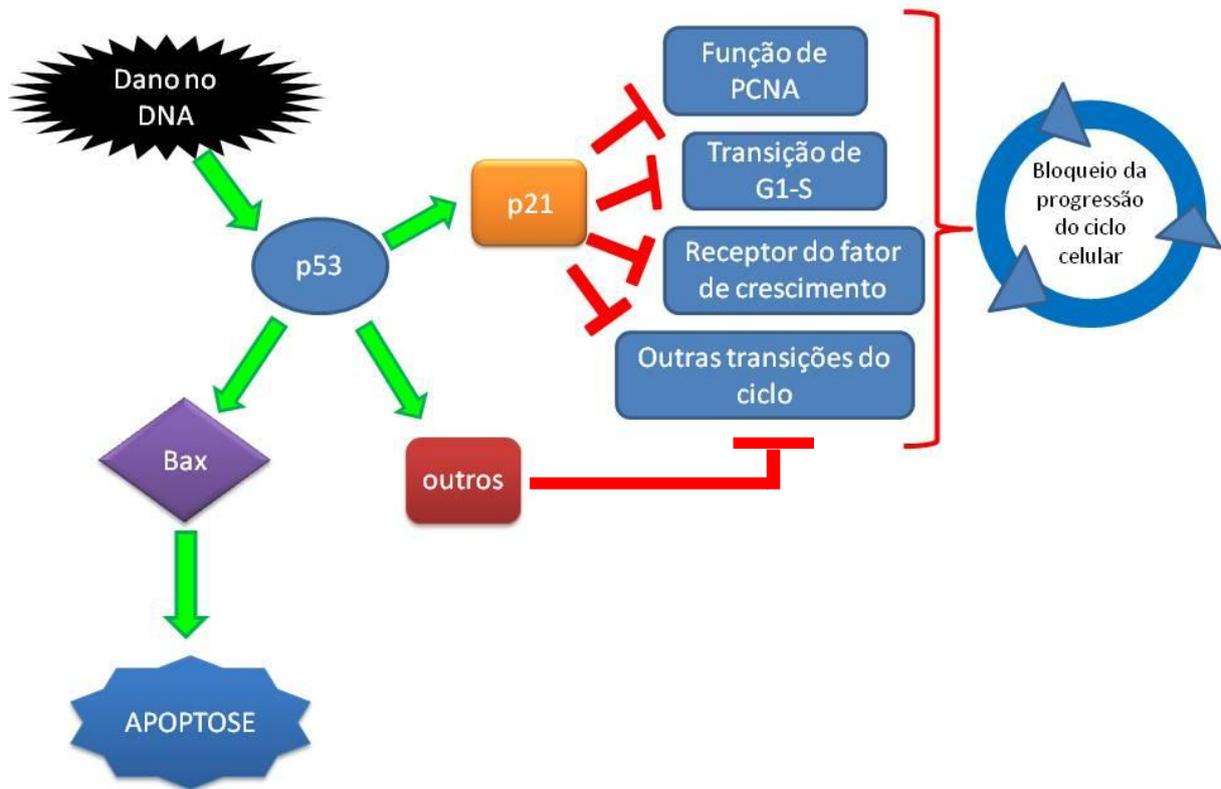


Fig. 6: Dano no DNA estimulando p53 a bloquear o ciclo celular através da regulação de genes supressores tumorais ou estimulando a célula a entrar em apoptose através da regulação de BAX.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

- Avaliar a perda de heterozigosidade em tumores odontogênicos mistos em regiões próximas a genes supressores de tumor que podem estar associadas à progressão tumoral.

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a perda de heterozigosidade na região dos marcadores D3S1293, D3S1029, D9S157, D9S171, D9S162, D11S1369, D11S1883, AFM238WF2 e p53.
- Comparar o perfil de perda de heterozigosidade em genes supressores de tumor no fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico e fibrossarcoma ameloblástico.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Seleção de amostras

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o parecer CAAE-0403.0.203.000-11 (anexo 1).

Cinco casos de FA, três de FOA e três de FSA incluídos em parafina foram selecionados de um total de 2.192 tumores odontogênicos. Estas lesões foram recuperadas dos arquivos do serviço de Patologia Bucal da Universidade Federal de Minas Gerais (Brasil), Universidade de Campinas (Brasil), e Universidade Autónoma Metropolitana-Xochimilco (México), sendo 15 (0,68%), 13 (0,59%) e 3 (0,091%) dos tumores odontogênicos correspondentes a FA, FOA, e FSA respectivamente. Os casos que apresentavam pouco tecido ou que não apresentavam tecido normal e tumoral referentes ao mesmo paciente foram excluídos do estudo totalizado uma amostra de 5 FAs, 3 FOAs e 3 FSAs. As principais características clínicas das lesões selecionadas estão incluídas na tabela 2.

Tabela 2: Características clinicopatológicas

Amostras	Diagnóstico histopatológico	Idade	Gênero	Localização
1	FA	9	M	Região posterior de mandíbula
2	FA	12	M	Região posterior de mandíbula
3	FA	7	F	Região posterior de mandíbula
4	FA	14	F	Região posterior de mandíbula
5	FA	7	F	Região posterior de mandíbula
6	FOA	11	M	Região posterior de mandíbula
7	FOA	8	M	Região posterior de mandíbula
8	FOA	9	F	Região posterior de mandíbula
9	FSA	24	F	Região posterior de mandíbula
10	FSA	25	M	Região posterior de mandíbula
11	FSA	24	M	Região posterior de mandíbula

3.2 Microdissecção dos tecidos incluídos em parafina

Para confirmação do diagnóstico, cortes histológicos de 5 µm de cada amostra foram corados com hematoxilina e eosina e examinados por três patologistas de acordo com critérios previamente estabelecidos pela OMS (2005) (BARNES *et al.*, 2005). Regiões normais e tumorais dos tecidos foram identificadas sobre microscopia óptica de luz (100X) e marcadas com uma caneta permanente. A lâmina com o corte histológico delimitado (tecido normal x tecido tumoral) foi sobreposta ao tecido armazenado em bloco de parafina e, com o auxílio de uma lâmina de bisturi nº15, tais áreas foram separadas e posteriormente microdissecadas com uma variação de 10 a 30 cortes de 10 µm dependendo da quantidade e qualidade do material armazenado.

3.3 Extração de DNA

Os tecidos foram desparafinizados em três banhos de xilol aquecido a 65°C por 10 min e, em seguida, reidratados em banhos decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e digeridos com proteinase K. O DNA foi extraído com *DNeasy Blood and Tissue Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). Para avaliar LOH, foi selecionado um painel de nove marcadores para as regiões microssatélites localizadas nos cromossomos 3p, 9p, 11p, 11q e 17p (Tabela 3).

Tabela 3: Dados dos primers utilizados para as regiões 3p, 9p, 11p, 11q e 17p.

Marcador	Lócus	Sequência dos primers	Tipo de repetição	Tamanho do produto de PCR	Gene envolvido
D3S1029	3p21.2	F: ATACTCTGGACCCAGATTGATTAC R: TAATCCCAAATGGTTTAGGGGAG	Di (CA)	168 bp	<i>MLH1</i>
D3S1293	3p24.3	F: ACTCACAGAGCCTTCACA R: CATGGAAATAGAACAGGGT	Di (CA)	116-144 bp	<i>RARβ</i>
D9S157	9p22	F: AGCAAGGCAAGCCACATTTTC R: TGGGGATGCCAGATAACTATATC	Di (CA)	133-149 bp	<i>SH3GL2</i>
D9S162	9p22-p13	F: GCAATGACCAGTTAAGGTTC R: AATCCCAACAACAATCTCC	Di (CA)	172-196 bp	<i>SLC24A2/P16</i>
D9S171	9p22-p21	F: AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT R: ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT	Di (CA)	158-177 bp	<i>BDMF/P16</i>
D11S1369	11q13.4	F: CCACAGCACTGATACATGGA R: TCAGTCTCAAGTCAAAGTAATCG	Tetra (GATA)	180 bp	<i>FCHSD2</i>
D11S1883	11p15.5	F: AACACGAGGTTAAGCAGAG R: GAATGAAGAATTTTCCAAACTAC	Di (CA)	195-211 bp	<i>NUP98</i>
AFM238WF2	17p13.1	F: AACAGCCTGTGCAACATAGT R: AGCTCGAAGCAACAACACTT	Di (CA)	160 bp	<i>CHRN1</i>
<i>TP53</i>	17p13.1	F: TACAGGGATAGGTAGCCCGAG R: GGATTTGGGCTCTTTTGTA	Di (CA)	149 bp	<i>TP53</i>

Os primers possuem marcadores fluorescentes e englobam regiões microssatélites próximas a genes supressores de tumor. A amplificação do DNA foi realizada através da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction-PCR*). Para cada amostra foi adicionado mix contendo 0,7 μ M de cada primer, 500 ng de DNA extraído, 0,25 mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 2,5 mM de cloreto de magnésio, 1,5 μ L (1X) de tampão de PCR comercial e 0,6 U de enzima (AmpliTaq Gold polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), totalizando um volume final de 15 μ L. A amplificação do DNA normal e tumoral foi realizada sob as mesmas condições térmicas demonstradas na tabela 4 e os produtos de PCR variaram de 116 a 211 pares de bases.

Tabela 4: Condições térmicas de PCR

Marcadores	Desnaturação inicial	45 x			Entensão Final	Hold
		Desnaturação	Anelamento	Extensão		
P53 D9S162	10min 95°	10 seg 96°	30 seg 58°	1 min 70°	30 min 70°	4°
D3S1293 D9S171 D11S1883	10min 95°	10 seg 96°	30 seg 57°	2 min 70°	30 min 70°	4°
D9S157 D3S1029 D11S1369 AFM238WF2	10min 95°	10 seg 96°	30 seg 60°	1 min 70°	30 min 72°	4°

3.4 Método para análise de LOH

Os produtos de PCR amplificados foram revelados em gel de poliacrilamida a 8% e visualizados através da coloração de prata. Foi diluído 1 µL do PCR em água milliQ numa proporção que variou de 1:0 a 1:80 (produto de PCR : água milliQ). Desta diluição, 1 µL foi homogeneizado com 12 µL de formamida e 0,5 µL de GeneScan (500) TAMRA (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 95° e posteriormente analisadas por eletroforese capilar no equipamento ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) onde foram obtidos os resultados da região alvo amplificada.

Os resultados foram analisados através do software Genescan, version 3.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e a LOH foi calculada baseando-se no valor da altura do alelo 1 (A1) / altura do alelo 2 (A2) das amostras de tecido normal e tumoral (VAN HOUTEN *et al.*, 2000) de acordo com a fórmula:

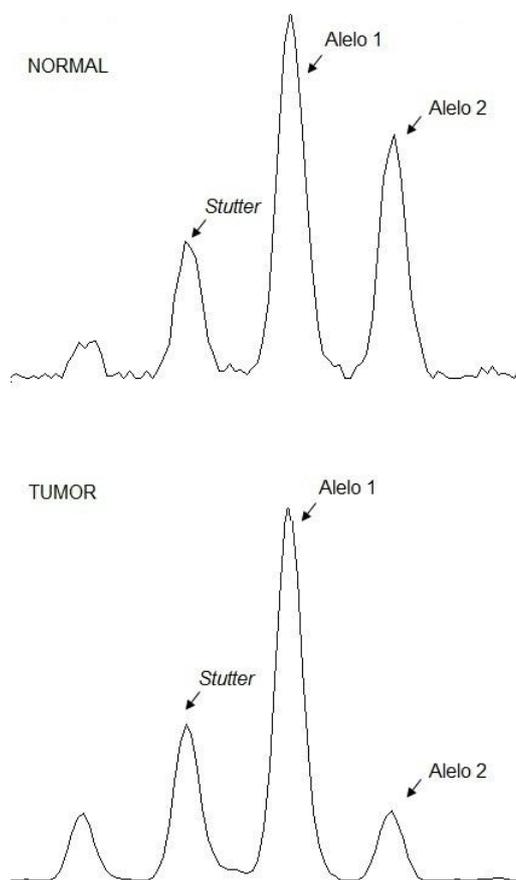
$$\frac{A1: A2 \text{ (normal)}}{A1:A2 \text{ (tumor)}}$$

LOH foi considerada quando um alelo (pico) na amostra de tumor foi menor do que 50% quando comparado com a amostra normal, seguido por correção de *stutter*, quando necessário (*score* <0,5 ou > 2).

O *stutter* é a presença de picos menores que surgem antes do pico principal (alelo) devido a dois fatores. O primeiro, causado por deslizamento (*slippage*) da enzima polimerase principalmente quando se trata de mono-di ou trinucleotídeos. O segundo fator é devido a falhas durante a adição do nucleotídeo adenina (A) na extensão final da PCR (VAN HOUTEN *et al.*, 2000).

Quando dois alelos estão muito próximos um do outro, o valor do *stutter* do segundo alelo (A2) pode estar somado ao alelo 1 (A1) gerando um resultado falso positivo para LOH (os valores dos alelos e do *stutter* é fornecido pelo software Genescan, version 3.0 - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Portanto, nestes casos, o valor do alelo 1 deverá ser corrigido, na amostra normal e tumoral, antes de calcularmos a LOH. Para isso, utilizamos amostras não informativas a fim de obter um valor numérico do quanto o *stutter* representa em relação ao alelo principal. Este valor foi chamado de Fator de Correção e é determinado dividindo a altura do *stutter* pela altura do alelo como demonstrado pela fórmula na figura 7A. Posteriormente, para obter a altura real do alelo 1, a banda do *stutter* do alelo 2 deverá ser subtraída através da fórmula: $A1 = A1 - (FC \times A2)$ (figura7B). Finalmente, podemos calcular o verdadeiro valor de LOH utilizando o A1 corrigido.

Figura 7: Imagem ilustrativa de um eletroferograma em que a correção de *stutter* é necessária. Ao lado os passos e fórmulas necessárias para correção do alelo 1.



Fórmula para calcular LOH com correção de *stutter*

A) Calcular fator de correção (FC)

$$FC = \frac{\text{altura do } \textit{stutter}}{\text{altura do alelo}}$$

B) Fazer correção do alelo 1 (A1)

$$A1 \text{ corrigido} = A1 - (A2 \times FC)$$

C) Calcular a LOH baseando no valor da altura do A1 corrigido

$$\frac{A1 - (A2 \times FC) / A2 \text{ (normal)}}{A1 - (A2 \times FC) / A2 \text{ (tumor)}}$$

As amostras em que a razão entre os valores dos alelos do tecido normal e tumoral foram menores ou igual a 5 ou maiores ou igual a 2 foram denominadas como LOH (Figura 8A). Os valores encontrados entre 0,5 e 2,0 foram considerados como heterozigotos (Figura 8B). Aqueles casos que apresentaram apenas um alelo no DNA de tecido normal (homozigoto) ou que os resultados não foram claros, devido à presença de artefatos, foram considerados como não informativos (NI).

Figura 8: Exemplo representativo da análise de microssatélite apresentando LOH na região 17p13 (p53).

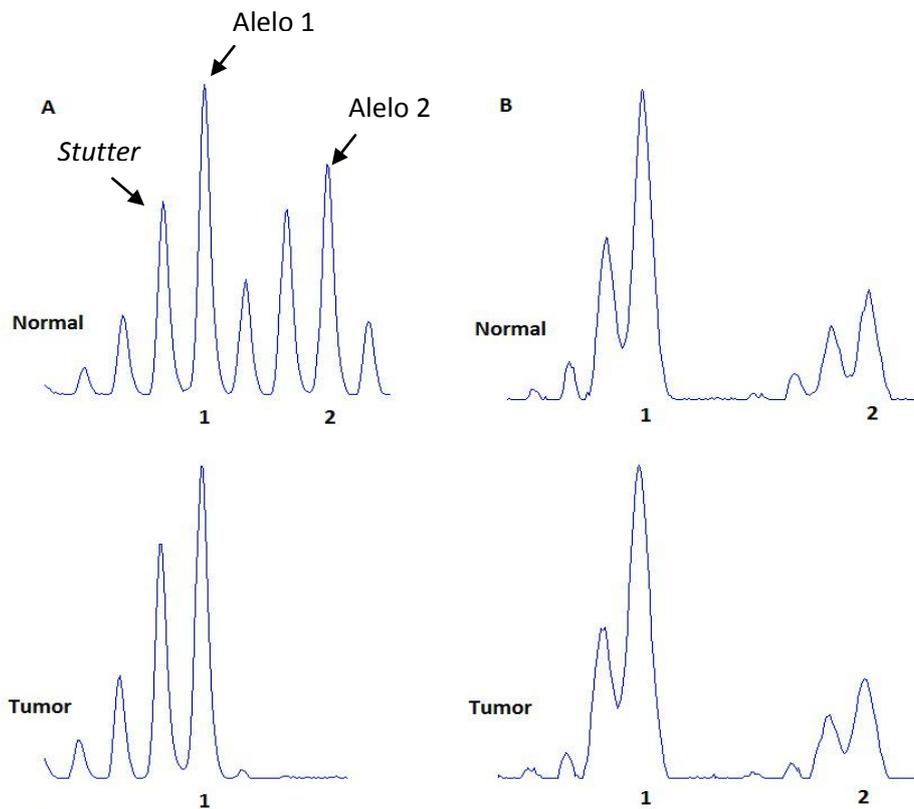


Fig. 8 (A) Células de DNA tumoral da amostra #4 apresentando perda do alelo curto comparado com o DNA de células normais. (B) Amostra #3 foi heterozigota como indicado pela presença de dois alelos e a ausência de LOH. 1: alelo curto. 2: alelo longo. LOH: perda de heterozigosidade.

A frequência de perda alélica foi calculada para cada amostra e para cada marcador através do número de *loci* que apresentaram LOH, dividindo pelo número de *loci* que foram informativos (FOWLER *et al.*, 2006). Três amostras de carcinoma de células escamosas foram usadas como controle positivo para as regiões analisadas devido à presença de altas taxas de LOH para esta lesão.

4. RESULTADOS

Os resultados deste trabalho estão apresentados na forma de artigo aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*, que se encontra no apêndice 1. Contudo, os resultados serão descritos a seguir de forma detalhada.

4.1 Análise de LOH

Os resultados referentes à LOH em FA, FOA e FSA estão ilustrados na figura 9.

Figura 9: Análise da LOH em nove marcadores de microssatélites em FA, FOA, FSA.

Amostras	Marcadores de microssatélites								
	D3S1029	D3S1293	D9S157	D9S171	D9S162	D11S1369	D11S1883	P53	AFM238WF2
1 FA	○	-	○	○	○	○	○	○	○
2 FA	⊗	⊗	⊗	○	○	○	⊗	⊗	●
3 FA	⊗	⊗	⊗	○	○	⊗	⊗	⊗	⊗
4 FA	○	-	○	○	○	-	○	●	⊗
5 FA	-	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗	⊗
6 FOA	⊗	⊗	⊗	○	-	○	●	●	⊗
7 FOA	⊗	⊗	⊗	○	○	○	○	●	●
8 FOA	⊗	⊗	⊗	⊗	●	⊗	-	●	●
9 FSA	-	●	○	●	○	○	⊗	○	●
10 FSA	○	⊗	●	●	○	-	●	●	●
11 FSA	⊗	●	●	○	○	○	○	○	○

LEGENDA: ○ Homozigoto (não-informativo)
 ⊗ Heterozigoto
 ● LOH
 - Não foi possível analisar (não-informativo)

A média da frequência de perda alélica em todos os tumores avaliados foi de 36,3%, demonstrados detalhadamente na tabela 5. A média de locus informativo por caso analisado foi de 5,0 (intervalo 0-8).

Analisando a frequência de perda alélica em cada marcador incluído neste estudo, os *loci* que registraram o maior acúmulo de LOH estavam presentes na região 17p13 (p53- 62% e CHRN1- 55%). Nenhuma das lesões avaliadas apresentaram LOH nos marcadores D11S1369 (11q13.4) e D3S1029 (3p21.2) (Tabela 6).

Um padrão distinto de LOH foi observado no FOA quando comparado ao FA, sendo a média da frequência de perda alélica igual a 36,6% e 13,2% respectivamente. LOH foi observada em pelo menos dois marcadores nas três amostras de FOA e em apenas um marcador em duas amostras de FA.

Para a região 9p22-p13 (D9S162), apenas uma amostra de FOA exibiu o padrão de LOH. A média geral da frequência de perda alélica em todas as lesões benignas (FA e FOA) foi de 22%, enquanto para as lesões malignas, a média foi de 74,6%. Além disso, o FSA foi a única lesão que apresentou LOH no braço curto dos cromossomos 3 e 9 nos *loci* 3p24.3 (D31293), 9p22-p21 (D9S171) e 9p22 (D9S157).

Tabela 5: Frequência de perda alélica para cada amostra de fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico e fibrossarcoma ameloblástico.

Amostra	Diagnóstico	FAL (%)
1	<i>Fibroma ameloblástico</i>	0
2	<i>Fibroma ameloblástico</i>	16
3	<i>Fibroma ameloblástico</i>	0
4	<i>Fibroma ameloblástico</i>	50
5	<i>Fibroma ameloblástico</i>	0
6	<i>Fibro-odontoma ameloblástico</i>	33
7	<i>Fibro-odontoma ameloblástico</i>	30
8	<i>Fibro-odontoma ameloblástico</i>	37
9	<i>Fibrossarcoma ameloblástico</i>	75
10	<i>Fibrossarcoma ameloblástico</i>	83
11	<i>Fibrossarcoma ameloblástico</i>	66

Tabela 6: Média da frequência de perda alélica em todos os *loci* avaliados.

Cromossomo	Marcador	Gene envolvido	FAL (%)
3	D3S1029	SACM1L/ MLH1	0/6 (0%)
3	D3S1293	RAR β	2/9 (22%)
9	D9S157	SH3GL2	2/8 (25%)
9	D9S162	SLC24A2/ p16	1/2 (50%)
9	D9S171	BDMF/P16	2/4 (50%)
11	D11S1369	FCHSD2	0/3 (0%)
11	D11S1883	NUP98	2/6 (33%)
17	AFM238WF2	CHRNA1	5/9 (55%)
17	TP53	TP53	5/8 (62%)

5. DISCUSSÃO

Os tumores odontogênicos são raras lesões que originam dos tecidos que formam os dentes. Alguns destes tumores são denominados tumores odontogênicos mistos por originarem de ambos os componentes, epiteliais e ectomesenquimais, podendo ou não apresentar formação de tecido mineralizado (esmalte e dentina) (PHILIPSEN *et al.*, 1997).

Os tumores odontogênicos mistos surgem durante o período de desenvolvimento dos dentes e acometem prevalentemente a região posterior de mandíbula de crianças e adolescentes (SLOOTWEG, 1981; PHILIPSEN *et al.*, 1997). Trata-se dos FA, FOA, FSA, fibrodentinoma ameloblástico, odontoma e odonto-ameloblastoma, tumor odontogênico calcificante cístico e tumor de células fantasmas dentinogênico (BARNES *et al.*, 2005). Estas lesões são extremamente incomuns com exceção dos odontomas, considerados hamartomas e não neoplasias verdadeiras, que são frequentemente encontrados na população abaixo dos 20 anos de idade (BARNES *et al.*, 2005).

Neste estudo foram incluídos três tumores odontogênicos mistos, FA, FOA e FSA. O FA e o FOA fazem parte do grupo dos tumores odontogênicos benignos e são lesões muito semelhantes histologicamente derivadas do epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, mas que se diferem quanto à formação de estruturas mineralizadas (esmalte e dentina), presentes apenas nos FOAs. O tratamento de ambos os tumores restringe-se à cirurgia conservadora. Recidivas de FOA são extremamente raras, por se tratar de lesões bem delimitadas e que se destacam facilmente durante o procedimento cirúrgico. Entretanto alguns casos de recidiva, mesmo que raros, são relatados na literatura (FRIEDRICH *et al.*, 2001). Os

FAs, ao contrário do FOA, apresentam maior potencial de recorrência com probabilidade para transformação maligna como FSA (SZABOLCS *et al.*, 2007, WILLIAMS *et al.*, 2007).

O FSA, considerado a contraparte maligna do FA, é uma lesão em que o componente mesenquimal apresenta características sarcomatosas enquanto o epitélio é benigno, sendo classificado dentro do grupo dos sarcomas odontogênicos. O tratamento para estes casos é a cirurgia radical podendo ocorrer recidivas ou o aparecimento de uma nova lesão, sendo 45% dos FSAs derivados de um FA pré-existente (MULLER *et al.*, 1995; PHILIPSEN *et al.*, 1997; BARNES *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2009).

Confirmando-se a característica de se tratar de lesões incomuns, FA, FOA e FSA corresponderam, respectivamente, a 0,68, 0,59 e 0,09% de todos os tumores odontogênicos diagnosticados nos arquivos pesquisados neste estudo. Tais dados podem sofrer pequenas variações de acordo com o grupo populacional estudado (PHILLIPSEN 1997; BARNES *et al.*, 2005).

Alterações genéticas estão diretamente envolvidas no processo de formação dos tumores odontogênicos e a inativação e deleção de genes supressores de tumor constituem eventos moleculares que contribuem para a tumorigênese (MIGALDI *et al.*, 2008; KUMAMOTO *et al.*, 2004).

A análise de LOH é uma técnica que permite identificar genes supressores de tumor pontuais e as respectivas regiões com deleções através da análise dos microssatélites, regiões repetitivas de bases, altamente polimórficas e suscetíveis a erros durante a replicação do DNA (SZUKALA *et al.*, 2006). Este é um evento comum entre uma série de tumores humanos e pode estar envolvido no

desenvolvimento dos tumores odontogênicos através de alterações no controle do ciclo celular (CARVALHAIS *et al.*, 1999; KUMAMOTO *et al.*, 2006; MIGALDI *et al.*, 2008). Apesar de ser frequente, a LOH não está sempre presente no mesmo tipo de tumor, sendo necessária a escolha de vários marcadores de microssatélites em diferentes regiões cromossômicas e no mesmo cromossomo (NAKAMURA *et al.*, 2009).

Neste estudo, nove marcadores para regiões microssatélites, localizadas nos cromossomos 3p, 9p, 11p, 11q e 17p, foram selecionados para análise de LOH em tumores odontogênicos mistos. Tais regiões apresentam alta frequência de deleções e estão próximas a genes supressores de tumor importantes no desenvolvimento de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas (FIELD *et al.*, 1995; BREMMER *et al.* 2008; GRAVELAND *et al.*, 2011).

Os genes supressores de tumor estão integralmente envolvidos no ciclo celular, que vai desde a fase G1 até a completa finalização da mitose, regulando os mecanismos de divisão da célula (HANAHAN & WEINBERG, 2000). Tais genes são capazes de detectar falhas durante a replicação do DNA e bloquear, a qualquer momento, a divisão da célula (BARTEK & LUKAS, 2001). Existem vários genes responsáveis pela manutenção da integridade do genoma humano, como o *P16* e o *TP53* que aparecem alterados em grande parte dos tumores humanos (FIELD *et al.*, 1994; GRADY *et al.*, 2001).

Expressão anormal do gene *P16*, localizado no cromossomo 9p, contribui para o crescimento do tumor principalmente através do aumento da atividade proliferativa na carcinogênese (BARTEK & LUKAS, 2001).

Os marcadores para as regiões de microssatélites, D9S157, D9S162 e D9S171, localizados na região 9p21-23, englobam vários genes supressores de tumor, sendo o mais conhecido o *P16 (CDKN2)*, inibidor da quinase dependente de ciclina. A inativação de *CDKN2*, por deleção, mutação pontual ou metilação das regiões promotoras, pode aumentar a progressão de tumores através do ciclo celular (MARIATOS *et al.*, 2000; GRADY *et.al.*, 2001). Embora nem todos os marcadores estejam relacionados diretamente ao gene *P16*, acredita-se que alterações nesta região influenciem a regulação de outros genes importantes para a progressão tumoral.

Um gene próximo ao marcador D9S157 é o *SH3GL2*, também considerado forte candidato a supressor de tumor, desempenhando um papel fundamental na degradação do receptor do fator de crescimento epidérmico, impedindo a sinalização desenfreada para o crescimento e proliferação celular (SINHA *et al.*, 2008).

Perda na região 9p21-23 tem sido demonstrada em câncer de pulmão, bexiga, próstata, carcinoma de células renais e câncer de cabeça e pescoço e, muitas vezes, tem-se relacionado a um pior prognóstico ou à progressão destes tumores (FIELD *et al.*, 1996; FIELD *et al.*, 1995; GRADY *et.al.*, 2001; BRUNELLI *et al.*, 2008).

LOH no marcador D9S162 foi observada em apenas uma amostra de FOA, enquanto D9S171 e D9S157 apresentaram LOH em duas das amostras de FSA analisadas.

Outras alterações no cromossomo 9p, como metilação do gene *P16*, foram descritas em ameloblastoma e outros tumores odontogênicos e é provável que, em diversos tipos de tumores, os mecanismos de inativação do *P16* ocorram através da

metilação ou mutação (PERDIGAO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2010). Novos estudos devem ser realizados para aprofundar a ação deste gene e investigar novos genes supressores de tumor envolvidos em tumores odontogênicos mistos.

O gene mais frequentemente alterado em tumores humanos é o *TP53*, conhecido como “guardião do genoma” que quando ativado, desempenha um papel importante na resposta ao dano genômico regulando uma série de vias que irão proporcionar o reparo do DNA (LEVINE *et al.*, 1991; BARTEK & LUKAS, 2001). Quando não for possível ocorrer o reparo, o *TP53* poderá interromper o ciclo celular e estimular a célula a entrar em apoptose (LEVINE *et al.*, 1991). Algumas das alterações neste gene ocorrem por mutações pontuais que não são detectáveis por análise de LOH (PETITJEAN *et al.*, 2007).

Embora o aumento de expressão imuno-histoquímica da proteína p53 tenha sido detectado em ameloblastomas, carcinomas primários intra-ósseos, FSA e sarcomas, as alterações genéticas e epigenéticas em *TP53* foram mais frequentemente relatadas em ameloblastomas, tumor odontogênico calcificante cístico e tumor odontogênico adenomatóide (DE PAULA *et al.*, 2003; KUMAMOTO *et al.*, 2004; MIGALDI *et al.*, 2008; SAGHAFI *et al.*, 2010).

Na região cromossômica 17p13.1, além do marcador para o gene *TP53*, encontra-se outro marcador de microssatélite, o AFM238WF2. Este é um marcador para o locus *CHRNA1* que se encontra próximo à região do *TP53*. Observamos que deleções nestes marcadores estiveram presentes nos três grupos de lesões, embora nos FAs, a LOH tenha sido encontrada em apenas duas das lesões investigadas.

Aumento no índice de proliferação celular foi demonstrado em amostras de FSA e FA que recidivaram, comparado aos demais FAs (SANO *et al.* 1998). Assim sendo, alguns FAs talvez tenham a capacidade individual de acumular alterações genéticas podendo evoluir para um prognóstico desfavorável. Neste estudo, duas das amostras de FA apresentaram perda na região 17p13. Esta pode ter sido uma alteração eventual ou uma característica genética que possa contribuir para uma futura recidiva ou uma transformação maligna. Mais estudos são necessários para demonstrar se alterações na região 17p13 representam uma via genética comum para o desenvolvimento dos tumores odontogênicos mistos.

No cromossomo 3 foi detectada uma série de genes supressores de tumor, sendo alguns destes relacionados aos carcinomas de cabeça e pescoço (ROWLEY *et al.*, 1996). Dois marcadores selecionados para este estudo estão presentes nesta região: o D3S1029 e o D3S1293.

O marcador D3S1029 (3p21.2) encontra-se próximo ao gene *MLH1*(3p22.3) (SRIVASTAVA *et al.*, 2007) e está relacionado ao mecanismo de reparo, sendo capaz de fornecer instruções para corrigir erros que ocorrem durante a replicação do DNA em preparação para a divisão celular. Não foi identificada neste marcador LOH em nenhuma das lesões investigadas neste estudo.

LOH na região 3p24.3(D3S1293) foi encontrada apenas nas amostras de FSA. Este marcador está localizado próximo ao gene *RARβ* (*retinoic acid receptor beta*- 3p24), que regula os retinóides. Os retinóides e seus análogos interferem na morfogênese, no desenvolvimento, crescimento e diferenciação das células por modular a expressão gênica. Autores sugerem que a via de sinalização dependente dos retinóides tem um papel na supressão da carcinogênese (LOTAN *et al.*,1995). Foi demonstrado que alterações no nível de expressão e função do ácido retinóico

(*RARB*) estão associadas à carcinogênese e à transformação maligna nas células humanas (QUI *et al.*, 2000).

Um estudo avaliando marcadores de microssatélites na região do cromossomo 3 em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço mostrou que, dentre todos os marcadores avaliados, o D3S1293 foi o que apresentou maior índice de perda, indicando possíveis sítios de genes supressores de tumor nesta região (FIELD *et al.*, 1994).

No cromossomo 11 também se encontra uma série de marcadores de microssatélites deletados em diversos tumores. Entretanto, o marcador D11S1369 localizado próximo ao gene *FCHSD2* não apresentou LOH em nenhuma das amostras, enquanto o marcador D11S1883, região do gene *NUP98*, apresentou deleções tanto no FOA como no FSA.

Apesar de os FAs, FOAs e FSAs serem considerados tumores odontogênicos mistos, ainda prevalecem dúvidas a respeito do desenvolvimento dessas lesões.

Existem questionamentos se o FA, considerado um verdadeiro tumor odontogênico benigno, não representaria um odontoma em desenvolvimento. As primeiras especulações vieram baseando-se na hipótese de que o FA deveria se desenvolver eventualmente dentro de um odontoma, tendo como única diferença entre estas lesões a idade e o tempo de maturação. Entretanto, este conceito não foi aceito, pois tais lesões apresentam a mesma característica, mesmo quando observados em diversos estágios de desenvolvimento. Além disso, alguns casos de FA foram observados em idades mais tardias, após a conclusão da odontogênese. Como os odontomas são hamartomas que se desenvolvem durante o período

normal da odontogênese, qualquer FA encontrado após este tempo seria improvável que representasse um odontoma em desenvolvimento (GARDNER, 1984).

Ainda se pensava que os FAs se diferenciariam ou amadureceriam até se transformar em FOA que sucessivamente continuaria sua maturação até se diferenciar completamente em um odontoma. Entretanto, os dados clínicos deveriam apoiar esta hipótese, ou seja, o FA deveria ocorrer em pacientes mais jovens, seguido pelo FOA que ocorreria em uma idade intermediária e posteriormente surgiria o odontoma, em pacientes um pouco mais velhos (SLOOTWEG, 1981). Sloodweg, em 1981, investigando esta hipótese sugeriu que os FAs ocorrem em uma idade posterior ao FOA, não suportando o conceito de que este tumor poderia evoluir para um odontoma, mas representaria uma entidade separada (SLOOTWEG, 1981).

Contudo, Gardner (1984) levantou a questão de que os chamados FAs de Sloodweg poderiam ter sido odontomas em desenvolvimento, afetando os resultados encontrados. Portanto, sugere-se que achados clínicos devem ser considerados, porque não é possível a distinção histológica entre o FA e o odontoma em desenvolvimento; o mesmo se aplica para os FOAs. Uma pequena lesão situada na superfície oclusal de um molar não erupcionado de uma criança deveria ser provavelmente diagnosticada como um odontoma em desenvolvimento, pois a localização é típica e a odontogênese ainda não está completa. Por outro lado, uma lesão ampla e destrutiva, mesmo que situada próxima a um dente não erupcionado, deveria ser considerada uma neoplasia verdadeira (GARDNER *et al.*, 1984).

No presente estudo, dois FAs (amostras 1 e 2) e dois FOAs (amostras 7 e 8) apresentaram características clínicas e radiográficas compatíveis com odontoma em

desenvolvimento, enquanto as demais amostras (3, 4, 5 e 6) apresentaram características de uma neoplasia verdadeira. Entretanto, tais lesões não se distinguiram em relação às análises moleculares, uma vez que tanto as lesões 2 e 7 (com características de um odontoma em desenvolvimento) como a 4 e a 6 (com característica de uma neoplasia verdadeira), apresentaram perda para a região 17p13 (*P53* e *CHRN1*).

Nas amostras de FOA, foi registrado um alto acúmulo de LOH quando comparado aos casos de FA (frequência de perda alélica: 36,6% e 13,2% respectivamente). Embora FOA e FA apresentem semelhanças histológicas, estes resultados sugerem que tais lesões têm diferenças na sua tumorigênese e podem apresentar um padrão genético distinto.

Analisando os três grupos de lesões (FA, FOA e FSA), a média de FAL foi de 36,3% e a LOH foi observada nos *loci* cromossômicos 3p, 9p, 11p e 17p. LOH nestas regiões têm sido descritas em câncer de pulmão, mama, carcinoma de células escamosas de boca e lesões pré-neoplásicas como leucoplasia bucal (FIELD *et al.*, 1995; FIELD *et al.*, 1996; DILLON *et al.*, 1997; SIKDAR *et al.*, 2003; BREMMER *et al.*, 2008; ASHAZILA *et al.*, 2011).

LOH nas regiões 17p, 3p e 9p tem sido associada a um pior prognóstico e ao risco de progressão tumoral em carcinomas de cabeça e pescoço (FIELD *et al.*, 1995; MURALI *et al.*, 2011; GRAVELAND *et al.*, 2011). Entretanto, um estudo avaliando a LOH nas regiões 1p, 3p, 9p, 10q e 17p em ameloblastomas e carcinomas ameloblásticos, demonstrou que não houve correlação entre a LOH e a agressividade da lesão uma vez que os carcinomas ameloblásticos não abrigaram maior número de perdas alélicas (NODIT *et al.*, 2004)

Contudo, neste estudo, LOH nas regiões 3p24.3 (D2S1293), 9p22-p21 (D9S171) e 9p22 (D9S157) foi encontrada apenas no grupo de lesões malignas. A média total da FAL nos FSA foi de 74,6%, enquanto nas lesões benignas, FA e FOA foram de 13,2% e 36,6%, respectivamente. Assim, o FSA parece estar associado a um maior número e diversidade de genes supressores de tumor comprometidos, podendo ser considerados marcadores para progressão maligna, constituindo uma hipótese atrativa para futuras investigações.

Os resultados mostraram que FA, FOA e FSA apresentam padrões distintos de LOH e que estes achados podem ser úteis no diagnóstico diferencial entre FA e FSA. Entretanto, novos estudos são necessários para confirmar e determinar se tais alterações representam uma via genética comum para a progressão dos tumores odontogênicos mistos.

6. CONCLUSÃO

- Os tumores odontogênicos mistos apresentam padrões distintos de perda de heterozigosidade.
- O fibro-odontoma ameloblástico apresenta maior perda alélica de genes supressores de tumor quando comparado ao fibroma ameloblástico.
- O fibrossarcoma ameloblástico apresenta maior acúmulo de LOH em genes supressores de tumor do que os tumores odontogênicos benignos, fibroma ameloblástico e fibro-odontoma ameloblástico.
- Os resultados deste estudo sugerem que estes marcadores possam ser úteis no diagnóstico diferencial entre fibroma ameloblástico e fibrossarcoma ameloblástico.

7. REFERÊNCIAS

1. Adebayo ET, Ajike SO, Adekeye EO. Odontogenic tumors in children and adolescents: a study of 78 Nigerian cases. *J Cranio-Maxillofacial Surgery* 2002; 30: 267-72.
2. Ashazila MJ, Kannan TP, Venkatesh RN, Hoh BP. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinoma in Malaysian population. *Oral Oncol* 2011; 47:358-64.
3. Avelar RL, Antunes AA, Santos TS, Andrade ESS, Dourado E. Odontogenic tumors: clinical and pathology study of 238 cases. *Braz J Otorhinolaryngol* 2008; 74:668-73.
4. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sindransky D. World Health Organizations Classification of Tumour. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
5. Bartek J; Lukas J, Pathways governing G1/S transition and their response to DNA damage. *FEBS Lett* 2001;490:117-22.
6. Bregni CR, Taylor mosqueda A, Garcia MA. Ameloblastic fibrosarcoma of the mandible:report of two cases and review of the literature. *J Oral Pathol Med* 2001, 30:316-20.
7. Bremner JF, Braakhuis BJM, Brink A, *et al.* Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 599-606.
8. Brunelli M, Eccher A, Gobbo S, Ficarra V, Novara G, *et al.* Loss of chromosome 9p is an independent prognostic factor in patients with clear cell renal cell carcinoma. *Mod Pathology* 2008; 21: 1–6.
9. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64:1343-52.
10. Carvalhais J, Aguiar M, Araujo V, Araujo N, Gomez R. p53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumours. *Oral Dis* 1999;5:218-22.
11. Cohen DM, Bhattacharyya I. Ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma and odontoma. *Oral Maxillofac Surg Clin* 2004,16:375–84.
12. Collin-Chavagnac D, Marçais C, Billon S, *et al.* Quantitative loss of heterozygosity analysis for urothelial carcinoma detection and prognosis. *Urology* 2010;76:515-7.

13. Daley TD, Wysocki GP, Pringle GA. Relative incidence of odontogenic tumors and oral and jaw cysts in a Canadian population. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol* 1994; 77: 276-80.
14. De Paula AMB, da Costa Neto JQ, da Silva GE, Guimaraes Santos FB, Gomez RS. Immunolocalization of the p53 protein in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2003;61:256-8.
15. Dillon EK, de Boer WB, Papadimitriou JM, Turbett GR. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in mammary carcinoma and its probable precursors. *Br J Cancer* 1997;76:156-62.
16. Field JK, Kiaris H, Risk JM, *et al.* Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer* 1995;72:1180-8.
17. Field JK, Neville EM, Stewart MP, *et al.* Fractional allele loss data indicate distinct genetic populations in the development of non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996;74:1968-74.
18. Field JK, Tsiriyotis C, zoumpourlis V, Howard P, da Spandidos, Jones AS. Allele loss on chromosome-3 in squamous-cell carcinoma of the head and neck correlates with poor clinical prognostic indicators. *Int J of Oncology* 1994; 4: 543-549.
19. Fowler MH, Fowler J, Ducatman B, Barnes L, Hunt JL. Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. *Mod Pathol* 2006; 19:350–5.
20. Friedrich RE, Siegert J, Donath K, Ja“kel T. Recurrent meloblastic Fibro-Odontoma in a 10-Year-Old Boy. *J Oral Maxillofac Surg* 2001; 59:1362-66.
21. Fumio I, Mishima K, Saito I, Kusama K. Rare peripheral odontogenic tumors: report of 5 cases and comprehensive review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008;106: 22-28.
22. Gardner DG. The mixed odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984;58:166-8.
23. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2010; 39: 585–91.
24. Grady B, Goharderakhshan R, Chang J, Ribeiro-Filho LA, *et al.* Frequently deleted loci on chromosome 9 may harbor several tumor suppressor genes in human renal cell carcinoma. *J Urology* 2001; 166: 1088-92.
25. Graveland AP, Golusinski PJ, Buijize M, *et al.* Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011; 128:1852-9.
26. Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. **Cell** 2000; 100:57-70.

27. Jackson JG, Post SM, Lozano G. Regulation of tissue- and stimulus-specific cell fate decisions by p53 in vivo. *J Pathol* 2011; 127–136.
28. Kobayashi K, Murakami R, Fujii T, Hirano A. Malignant transformation of ameloblastic fibroma to ameloblastic fibrosarcoma: case report and review of the literature. *J Craniofac Surg* 2005; 33:352-55.
29. Kousar A, Hosein MM, Ahmed Z, Minhas K. Rapid sarcomatous transformation of an ameloblastic fibroma of the mandible: case report and literature review. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;108:80-5.
30. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition. *Cancer* 1992;70:2988-94.
31. Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:292–9.
32. Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 2006;35:65-74.
33. Lee DJ, Schönleben F, Banuchi VE, Qiu W, Close LG, Assaad AM, Su GH. Multiple tumor-suppressor genes on chromosome 3p contribute to head and neck squamous cell carcinoma tumorigenesis. *Cancer Biology & Therapy* 2010; 689-693.
34. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991;35:453-6.
35. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004;21:991-1007.
36. Lotan R, Xu XC, Lippman SM, Ro JY, Lee JS, Lee JJ, Hong WK. Suppression of retinoic acid receptor-beta in premalignant oral lesions and its up-regulation by isotretinoin. *N Engl J Med* 1995; 1405-1411.
37. Mariatos G, Gorgoulis VG, Zacharatos P, *et al.* Expression of p16^{INK4A} and alterations of the 9p21-23 chromosome region in non-small-cell lung carcinomas: Relationship with tumor growth parameters and ploidy status. *Int J Cancer* 2000; 89: 133–141.
38. Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. *Oral Oncol* 2008; 44: 50–60.
39. Moreira PR, Guimaraes MM, Gomes CC, *et al.* Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol* 2009;54:893-7.
40. Mosqueda Taylor A. New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Cir Bucal* 2008; 13:555-8.
41. Muller S, Parker DC, Kapadia SB, Budnick SD, Barnes EL. Ameloblastic fibrosarcoma of the jaws. A clinicopathologic and DNA analysis of five cases and

review of the literature with discussion of its relationship to ameloblastic fibroma. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995;79:469-77.

42. Murali A, Sailasree R, Sebastian P, Rejnish Kumar R, Varghese BT, Kannan S. Loss of heterozygosity of D9S162: Molecular predictor for treatment response in oral carcinoma. *Oral Oncol* 2011;47:571-6.

43. Nakamura T , Sunami E , Nguyen T , Hoon DS . Analysis of Loss of Heterozygosity in Circulating DNA. *Methods Mol Biol* 2009; 520:221-9.

44. Nelson BL, Folk GS. Ameloblastic fibroma. *Head Neck Pathol* 2009; 3:51-3.

45. Neville, Brad W; Damm, Douglas D. *Patologia Oral e Maxilofacial - 3ª Ed.* Elsevier, Medicina Nacionais, 2009.

46. Nodit L, Barnes L, Childers E, Finkelstein S, Swalsky P, Hunt J. Allelic loss of tumor suppressor genes in ameloblastic tumors. *Mod Pathol* 2004;17:1062-67.

47. Ohno H, Hirabayashi S, Kansaku A, Yao I, Tajima M, Nishimura W, Ohnishi H, Mashima H, Fujita T, Omata M, Hata Y. Carom: a novel membrane-associated guanylate kinase-interacting protein with two SH3 domains. *Oncogene* 2003; 22:8422-31.

48. Papagerakis P, Peuchmaur M, Hotton D, *et al.* Aberrant gene expression in epithelial cells of mixed odontogenic tumors. *J Dent Res* 1999;78:20-30.

49. Perdigao PF, Gomez RS, Pimenta FJGS, DE Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncol* 2004; 40:841-6.

50. Petitjean A, Mathe E, Kato S, *et al.* Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007; 28: 622–9.

51. Philipsen HP, Reichart PA, Praetorius F. Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol* 1997;33:86-99.

52. Pitak-Arnnop P, Chaine A, Dhanuthai K, Bertrand JC, Bertolus C. Extensive ameloblastic fibroma in an adolescent patient: a case report with a follow-up of 4 years. *Eur J Dent.* 2009; 3:224-8.

53. Pontes FSC, Pontes HAR, Nogueira JES, Cury SEV, Araújo JF, Fonseca FP, Santos Pinto Jr.D. Ameloblastic fibro-odontoma: Case report with maintenance of the involved teeth. *International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology* 2008; 3: 48-52.

54. Pontes HA, Pontes FS, Silva BS, Cury SE, *et al.* Immunoeexpression of Ki67, proliferative cell nuclear antigen, and Bcl-2 proteins in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *Ann Diagn Pathol.* 2010;14:447-52.

55. Qiu H, Lotan R, Lippman SM, Xu XC. Lack of correlation between expression of retinoic acid receptor-beta and loss of heterozygosity on chromosome band 3p24 in esophageal cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 2000;28:196-202.
56. Rowley H, A Jones, Spandidos D, J Campo. Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by means of microsatellite markers. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*.1996; 122:497-501.
57. Saghafi S , Zare-Mahmoodabadi R, Salehinejad J , Kadeh H , Aghaee-Afzal M. Immunohistochemical analysis of p53 and PCNA expression in calcifying odontogenic cyst. *J Oral Sci* 2010; 52: 609-13.
58. Sano K, Yoshida S, Ninomiya H, Ikeda H, Ueno K, Sekine J, Iwamoto H, Uehara M, Inokuchi T. Assessment of growth potential by MIB-1 immunohistochemistry in ameloblastic fibroma and related lesions of the jaws compared with ameloblastic fibrosarcoma. *J Oral Pathol Med* 1998; 59-63.
59. Sikdar N, Paul RR, Panda CK, Banerjee SK, Roy B. Loss of heterozygosity at APC and MCC genes of oral cancer and leukoplakia tissues from Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med* 2003;32:450-4.
60. Silva GCC, Jham BC, Silva EC, Horta MCR, Godinho SHP, Gomez RS. Ameloblastic fibro-odontoma. *Oral Oncology* 2006; 42: 217- 20.
61. Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, et al. Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; 15: 1070–80.
62. Slootweg PJ. An analysis of the interrelationship of the mixed odontogenic tumors-ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and the odontomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 51:266-76.
63. Slootweg PJ. Odontogenic tumours—An update. *Current Diagnostic Pathology* 2006; 12: 54–65.
64. Song Z, Li R, You N, Tao K, Dou K. Loss of heterozygosity of the tumor suppressor gene Tg737 in the side population cells of hepatocellular carcinomas is associated with poor prognosis. *Mol Biol Rep* 2010;37:4091-101.
65. Srivastava T, Chosdol K, Chattopadhyay P, Sarkar C , Mahapatra A, Sinha S. Frequent loss of heterozygosity encompassing the hMLH1 locus in low grade astrocytic tumors. *J Neuro oncol* 2007; 249-55.
66. Szabolcs GG, Dániel T, György S, Zsuzsanna S. Mixed Odontogenic Tumors in Children and Adolescents. *J Craniofacial Surg* 2007;18:1338-1342.
67. Szukala K, Sowinska A, Wierzbicka M, Biczysko W, Szyfter W, Szyfter K. Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? *Mutat Res* 2006;600:67-76.

68. Takeda Y. Ameloblastic fibroma and related lesions: current pathologic concept. *Oral Oncol* 1999;35:535-40.
69. Tolentino ES, Centurion BS, Lima MC, Freitas-Faria P, Consalaro A, Sant'ana E; Ameloblastic fibro-odontoma: A diagnostic challeng. *Int J of Dent* 2010; 2010:1-4.
70. Uchiyama Y, Murakami S, Kishino M, Furukawa S. Ameloblastic fibro-odontoma arising in the mandible: three case reports. *Oral Radiol* 2009; 25:71–76.
71. Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, *et al.* Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000;6:3803-16.
72. Vasconcelos BC, Andrade ES, Rocha NS, Morais HH, Carvalho RW. Treatment of large ameloblastic fibroma: a case report. *J Oral Sci* 2009;5:293-6.
73. Wali A. FHIT: Doubts are Clear Now. *Scientific World Journal* 2010; 10: 1142–51.
74. Wang Y, Suh Y, Fuller MY, Jackson JG, Xiong S, *et al.* Restoring expression of wild-type p53 suppresses tumor growth but does not cause tumor regression in mice with a p53 missense mutation. *J Clin Invest* 2011; 893-904.
75. Williams MD, Hanna EY, El-Naggar AK. Anaplastic ameloblastic fibrosarcoma arising from recurrent ameloblastic fibroma: restricted molecular abnormalities of certain genes to the malignant transformation. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007;104:72-5.
76. Yeudall WA, Jakus J. Cyclin kinase inhibitors add a new dimension to cell cycle control. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995; 291-8.
77. Zouhary KJ, Said-Al-Naief N, Waite PD. Ameloblastic fibro-odontoma: expansile mixed radiolucent lesion in the posterior maxilla: a case report. *J Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008,106:15-21.

8. ANEXO

8.1 Aprovação do comitê de ética e pesquisa (COEP)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0403.0.203.000-11

Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia
Odontológica
Faculdade de Odontologia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 04 de outubro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Perda da heterozigossidade em tumores odontogênicos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

8.2 Artigos publicados

Diniz MG, **Galvão CF**, Macedo PS, Gomes CC, Gomez RS. *Evidence of loss of heterozygosity of the PTCH gene in orthokeratinized odontogenic cyst*. J Oral Pathol Med. 2011 Mar;40(3):277-80.

Resende RG, Correia-Silva Jde F, **Galvão CF**, Gomes CC, Carneiro MA, Gomez RS. *Oral leukoplakia in a patient with Fanconi anemia: recurrence or a new primary lesion?* J Oral Maxillofac Surg. 2011 Jul;69(7):1940-3. Epub 2011 May 6. No abstract available

8.3 Artigos aceitos para publicação

Galvão CF, Gomes CC, Diniz MG, Vargas PA, de Paula AM, Mosqueda-Taylor A, Loyola AM, Gomez RS. Loss of heterozygosity (LOH) in tumour suppressor genes in benign and malignant mixed odontogenic tumours. J Oral Pathol Med. 2011 Nov 15. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01115.x.

Farias LC, Gomes CC, Brito JAR, **Galvão CF**, Diniz MG, Castro WH, Bernardes VF, Marco LA, Gomez RS. *Loss Of Heterozygosity Of The Ptch Gene In Ameloblastoma*. Human Pathology, 2011; doi.org/10.1016/j.humpath.2011.08.026.

8.4 Resumos publicados em anais de congresso

Gomes C, **Galvão C**, Diniz M, De Marco L, Macedo P, Vargas P, Taylor A, Gomez R. *Loss of heterozygosity in ameloblastic odontogenic tumors* [abstract]. In: Proceedings of the 102nd Annual Meeting of the American Association for Cancer Research; 2011 Apr 2-6; Orlando, Florida. Philadelphia (PA): AACR; 2011. Abstract nr 2204.

Gomes CC, Resende RG, Correia-Silva JF, **Galvão CF**, Gomez RS. *Leucoplasia oral em paciente com anemia de fanconi. Recorrência ou segunda lesão primária?*. Int J Dent, 10(Supl 2): 25-163 XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, 2011 <http://www.ufpe.br/ijd> ISSN1806-146X.

Galvão CF, Gomes CC, Vargas PA, Mosqueda-Taylor A, Gomez RS. *Perda de heterozigoidade em regiões supressoras de tumor em tumores odontogênicos mistos*. Int J Dent, 10(Supl 2): 25-163 XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, 2011 <http://www.ufpe.br/ijd> ISSN1806-146X.

Silva TF, **Galvão CF**, Gomez RS, Gomes CC. *Estudo da perda de heterozigoidade de genes supressores de tumor em leucoplasias bucais*. Int J Dent, 10(Supl 2): 25-163 XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, 2011 <http://www.ufpe.br/ijd> ISSN1806-146X

8.5 Ata da defesa



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE MESTRADO DE CLARICE FERREIRA GALVÃO, nº de registro 2010666474. No dia **vinte e quatro de fevereiro de dois mil e doze**, reuniu-se na Faculdade de Odontologia da UFMG, a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ESTUDO DA PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DE GENES SUPRESSORES DE TUMOR EM TUMORES ODONTOGÊNICOS MISTOS”**, requisito final para a obtenção do Grau de Mestre em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Prof.^a Carolina Cavalieri Gomes, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof. ^a Carolina Cavalieri Gomes/ orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovada</u>
Prof. ^a Vanessa de Fátima Bernardes/co-orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Adriano Mota Loyola	Instituição: UFU	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Fabrício Rezende do Amaral	Instituição: UFSM	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 24 de fevereiro de 2012.

Prof.^a Carolina Cavalieri Gomes/ orientadora _____

Prof.^a Vanessa de Fátima Bernardes/co-orientadora _____

Prof. Adriano Mota Loyola _____

Prof. Fabrício Rezende do Amaral _____

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador _____

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador.

Em tempo: Onde se lê: Prof. Fabrício Rezende do Amaral - Instituição UFSM
Leia-se: Prof. Fabrício Rezende do Amaral - Instituição FEAD

Prof. Luiz Armando Cunha de Marco
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em
Medicina Molecular - Faculdade de Medicina UFMG

9. APÊNDICE

doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01115.x

J Oral Pathol Med
© 2011 John Wiley & Sons AS. All rights reserved
wileyonlinelibrary.com/journal/jop

Loss of heterozygosity (LOH) in tumour suppressor genes in benign and malignant mixed odontogenic tumours

Clarice F. Galvão¹, Carolina C. Gomes², Marina G. Diniz¹, Pablo A. Vargas³, Alfredo M. B. de Paula⁴, Adalberto Mosqueda-Taylor⁵, Adriano M. Loyola⁶, Ricardo S. Gomez¹

¹Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ²Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil; ³Department of Oral Diagnosis, Oral Pathology Section, Piracicaba Dental School, Universidade de Campinas, São Paulo, Brazil; ⁴Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Minas Gerais, Brazil; ⁵Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, Mexico City, Mexico; ⁶Department of Oral Pathology, Dental School, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, Brazil

Although molecular alterations are reported in different types of odontogenic tumours, the pathogenesis remains to be established. Loss of heterozygosity (LOH) studies allow the identification of minimal regions of deletions of known or putative tumour suppressor genes, the losses of which may promote neoplastic growth. The purpose of this study was to investigate LOH in a set of odontogenic mixed tumours. Tumour suppressor gene loci on 3p, 9p, 11p, 11q and 17p chromosomes were analysed in five samples of ameloblastic fibroma (AF), three samples of ameloblastic fibro-odontoma (AFO) and three samples of ameloblastic fibrosarcoma (AFS). The most frequently lost genetic loci were p53 (17p13, 62%) and CHRN1 (17p13, 55%). LOH at the chromosome regions 3p24.3, 9p21 and 9p22 was identified only in AFS. No sample showed LOH at the chromosomal loci 3p21.2 and 11q13.4. For the region 9p22-p13, LOH occurred in one sample of AFO. The fractional allelic loss (FAL) was calculated for each sample. The mean FAL of the benign lesions (i.e. AF and AFO) was 22%, whereas the mean FAL of the malignant lesions (i.e. AFS) was 74.6%. In conclusion, our results show a higher FAL of AFS compared to its benign counterparts and reveal a different pattern of LOH of tumour suppressor genes in AFS, which may regulate changes in tumour behaviour.

J Oral Pathol Med (2011)

Keywords: ameloblastic fibroma; ameloblastic fibro-odontoma; ameloblastic fibrosarcoma; loss of heterozygosity; mixed odontogenic tumours; tumour suppressor genes

Introduction

The odontogenic tumours form a heterogeneous group of neoplasms, which originate from mesenchymal, ectomesenchymal and/or epithelial tissue to form the dental elements (1–3). This group of tumours include ameloblastic fibroma (AF), ameloblastic fibro-odontoma (AFO) and ameloblastic fibrosarcoma (AFS). The AF and AFO are rare lesions containing odontogenic ectomesenchymal and epithelial tissue and usually affect children and young adults. About 80% of these lesions occur in the posterior region of the jaw and may be associated with an unerupted tooth (4). According to the WHO 2005, AF is defined as a “neoplasm composed of proliferating odontogenic epithelium embedded in a cellular ectomesenchymal tissue that resembles the dental papilla” (5). It has been regarded as a true benign tumour, in which the epithelial and the ectomesenchymal elements are neoplastic (3, 6).

Ameloblastic fibro-odontoma is a lesion that is similar to AF but shows inductive changes that lead to the formation of dentine and enamel (3). This lesion is far less common than AF and may simulate a developing odontoma (7, 8). The differential diagnosis of AF and AFO tumours with a developing odontoma is based on clinical findings (8).

The malignant counterpart of AF is AFS, which is a rare lesion that presents locally aggressive and infiltrative behaviour. The ectomesenchymal component of AFS is malignant, whereas the epithelial component is benign (9, 10). Pain, swelling and rapid growth are common complaints of patients with AFS (11).

Several studies have reported molecular alterations in odontogenic tumours (12–15). However, loss of heterozygosity (LOH) in tumour suppressor genes has been seldom explored in these lesions. The alteration of a functional allele in a tumour suppressor gene may result in tumorigenesis (16–18). LOH studies allow the iden-

Correspondence: Ricardo S. Gomez, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, CEP 31270 901, Brazil. Tel: +55 31 34092477, Fax: +55 31 34092430, E-mail: rsgomez@ufmg.br
Accepted for publication October 14, 2011

	J O P	1 1 1 5	B	Dispatch 1111	Journal JOP	© 2011 JOP
	Journal Name	Manuscript No.		Author Received	No. of pages: 5	Printed in India

tification of minimal regions of deletions of known or putative tumour suppressor genes. The loss of these genes may promote neoplastic growth (19).

In the current study, we evaluated LOH in five samples of AF, three samples of AFO and three samples of AFS using markers for the chromosome regions 3p, 9p, 11p, 11q and 17p, which contain important tumour suppressor genes that are altered in several types of cancer (20–24). Our results suggest that LOH can be a useful tool to help determine the diagnosis and prognosis of the aforementioned lesions.

Material and methods

Human tissue

Five AF, three AFO and three AFS paraffin-embedded tissue samples were obtained from the files of the several Oral Pathology Services: *Universidade Federal de Minas Gerais* (Brazil), *Universidade de Campinas* (Brazil) and *Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco* (Mexico). These cases were selected from a total of 2192 odontogenic tumours, comprising 15 AF (corresponding to 0.68%), 13 AFO (0.59%) and three AFS (0.13%). For the diagnosis, haematoxylin- and eosin-stained sections were examined by three oral pathologists according to previously described criteria (5). Only tumours with normal and pathological tissues were selected. The main clinical characteristics of all lesions

Table 1 Clinical data and fractional allelic losses observed in the patients that were included in the study

Samples	Histopathological diagnosis	Age (years)	Gender	Site	FAL (%)
1	AF	9	M	Posterior mandible	0
2	AF	12	M	Posterior mandible	16
3	AF	7	F	Posterior mandible	0
4	AF	14	F	Posterior mandible	50
5	AF	7	F	Posterior mandible	0
6	AFO	11	M	Posterior mandible	33
7	AFO	8	M	Posterior mandible	40
8	AFO	9	F	Posterior mandible	37
9	AFS	24	F	Posterior mandible	75
10	AFS	25	M	Posterior mandible	83
11	AFS	24	M	Posterior mandible	66

AF, ameloblastic fibroma; AFO, ameloblastic fibro-odontoma; AFS, ameloblastic fibrosarcoma; M, male; F, female.

are shown in Table 1. Normal tissue was separated from the neoplastic counterpart using microdissection. Tissue was microdissected from a series of 20- μ m-thick paraffin-embedded sections under direct visualisation using a stereoscopic microscope. The study was approved by the local Ethics Committee.

DNA extraction and amplification

Microdissected tissue was digested with proteinase K, and genomic DNA was extracted using the DNeasy Blood and Tissue Kit following the manufacturer's recommendations (Qiagen, Hilden, Germany). To evaluate the allelic loss, a panel of nine polymorphic microsatellite markers for multiple genetic loci in regions of tumour suppressor genes was selected for PCR (Table 2). Fluorescently labelled primers were used to yield PCR products varying from 116 to 211 base pairs. PCR was performed for tumour and normal tissues under the same conditions using a 15- μ l reaction mixtures containing 0.3 μ M of each primer, 500 ng/ μ l of extracted DNA, 0.25 μ M of deoxynucleoside triphosphate, 2.5 mM magnesium chloride, 1.5 μ l (1 \times) of commercial PCR buffer and 1 unit of AmpliTaq Gold polymerase (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). The PCR conditions were as follows: after an initial 10-min denaturation step (10 s at 96°C), we performed the annealing (30 s at 57–60°C, depending on the primers), and elongation (1 or 2 min at 70°C, depending on the primers) steps followed by a final step at 70°C for 30 min.

Loss of heterozygosity analysis

The amplified PCR products were run in an 8% polyacrylamide gel and were analysed using capillary electrophoresis, and the data were analysed using the Genescan software version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). LOH was calculated as the ratio between the short allele normal (Sn)/long allele normal (Ln) and short allele tumour (St)/long allele tumour (Lt) in the following formula: (Sn:Ln)/(St:Lt). LOH was scored when one allele (peak) was decreased by more than 50% in the tumour sample compared to the same allele in normal tissue followed by DNA stutter correction when necessary (score <0.5 or >2) (25) (Fig. 1A). Samples that amplified both alleles in tumour and

Table 2 Involved microsatellite markers, chromosomal locations, tumour suppressor genes and the overall frequency of allelic loss for each marker included in the study

Biomarker	Locus	Type of repetition	PCR product size (bp)	Gene involved	FAL (%)
D3S1029	3p21.2	Di (CA)	168	SACM1L	0/6 (0)
D3S1293	3p24.3	Di (CA)	116–144	RAR β	2/9 (22)
D9S157	9p22	Di (CA)	133–149	SHBGL2	2/8 (25)
D9S162	9p22–p13	Di (CA)	172–196	SLC24A2	1/2 (50)
D9S171	9p22–p21	Di (CA)	158–177	BDMF/P16	2/4 (50)
D11S1369	11q13.4	Tetra (GATA)	180	MEN 1	0/3 (0)
D11S1883	11p15.5	Di (CA)	195–211	NUP98	2/6 (33)
CHRN1	17p13.1	Di (CA)	160	CHRN1	5/9 (55)
TP53	17p13.1	Di (CA)	149	P53	5/8 (62)

Di, Dinucleotide; Tetra, Tetranucleotide; bp, base pairs.

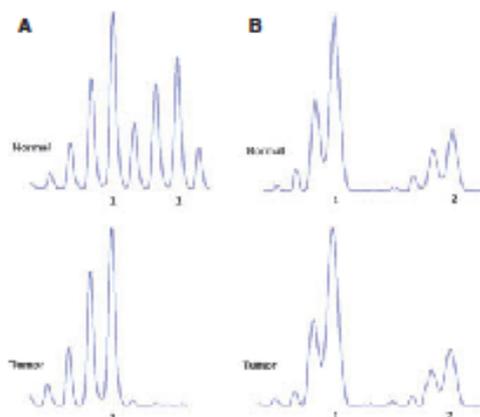


Figure 1 Representative example of microsatellite analysis showing loss of heterozygosity (LOH) assay in 17p13. (A) DNA of tumour cells of sample no. 4 showed loss of the minor allele for the marker p53 compared to DNA of normal cells. (B) Sample no. 3 was heterozygous for the marker p53 as indicated by the presence of two alleles and the absence of LOH. 1, larger allele; 2, minor allele.

normal DNA and presented a ratio between 0.5 and 2.0 were considered heterozygous (Fig. 1B). The sample was considered non-informative (NI) when the control DNA for normal tissue was homozygous for the polymorphic markers (i.e. showing only one allele in the normal control tissue). Unclear results were also considered non-informative (NI).

The fraction of allelic loss (FAL) was calculated for each sample and for each marker by dividing the number of loci that showed allelic loss by the number of loci that were informative (26). Three samples of paraffin-embedded samples of oral squamous cell carcinoma were used as positive controls for LOH in the regions analysed because they are known to harbour high LOH rates (16, 22, 23). In two AF tumour cases, in addition to paraffin-embedded DNA, DNA from fresh tissue was also amplified to exclude bias of paraffin-embedded DNA.

Results

The results regarding LOH and FAL in AF, AFO and AFS are displayed in Table 1, and a comprehensive analysis of LOH is shown in Fig. 2. The average number of informative loci per case was 5.0 (range 0–8). In two samples, matched paraffin-embedded and frozen samples from the same tumour were analysed and exhibited the same LOH pattern. The average FAL in the tumours was 36.3%, and the specific rates for each gene locus are shown in Table 1. The most frequently lost genetic loci were p53 (17p13, 62%) and CHRN1 (17p13, 55%). None of the tumours in the analysis presented LOH at the markers D11S1369 (11q 13.4) and D3S1029 (3p21.2).

A distinct pattern of LOH was observed in AFO compared to that in AF. FAL average in AF was 13.2%, whereas FAL average in AFO was 36.6%. LOH

Samples	Microsatellite loci								
	D11S1369	D3S1029	D5S345	D17S1325	D17S1325	D17S1325	D17S1325	D17S1325	D17S1325
1 AF	○	-	○	○	○	○	○	○	○
2 AF	●	○	○	○	○	○	○	○	○
3 AF	○	-	○	○	○	○	○	○	○
4 AF	○	-	○	○	○	○	○	○	○
5 AF	○	○	○	○	○	○	○	○	○
6 AFO	○	○	○	●	●	○	○	○	○
7 AFO	●	○	○	○	○	○	○	○	○
8 AFO	●	○	○	-	●	○	○	○	○
9 AFS	●	●	○	○	○	○	○	○	-
10 AFS	●	○	○	○	○	○	○	○	○
11 AFS	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Legend: ○ Non-informative (homozygous/unsuitable to analyze)
○ Heterozygous
● LOH

Figure 2 Loss of heterozygosity analysis of nine microsatellite markers in ameloblastic fibroma (AF), ameloblastic fibro-odontoma (AFO) and ameloblastic fibrosarcoma (AFS).

was observed in at least two markers in all of the three samples of AFO. However, only two samples of AF exhibited LOH in only one marker. In addition, one sample of AFO displayed LOH at 9p22–p13.

The overall mean FAL of the benign lesions (i.e. AF and AFO) was 22%, whereas the mean FAL of the malignant lesions (AFS) was 74.6%. LOH on the short arm of chromosomes 3 and 9 at the loci 3p24.3 (D31293), 9p22–p21 (D9S171) and 9p22 (D9S157) was identified only in the group of AFS.

Discussion

Loss of heterozygosity analysis is a useful method to find genetic alterations in tumour and precancerous lesions. The presence of LOH may indicate allelic deletion, duplication or amplification and may promote neoplastic growth (19, 21, 25, 26). LOH is used to evaluate microsatellite regions that are highly polymorphic, easy to analyse and abundant in the genome (27). Studies have suggested that deletions in regions of tumour suppressor genes may be involved in the development of odontogenic tumours via alterations in the cell cycle control (28–31).

In the current study, we evaluated LOH in AF, AFO and AFS, which are rare odontogenic tumours of uncertain pathogenesis with similar histological features. AF and AFO belong to the group of benign odontogenic tumours that are derived from the odontogenic epithelium with odontogenic ectomesenchyme with or without hard tissue formation, whereas AFS is part of the odontogenic sarcomas (3, 5, 11). Although AF and AFO have similar histological features, some authors have questioned whether these lesions represent a developing odontoma (7, 8). According to Gardner (8), some lesions with the histological appearance of AF and AFO are probably true neoplasms, whereas others are developing odontomas (8). The consideration of clinical findings is necessary to distinguish between these

1 lesions. A small lesion that is situated over the occlusal
2 surface of an unerupted molar in a child would probably
3 be diagnosed as a developing odontoma because the site
4 is typical and odontogenesis is still underway. On the
5 other hand, a destructive lesion should be seen as a true
6 neoplasm *a priori* (8). In this study, two AF (samples 1
7 and 2) and two AFO (samples 7 and 8) presented clinical
8 and radiographic features that were compatible with a
9 developing odontoma (Table 1). The molecular profiles
10 of these five tumours with clinical–radiographic features
11 that were compatible with developing odontomas were
12 not distinct from the lesions that showed a neoplastic
13 clinical–radiographic features (cases 4 and 6).

14 The results show a high number of LOH in the AFO
15 cases compared to that in the AF cases (FAL, 36.6% vs.
16 13.2%). Although AFO and AF show histological
17 similarities, these results suggest that AFO and AF
18 may have differences in their tumorigenesis and may
19 present a distinct genetic profile.

20 After analysing all of the three groups of lesions, we
21 observed that the mean FAL was 36.3% and that LOH
22 was found in 3p, 9p, 11p and 17p chromosomal loci.
23 LOH in these regions has been described in other cancer
24 types, including non-small-cell lung cancer, urothelial
25 carcinoma, breast cancer and oral squamous cell carcinoma
26 (16, 32–34). Alterations in 17p, 3p and 9p regions
27 are the most common genetic alterations in head and
28 neck cancers and are associated with tumours with
29 unfavourable prognosis (16, 22, 23). Other molecular
30 alterations such as methylation of the P16 gene, which is
31 located on chromosome 9p, are reported in ameloblas-
32 toms and other odontogenic tumours (13, 35). In this
33 study, LOH on the short arm of chromosomes 3 and 9
34 at the loci 3p24.3 (D31293), 9p22–p21 (D9S171) and
35 9p22 (D9S157) was identified only in the group of AFS.
36 As AFS is considered a malignant counterpart of AF
37 (11, 36), these genetic alterations may be markers of
38 malignant progression to AFS. This attractive hypoth-
39 esis requires further investigation.

40 The average of FAL in AFS (74.6%) was higher
41 compared to that of the benign lesions AF and AFO
42 (13.2% and 36.6%, respectively). Therefore, AFS is
43 associated with an increased number and diversity of
44 compromised tumour suppressor genes. Further studies
45 are necessary to validate the use of these molecular
46 markers in the differential diagnosis of mixed odonto-
47 genic tumours.

48 The most frequently altered gene in human tumours is
49 p53, which plays an important role in response to
50 genomic damage by inducing cell cycle arrest or apo-
51 ptosis (37). Most of the alterations in p53 occur by
52 punctual mutations that are not detectable by LOH
53 analysis (38). Although increased immunohistochemical
54 reactivity for p53 has been detected in ameloblastomas,
55 malignant ameloblastomas, primary intraosseous carci-
56 nomas, AFS and sarcomas, the genetic and epigenetic
57 alterations in p53 are infrequent in ameloblastomas,
58 calcifying cystic odontogenic tumours and adenomatoid
59 odontogenic tumours (30, 31, 39, 40). In this study, only
60 AFS cases showed positive staining in the mesenchymal
61 component of the tumour (data not shown). On the

other hand, after analysing the FAL in each locus, we
observed that the regions CHRN1 and p53, which are
located in chromosome 17p, showed a higher frequency
of allelic loss in all of the investigated groups compared
to other markers. Further studies are necessary to
demonstrate whether these alterations represent a com-
mon genetic pathway for mixed odontogenic tumour
development.

In conclusion, our results show that AF, AFO and
AFS have distinct patterns of LOH in tumour suppres-
sor genes. These findings may be useful in the differential
diagnosis between AF and AFS and in translational
studies regarding the diagnosis of odontogenic tumours.

Conflicts of interest

None declared.

References

1. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO histological typing of odontogenic tumours. A commentary on the second edition. *Cancer* 1992; **70**: 2988–94.
2. Papagerakis P, Peuchmaur M, Hotton D, et al. Aberrant gene expression in epithelial cells of mixed odontogenic tumors. *J Dent Res* 1999; **78**: 20–30.
3. Philipsen HP, Reichart PA, Praetorius F. Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol* 1997; **33**: 86–99.
4. Takeda Y. Ameloblastic fibroma and related lesions: current pathologic concept. *Oral Oncol* 1999; **35**: 535–40.
5. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sindrinsky D. *World Health Organization classification of tumour. Pathology & genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC Press, 2005.
6. Vasconcelos BC, Andrade ES, Rocha NS, Morais HH, Carvalho RW. Treatment of large ameloblastic fibroma: a case report. *J Oral Sci* 2009; **5**: 293–6.
7. Slootweg PJ. An analysis of the interrelationship of the mixed odontogenic tumors–ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and the odontomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; **51**: 266–76.
8. Gardner DG. The mixed odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1984; **58**: 166–8.
9. Muller S, Parker DC, Kapadia SB, Budnick SD, Barnes EL. Ameloblastic fibrosarcoma of the jaws. A clinicopathologic and DNA analysis of five cases and review of the literature with discussion of its relationship to ameloblastic fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; **79**: 469–77.
10. Kousar A, Hosein MM, Ahmed Z, Minhas K. Rapid sarcomatous transformation of an ameloblastic fibroma of the mandible: case report and literature review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; **108**: 80–5.
11. Williams MD, Hanna EY, El-Naggar AK. Anaplastic ameloblastic fibrosarcoma arising from recurrent ameloblastic fibroma: restricted molecular abnormalities of certain genes to the malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; **104**: 72–5.
12. Nodit L, Barnes L, Childers E, Finkelstein S, Swalsky P, Hunt J. Allelic loss of tumor suppressor genes in ameloblastic tumors. *Mod Pathol* 2004; **17**: 1062–7.
13. Moreira PR, Guimaraes MM, Gomes CC, et al. Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol* 2009; **54**: 893–7.

14. Perdigo PF, Gomez RS, Pimenta FJGS, De Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncol* 2004; **40**: 841–6.
15. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2010; **39**: 585–91.
16. Field JK, Kiaris H, Risk JM, et al. Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival. *Br J Cancer* 1995; **72**: 1180–8.
17. Sinha S, Chunder N, Mukherjee N, et al. Frequent deletion and methylation in SH3GL2 and CDKN2A loci are associated with early- and late-onset breast carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2008; **15**: 1070–80.
18. Song Z, Li R, You N, Tao K, Dou K. Loss of heterozygosity of the tumor suppressor gene Tg737 in the side population cells of hepatocellular carcinomas is associated with poor prognosis. *Mol Biol Rep* 2010; **37**: 4091–101.
19. Szukala K, Sowinska A, Wierzbička M, Biczysko W, Szyfter W, Szyfter K. Does loss of heterozygosity in critical genome regions predict a local relapse in patients after laryngectomy? *Mutat Res* 2006; **600**: 67–76.
20. Bremner JF, Braakhuis BJM, Brink A, et al. Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields. *J Oral Pathol Med* 2008; **37**: 599–606.
21. Field JK, Neville EM, Stewart MP, et al. Fractional allele loss data indicate distinct genetic populations in the development of non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* 1996; **74**: 1968–74.
22. Murali A, Sailasree R, Sebastian P, Rejnish Kumar R, Varghese BT, Kannan S. Loss of heterozygosity of D9S162: molecular predictor for treatment response in oral carcinoma. *Oral Oncol* 2011; **17**: 1000–1004 (in press).
23. Graveland AP, Golusinski PJ, Buijze M, et al. Loss of heterozygosity at 9p and p53 immunopositivity in surgical margins predict local relapse in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011; **128**: 1852–9.
24. Ashazila MJ, Kannan TP, Venkatesh RN, Hoh BP. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinoma in Malaysian population. *Oral Oncol* 2011; **47**: 358–64.
25. van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000; **6**: 3803–16.
26. Fowler MH, Fowler J, Ducatman B, Barnes L, Hunt JL. Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes. *Mod Pathol* 2006; **19**: 350–5.
27. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol* 2004; **21**: 991–1007.
28. Carvalhais J, Aguiar M, Araujo V, Araujo N, Gomez R. p53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumours. *Oral Dis* 1999; **5**: 218–22.
29. Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 2006; **35**: 65–74.
30. Batista de Paula AM, da Costa Neto JQ, da Silva GE, Guimaraes Santos FB, Gomez RS. Immunolocalization of the p53 protein in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; **61**: 256–8.
31. Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. *Oral Oncol* 2008; **44**: 50–60.
32. Dillon EK, de Boer WB, Papadimitriou JM, Turbett GR. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in mammary carcinoma and its probable precursors. *Br J Cancer* 1997; **76**: 156–62.
33. Sikdar N, Paul RR, Panda CK, Banerjee SK, Roy B. Loss of heterozygosity at APC and MCC genes of oral cancer and leukoplakia tissues from Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med* 2003; **32**: 450–4.
34. Collin-Chavagnac D, Marçais C, Billon S, et al. Quantitative loss of heterozygosity analysis for urothelial carcinoma detection and prognosis. *Urology* 2010; **76**: 515–7.
35. Abiko Y, Nagayasu H, Takeshima M, et al. Ameloblastic carcinoma ex ameloblastoma: report of a case—possible involvement of CpG island hypermethylation of the p16 gene in malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007; **103**: 72–6.
36. Cohen DM, Bhattacharyya I. Ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma and odontoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am* 2004; **16**: 375–84.
37. Levine AJ, Momand J, Finlay CA. The p53 tumour suppressor gene. *Nature* 1991; **35**: 453–6.
38. Petitjean A, Mathe E, Kato S, et al. Impact of mutant p53 functional properties on TP53 mutation patterns and tumor phenotype: lessons from recent developments in the IARC TP53 database. *Hum Mutat* 2007; **28**: 622–9.
39. Saghaei S, Zare-Mahmoodabadi R, Salehinejad J, Kadeh H, Aghaee-Afzal M. Immunohistochemical analysis of p53 and PCNA expression in calcifying odontogenic cyst. *J Oral Sci* 2010; **52**: 609–13.
40. Kumamoto H, Izutsu T, Ohki K, Takahashi N, Ooya K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14 proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004; **33**: 292–9.

Acknowledgements

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), Brazil. Dr. PA Vargas, AM Loyola and RS Gomez are research fellows of CNPq.