

LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

EVENTOS EPIGENÉTICOS E GENÉTICOS NO  
AMELOBLASTOMA: UM ENFOQUE NA METILAÇÃO E  
TRANSCRIÇÃO DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ E  
PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DO GENE *PTCH*

BELO HORIZONTE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA

2012

LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS

EVENTOS EPIGENÉTICOS E GENÉTICOS NO  
AMELOBLASTOMA: UM ENFOQUE NA METILAÇÃO E  
TRANSCRIÇÃO DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ E  
PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DO GENE *PTCH*

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

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Cavaliéri Gomes

BELO HORIZONTE  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA

2012

F224e Farias, Lucyana Conceição.  
Eventos epigenéticos e genéticos no ameloblastoma: um enfoque na metilação e transcrição de metaloproteínas da matriz e perda de heterozigidade do gene PTCH [manuscrito]. / Lucyana Conceição Farias. - - Belo Horizonte: 2012.  
170f.: il.  
Orientador: Ricardo Santiago Gómez.  
Co-Orientadora: Carolina Cavalieri Gomes.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.  
1. Ameloblastoma. 2. Metaloproteínas da Matriz. 3. Metilação. 4. Perda de Heterozigidade. 5. Transdução de Sinal. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Gómez, Ricardo Santiago. II. Gomes, Carolina Cavalieri. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WU 280



**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](mailto:cpg@medicina.ufmg.br)



UFMG

ATA DA DEFESA DE DOUTORADO DE LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS, nº de registro 2009731322. No dia **Vinte e cinco de Maio de Dois mil e Doze**, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“EVENTOS EPIGENÉTICOS E GENÉTICOS NO AMELOBLASTOMA: UM ENFOQUE NA METILAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ E PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DO GENE PTCH.”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutora em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof.º Ricardo Santiago Gomez, 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.º Ricardo Santiago Gomez / orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof.ª Carolina Cavalieri Gomes / co-orientadora	Instituição UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof.ª Paula Rocha Moreira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>A PROVADA</u>
Prof.ª Vanessa de Fátima Bernardes	Instituição: UFMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Martinho Campolina Rebello Horta	Instituição: PUCMG	Indicação: <u>APROVADA</u>
Prof. Alfredo Mauricio Batista de Paula	Instituição: UNIMONTES	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, 25 de maio de 2012.

Prof.º Ricardo Santiago Gomez / orientador Ricardo Santiago Gomez

Prof.ª Carolina Cavalieri Gomes / co-orientadora Carolina Cavalieri Gomes

Prof.ª Paula Rocha Moreira Paula Rocha Moreira

Prof.ª Vanessa de Fátima Bernardes Vanessa de Fátima Bernardes

Prof. Martinho Campolina Rebello Horta Martinho Campolina Rebello Horta

Prof. Alfredo Mauricio Batista de Paula Alfredo Mauricio Batista de Paula

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador Luiz Armando Cunha De Marco



**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



**UFMG**

## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores: Ricardo Santiago Gomez - orientador UFMG – presidente da banca, Prof.<sup>a</sup> Carolina Cavalieri Gomes co-orientadora UFMG, Prof.<sup>a</sup> Paula Rocha Moreira UFMG, Prof. Martinho Campolina Rebello Horta PUCMG, Prof.<sup>a</sup> Vanessa de Fátima Bernardes UFMG, Prof. Alfredo Mauricio Batista de Paula UNIMONTES (membros titulares), aprovou a defesa Tese de Doutorado de **LUCYANA CONCEIÇÃO FARIAS**. A Tese foi intitulada: **“EVENTOS EPIGENÉTICOS E GENÉTICOS NO AMELOBLASTOMA: UM ENFOQUE NA METILAÇÃO E TRANSCRIÇÃO DE METALOPROTEINASES DA MATRIZ E PERDA DE HETEROZIGOSIDADE DO GENE PTCH.”**, estando à mesma apta à obtenção do título de Doutora em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 25 de maio de 2012.

Prof.<sup>o</sup> Ricardo Santiago Gomez / orientador

Prof.<sup>a</sup> Carolina Cavalieri Gomes / co-orientadora

Prof.<sup>a</sup> Paula Rocha Moreira

Prof.<sup>a</sup> Vanessa de Fátima Bernardes

Prof. Martinho Campolina Rebello Horta

Prof. Alfredo Mauricio Batista de Paula

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

**Reitor**

Clélio Campolina Diniz

**Vice-Reitor**

Rocksane de Carvalho Norton

**Pró-Reitor de Pós-Graduação**

Ricardo Santiago Gomez

**Pró-reitor de Pesquisa**

Renato de Lima Santos

**FACULDADE DE MEDICINA**

**Diretor**

Francisco José Penna

**Vice-Diretor**

Tarcizo Afonso Nunes

**Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular**

Luiz Armando de Marco

**Subcoordenador do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular**

Débora Marques de Miranda

*“Não acrediteis em coisa alguma apenas por ouvir dizer. Não acrediteis na fé das tradições só porque foram transmitidas por longas gerações. Não acrediteis em coisa alguma só porque é dita e repetida por muitos. Não acrediteis em coisa alguma pelo fato de vos mostrarem o testemunho escrito de algum sábio antigo. Não acrediteis em coisa alguma só porque as probabilidades a favorecem ou porque um longo hábito vos leva a tê-la como verdadeira. Não acrediteis no que imaginastes, pensando que um ser superior a revelou. Não acrediteis em coisa alguma com base na autoridade de mestres e sacerdotes. Aquilo, porém que se enquadrar na vossa razão, e depois de minucioso estudo for confirmado pela vossa própria experiência, conduzindo ao vosso próprio bem e ao de todas as outras coisas vivas, a isso aceitai como Verdade. E daí pautai a vossa conduta!”*

*Sidarta Gautama*

*“Essa longa história da vida que aos poucos se vai erguendo em escala ascensional é, precisamente, a história da criação do mundo dos viventes. É a ação de Deus que tudo planeja e concebe, dirige e sustenta”.*

*Fr. Von Huene*

A Deus, que tudo concebe, sustenta e renova.

À minha família, pelo seu amor incondicional, doação e  
apoio.

Ao meu noivo Sandro, pelo o amor e carinho em todos  
os momentos.

A todos os amigos que me deram força e apoio nessa fase tão importante de minha  
formação.

Dedico a vocês essa conquista!



## AGRADECIMENTOS

Foram tantas as contribuições e empenho de amigos envolvidos nesse trabalho, que é com grande alegria, que venho agradecer especialmente a cada uma deles.

A DEUS que me concedeu a possibilidade de realizar esse sonho, dando-me sabedoria, discernimento e persistência. Agradeço por ter guiado os meus caminhos e ter colocado em minha vida pessoas que me deram tanto apoio nessa jornada.

Aos meus pais, LUCY e EDUARDO (*in memoriam*), pelo amor, ensinamentos e dedicação. Agradecer é pouco pela vida que vocês me deram!

Aos meus irmãos DENYSE, PATRÍCIA E ROBIM por terem compartilhado os meus sonhos.

Aos meus sobrinhos, por compartilharem comigo todas as minhas alegrias e vibrarem com minhas conquistas profissionais.

Ao meu noivo SANDRO, pelo amor, apoio e por ter me esperado diante de tantas ausências. Suas palavras de confiança foram um apoio que tive diante de tantos obstáculos e tanta saudade.

Ao meu orientador, Prof. RICARDO SANTIAGO GOMEZ, pela confiança e por todo o aprendizado adquirido nessa jornada do doutorado. Agradeço por ouvir minhas idéias e por me dar a liberdade de tê-las como projeto. Você foi fundamental para o meu crescimento profissional. Você nos mostrou, a cada dia de convivência, o que é ser um pesquisador, o quanto esse caminho é grandioso! Muito obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Prof. ANDRÉ LUIZ SENA GUIMARÃES, agradeço por tudo que me ensinou e pelo apoio constante, mesmo após a minha conclusão do mestrado. Agradeço por ter me incentivado no doutorado e por me conceder novos caminhos para prosseguir meus estudos.

Ao Prof. ALFREDO MAURÍCIO BATISTA DE PAULA, por ter me incentivado desde a graduação, a seguir pelos caminhos da ciência. Você foi fundamental para a minha formação acadêmica.

À Prof.<sup>a</sup>. CAROLINA CAVALIÉRI GOMES, pelos vários ensinamentos que aprendi com você; por me ensinar a simplificar as idéias, especialmente quando devem ser colocadas no papel.

À colega e amiga KELMA, pelo carinho, pelas conversas, pelo apoio e amizade sincera. Você não imagina o quanto foi grandiosa a sua amizade!

Às amigas GENARA, LOURDINHA e SIMONE. Agradeço a vocês pela amizade, atenção e carinho durante esse período em que moramos em Belo Horizonte.

A todos os amigos do laboratório, ANA CAROLINA, KELMA, JOÃO, THIAGO, GEFTER, SILVINHA, FABRÍCIO, VANESSA, JEANE, RENATA, MARINA, CLARICE, ELIZETE, CLÁUDIA, FLORENÇA, TELMINHA, PAULA, FABRÍCIO AMARAL, MARCELA, NAYARA, ALESSANDRA, NATÁLIA, LÉO, DANI, LISSUR. Agradeço a todos pelo apoio, amizade e pelos momentos compartilhados. Guardarei vocês na minha memória e no meu coração!

À INÊS, funcionária do Laboratório de Patologia, pela disponibilidade constante para me auxiliar na busca de arquivos do laboratório.

Aos PROFESSORES DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR, pelos conhecimentos e empenho constante para o crescimento da pós-graduação.

À EQUIPE DE CIRURGIA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA-UFMG e do HOSPITAL MUNICIPAL ODILON BEHRENS, agradeço pela contribuição na fase de coleta de dados e amostras.

AO CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO pela concessão de bolsa de estudo.

À UNIMONTES, instituição em que me graduei como odontóloga e me pós-graduei em Ciências da Saúde, agradeço pela minha formação como profissional e como pessoa, sempre seguindo os preceitos da Ética e de respeito ao próximo.

À UFMG, agradeço por ter me propiciado uma formação tão valiosa e por ter me acolhido nessa jornada.

Ao Prof. RICARDO COLETTA E SUA EQUIPE, por terem me recebido em seu laboratório e me propiciado tanto aprendizado na fase final do curso.

À Prof<sup>a</sup>. LUCIANA ANDRADE, por ter me propiciado conhecer o fundamento da cultura de células.

Aos PROFESSORES AVALIADORES DA DEFESA DE TESE E EXAME DE QUALIFICAÇÃO, Dr. ALFREDO MAURÍCIO, Dr. MARTINHO CAMPOLINA, Dr<sup>a</sup>. PAULA ROCHA, Dr<sup>a</sup>. VANESSA BERNARDES, Dr. FABRÍCIO REZENDE, Dr. ADRIANO LOYOLA, Dr. LUCIANO MARQUES. Agradeço pelas sugestões para o enriquecimento da pesquisa.

Aos INDIVÍDUOS DE ESTUDO que doaram um pouco de sua história de vida como fonte de pesquisa. Meu sincero agradecimento!

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico benigno que apresenta comportamento agressivo e elevadas taxas de recorrência. Estudos foram realizados visando elucidar os mecanismos moleculares e alterações genéticas envolvidas na patogênese do tumor. Expressão aumentada de metaloproteinases da matriz (MMPs) foi identificada no ameloblastoma. Alterações na via de sinalização *Hedgehog*, incluindo mutações no gene *PTCH*, também foram associadas à patogênese de alguns tumores odontogênicos. O presente estudo teve como foco duas abordagens de pesquisa: a metilação de MMPs e a perda de heterozigidade (LOH) no *locus* cromossômico do gene *PTCH* no ameloblastoma. Na primeira proposta de pesquisa, foram investigadas a metilação dos genes *MMP-2* e *MMP-9*, juntamente com os níveis de transcrição de tais genes e a expressão da proteína no tumor odontogênico em questão. Para verificar o padrão de metilação, foi realizada PCR-MSP e análise de metilação baseada em sítios de restrição em 12 amostras de ameloblastoma, 12 folículos pericoronários e 12 fragmentos de gengiva saudável, incluídos como grupo controle. Além disso, foram investigados os níveis de transcrição dos genes através de PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR), e pela técnica de zimografia, analisou-se a expressão proteica das MMPs. Ameloblastomas e folículos pericoronários apresentaram maior frequência de *MMP-2* e *MMP-9* não-metilados, ao passo que as amostras de gengiva apresentaram uma acentuada prevalência das MMPs metiladas. Os folículos revelaram uma expressão aumentada significativa de mRNA *MMP-2*, em relação ao ameloblastoma e gengiva. No entanto, maiores níveis de expressão de *MMP-9* foram identificados no ameloblastoma, comparado aos demais grupos. Todas as amostras do tumor apresentaram expressão das proteínas *MMP-2* e *MMP-9*. Assim, a análise dos resultados sugere que a expressão de *MMP-9* no ameloblastoma seja, possivelmente, associada ao perfil não-metilado do gene.

Para a outra proposta de estudo, foi investigada a LOH no *locus* cromossômico do gene *PTCH* em 12 amostras de ameloblastomas. Para tal análise, foram avaliados três marcadores microssatélite (D9S252, D9S127 e D9S287) e três regiões de polimorfismos de nucleotídeos únicos (SNPs) (rs112794371, rs111446700 e rs357564), sendo todos os SNPs localizados em posição intragênica do *PTCH*. Além disso, os níveis de transcrição de *GLI-1* e *GLI-2* foram avaliados por qRT-PCR em 8 amostras de ameloblastomas e, concomitantemente, a expressão da proteína *PTCH* foi investigada por imunohistoquímica. LOH na região 9q21.33-9q.31 foi verificada em 4/10 (40,0%) dos casos informativos do tumor. Todas as 8 amostras analisadas expressaram o transcrito *GLI-1* e, em 7 casos, o *GLI-2*. A LOH no *locus* do gene *PTCH* não mostrou associação com os níveis de transcrição de *GLI-1*, *GLI-2* ou mesmo com a expressão da proteína *PTCH*.

Considerando todos os resultados das abordagens estudadas, os achados pontuam para uma expressão aumentada de *MMP-9* no ameloblastoma, possivelmente modulada pelo perfil de metilação. Além disso, a identificação de LOH na região do *PTCH* sugere que tal evento pode ser

relevante na patogênese do tumor, tendo como alvo outros genes supressores de tumor localizados no mesmo *locus* do *PTCH*. Estes resultados podem ser novos caminhos que necessitam ser mais explorados para o entendimento da patogênese do ameloblastoma.

**Palavras-chave:** Ameloblastoma, tumor odontogênico, metaloproteinase, *MMP-2*, *MMP-9*, metilação, epigenética, perda de heterozigosidade, *PTCH*, *GLI-1*, *GLI-2*, sinalização Sonic Hedgehog.

## ABSTRACT

Ameloblastoma is a benign odontogenic neoplasm with an aggressive behavior and high recurrence rates. Some studies have been performed to elucidated molecular mechanisms and genetic alterations evolving tumor pathogenesis. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs) is reported in ameloblastomas. Alterations in the Hedgehog signalling pathway, including *PTCH* gene mutations, also have been associated with the pathogenesis of some odontogenic tumours. In the present study, we focalizes two purposes of search related to methylation of matrix metalloproteinasis and heterozygosity loss (LOH) in the chromosome locus of *PTCH* gene. In the first, we hypothesized that epigenetic alterations may regulate *MMP* expression in ameloblastomas. Therefore, we investigated the *MMP-2* and *MMP-9* genes methylation status together with mRNA transcription and protein expression in ameloblastoma. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP-PCR) and methylation analysis by restriction enzyme was performed to evaluate methylation profile of *MMP-2* and *MMP-9* genes in 12 ameloblastoma samples, 12 dental follicles and 12 healthy gingiva fragments, included as controls. Furthermore, we investigated the transcription levels of the genes by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). Zymography was performed to verify protein expression. Ameloblastoma and dental follicle showed a high frequency of unmethylated *MMP-2* and *MMP-9*, whereas healthy gingival samples presented a sharp prevalence of methylated MMPs. Dental follicles showed a significantly higher *MMP-2* mRNA expression than ameloblastomas and healthy gingiva. However, higher expression levels of *MMP-9* were found in ameloblastomas than in dental follicles and healthy gingiva. All ameloblastomas showed positive expression of *MMP-2* and *MMP-9* proteins.

To other purpose of study, we assess LOH at the *PTCH* locus in ameloblastoma. Twelve ameloblastomas were included and LOH was assessed by using 3 microsatellite markers D9S252, D9S127, and D9S287, and 3 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) rs112794371, rs111446700, rs357564 all located at the *PTCH* gene locus. Furthermore, we investigated *GLI1* and *GLI2* transcription levels by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) in 8 ameloblastomas and concomitantly, *PTCH* protein levels by immunohistochemical analysis. LOH at 9q21.33-9q.31 was detected in 4/10 (40.0%) informative cases of ameloblastoma. All 8 analyzed samples expressed *GLI1* mRNA and seven cases *GLI2* mRNA. Interestingly, LOH at the *PTCH* locus was not correlated with *GLI1* or *GLI2* transcription levels, nor was there any correlation with *PTCH* protein expression.

Considering all results, our findings point to an increased expression of *MMP-9* in ameloblastoma, possibly modulated by methylation of the gene. Furthermore, we suggested that LOH in the *PTCH* region may be relevant to the pathogenesis of ameloblastoma, but may target a different gene than *PTCH*. All together, these can be new insights that need to be more explored to understand pathogenesis of ameloblastoma.

**Keywords:** Ameloblastoma, odontogenic tumours, metalloproteinase, *MMP-2*, *MMP-9*, methylation, epigenetic, loss of heterozygosity; *PTCH*; *GLI1*; *GLI2*; Sonic Hedgehog pathway.

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µl	Microlitro
µm	Micrômetro
AMBN	Do Inglês: “ <i>ameloblastin gene</i> ”
Bcl-2	Do Inglês: “ <i>B-cell lymphoma 2 gene</i> ”
BMP	Do Inglês: “ <i>bone morphogenetic protein</i> ”
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio
cDNA	DNA complementar
CT	Do Inglês: “ <i>Threshold cycle</i> ”
CpG	Dinucleotídeo citosina-guanina
DHH	Do Inglês: “ <i>Desert Hedgehog</i> ”.
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNMT	DNA-metiltransferase
DNMT1	DNA-metiltransferase-1
DNMT3B	DNA-metiltransferase-3B
DNTP	Desorribonucleotídeo trifosfatado
DTT	Dithiothreitol
F	Forward
GLI	Do Inglês: “ <i>Glioma-associated oncogene</i> ”
HE	Hematoxilina e eosina
HH	Do Inglês: “ <i>Hedgehog</i> ”.
	Terminologia utilizada para a via de sinalização <i>Hedgehog</i> .
IHH	Do Inglês: “ <i>Indian Hedgehog</i> ”
Ki67	Do Inglês: “ <i>Proliferation-related Ki67 antigen</i> ”
LOH	Do Inglês: “ <i>Loss of heterozygosity</i> ”.
	Designação da alteração genética Perda de Heterozigosidade.
MDM2	Do Inglês: “ <i>Murine double minute clone 2 oncoprotein</i> ”
MeCP	Proteína de ligação metil-CpG



miRNA	microRNA
MMP	Metaloproteinase da matriz
Min	Minuto
NaCl	Cloreto de sódio
NCBI	Centro Nacional de Informação de Biotecnologia Do Inglês: “ <i>National Center for Biotechnology Information</i> ”
Ng	Nanograma
Pb	Pares de bases
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PTCH	Do Inglês: “ <i>Human homolog of Drosophila patched gene</i> ”
PTEN	Do Inglês: “ <i>Phosphatase and tensin homolog gene</i> ”
R	Reverse
RANKL	Do Inglês: “ <i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand</i> ”
RNA	Ácido ribonucléico
SAH	S-adenosil-metionina
SAM	S-adenosil-hemocisteína
SDS	Do Inglês: “ <i>Sodium dodecyl sulfate</i> ”
SHH	Do Inglês: “ <i>Sonic Hedgehog</i> ”
siRNA	RNA de interferência Do Inglês: “ <i>Small interfering RNA</i> ”
Smo	Do Inglês: “ <i>Smoothed gene</i> ”
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TIMP	Inibidor tecidual de metaloproteinase
TNF- $\alpha$	Do Inglês: “ <i>Tumor necrosis factor-alpha</i> ”
TP53	Do Inglês: “ <i>Tumor protein p53</i> ”
Tris-HCl	Tris-hidrocloreto
Wnt	Do Inglês: “ <i>Wingless-type MMTV integration site family</i> ”

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspecto clínico, radiográfico e histopatológico de um caso de ameloblastoma sólido.....	27
Figura 2	Composição molecular e classificação estrutural das MMPs de acordo com a disposição dos domínios.....	34
Figura 3	Ativação proteolítica e alostérica de MMPs.....	37
Figura 4	Metilação da citosina.....	45
Figura 5	Mecanismo de inibição da transcrição gênica através da metilação do DNA.....	46
Figura 6	Estrutura da cromatina ativa e inativa na região promotora do gene.....	47
Figura 7	Esquema da metilação de manutenção.....	48
Figura 8	Esquema da metilação <i>de novo</i> .....	48
Figura 9	Padrão de metilação aberrante do DNA no câncer humano..	51
Figura 10	Modificação lipídica e secreção da proteína Hedgehog.....	63
Figura 11	Mecanismo de sinalização da via Hedgehog.....	65
Figura 12	Representação da microdissecção manual em um corte histológico de ameloblastoma.....	76
Figura 13	Representação esquemática de ilha CpG e dinucleotídeos CG nos genes <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i> , respectivamente.....	80

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Dados clínico-patológicos dos indivíduos portadores de ameloblastoma incluídos no estudo.....	73
----------	---	----

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	21
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	24
2.1.1 Ameloblastoma.....	24
2.1.1 Aspectos Gerais .....	24
2.1.2 Patogênese do ameloblastoma .....	28
2.2 Metaloproteinases da matriz .....	33
2.2.1 Metaloproteinases da matriz na patogênese do ameloblastoma.....	40
2.3 Metilação do DNA .....	44
2.3.1 Metilação do DNA na patogêneses do ameloblastoma .....	52
2.4 Perda de Heterozigosidade.....	54
2.4.1 Perda de Heterozigosidade no ameloblastoma e outros tumores odontogênicos.....	56
2.5 Via de sinalização Hedgehog.....	59
2.5.1 Via de sinalização Hedgehog no ameloblastoma e outros tumores odontogênicos.....	68
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	71
3.1 Objetivo geral .....	71
3.2 Objetivos específicos .....	71
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	72
4.1 Considerações éticas .....	72
4.2 Desenho do estudo .....	72
4.3 Procedimentos experimentais .....	75
4.3.1 Extração de DNA.....	75
4.3.2 Extração de proteína .....	76
4.3.3 Extração de RNA.....	77
4.3.4 Análise da metilação dos genes <i>MMP-2</i> e <i>MMP-9</i> .....	77

4.3.5 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para os genes <i>MMP-2</i> , <i>MMP-9</i> , <i>GLI-1</i> e <i>GLI-2</i> .....	80
4.3.6 Zimografia .....	84
4.3.7 Análise da perda de heterozigosidade no <i>locus</i> do gene <i>PTCH</i> .....	85
4.3.8 Imuno-histoquímica para a proteína PTCH .....	87
4.3.9 Análise estatística .....	88
<b>5 ARTIGO I:</b> “Epigenetic regulation of matrix metalloproteinerinase in ameloblastoma” .....	89
<b>6 ARTIGO II:</b> “Loss of heterozygosity of the <i>PTCH</i> gene in ameloblastoma” .....	108
<b>7 CONCLUSÕES</b> .....	127
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	128
<b>ANEXOS</b> .....	148
ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG.....	148
ANEXO II - Ilustração representativa da localização dos marcadores microsatélites no braço longo do cromossomo 9 .....	149
ANEXO III - Normas de publicação do periódico “Tumor Biology - ISSN: 1010-4283” .....	150
ANEXO IV - Normas de publicação do periódico “Human Pathology Journal - ISSN 0046-8177” .....	154
<b>APÊNDICES</b> .....	157
APÊNDICE I.A - Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos portadores de ameloblastoma .....	157
APÊNDICE I.B - Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos que possuem dente incluso para coleta de folículo pericoronário .....	158
APÊNDICE I.C - Termo de consentimento destinado a adolescentes (13 a 18 anos) .....	159

APÊNDICE I.D - Termo de consentimento destinado a responsável por adolescentes (13 a 18 anos).....	160
APÊNDICE I.E - Termo de consentimento destinado a responsável por crianças com idade inferior a 6 anos.....	161
APÊNDICE I.F - Termo de consentimento destinado a menores de idade (7 a 12 anos) .....	162
APÊNDICE II - Gel de agarose para verificação da integridade do RNA em amostras de ameloblastoma .....	163
APÊNDICE III - Condições térmicas de amplificação e sequências de primers utilizados no estudo.....	164
APÊNDICE IV - Padronização do primer <i>MMP-2</i> para análise de expressão gênica.....	165
APÊNDICE V - Padronização do primer <i>MMP-9</i> para análise de expressão gênica.....	166
APÊNDICE VI - Padronização do primer <i>Gli-1</i> para análise de expressão gênica.....	167
APÊNDICE VII - Padronização do primer <i>Gli-2</i> para análise de expressão gênica.....	168
APÊNDICE VIII - Eletroforese capilar de marcadores microssatélites na região cromossômica 9q21.33-9q.31 em uma amostra de ameloblastoma (DNA tumoral e estroma) .....	169
APÊNDICE IX - Sequenciamento de uma região no exon 17 contendo o sítio do polimorfismo C/T em uma amostra ameloblastoma (DNA tumoral e estroma).....	170
APÊNDICE X - Sequenciamento de uma região no exon 23 contendo o sítio do polimorfismo A/G em uma amostra ameloblastoma (DNA normal e estroma).....	171

## 1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é um tumor benigno derivado do epitélio odontogênico. Apresenta elevadas taxas de recorrência e um comportamento localmente agressivo, podendo levar à pronunciada destruição óssea do complexo maxilo-mandibular (FREGNANI *et al.*, 2010; GARDNER *et al.*, 2005).

Estudos mostraram a influência de alterações genéticas e epigenéticas na patogênese de tumores odontogênicos (BARRETO *et al.*, 2000; DINIZ *et al.*, 2011; GOMES *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2011; KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2010; MOREIRA *et al.*, 2009; NODIT *et al.*, 2004; PERDIGÃO *et al.*, 2004; VERED *et al.*, 2009).

A via de sinalização Hedgehog é apontada como uma via importante no desenvolvimento de alguns tipos de neoplasias, incluindo os tumores odontogênicos. Dentre os diversos genes atuantes na sinalização Hedgehog, destacam-se os genes *PTCH* (homólogo humano do gene *Patched* da *Drosophila melanogaster*) e *GLI-1* (oncogene homólogo 1 glioma-associado). O gene *PTCH* possui função biológica de supressor tumoral, já o *GLI-1* atua como fator de transcrição para outros genes, como aqueles relacionados aos mecanismos de apoptose, invasão e metástase tumoral (STECCA; RUIZ I ALTABA, 2010). O gene *PTCH* pode desempenhar uma função relevante na patogênese de tumores odontogênicos (BARRETO *et al.*, 2000; LEVANAT *et al.*, 1996; MIGALDI *et al.*, 2008). A expressão da proteína *PTCH* foi identificada em cistos e tumores odontogênicos, incluindo cisto radicular, ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico e mixoma odontogênico (BARRETO *et al.*, 2002). Além disso, identificou-se a presença de mutação do gene no tumor odontogênico queratocístico (BARRETO *et al.*, 2000).

A perda de heterozigossidade (LOH) é uma alteração genética representada pela perda de um alelo pela comparação do DNA tumoral com o DNA inalterado. Tal alteração pode acarretar danos na funcionalidade gênica. A redução funcional causada por perda ou inativação de um único alelo pode estar implicada na inativação do gene *PTCH* no tumor odontogênico queratocístico (PAN *et al.*, 2010). Considerando a importância da via do *PTCH* na odontogênese, neste estudo, foi levantada a hipótese de que possíveis alterações nessa via podem estar relacionadas ao desenvolvimento do ameloblastoma.

As metaloproteinases da matriz (*MMPs*) representam uma família de genes importantes na degradação da matriz colágena. Estudos mostraram uma associação entre a patogênese do ameloblastoma e *MMPs*, sendo que a atividade enzimática da proteína pode favorecer a degradação da matriz e invasividade do tumor (WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010a).

Apesar dos esforços para entender a patogênese do ameloblastoma, os mecanismos moleculares não são muito bem esclarecidos, sobretudo no que se refere às alterações epigenéticas (GOMES *et al.*, 2010; KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2010; MOREIRA *et al.*, 2009).

Em contraste a alterações de base genética, associadas a diversas doenças, as modificações epigenéticas são processos que podem alterar a expressão gênica sem, no entanto, modificar a sequência dos nucleotídeos; podem ser herdáveis no genoma durante a divisão celular. Por não alterar a sequência do DNA, essas modificações podem ser reversíveis (FEINBERG, 2004; MOMPALER, 2003). Essas características fazem desses mecanismos alvos atrativos para intervenções terapêuticas, principalmente, em relação ao câncer (DUCASSE; BROWN, 2006). Metilação do DNA e deacetilação de histonas correspondem às principais



modificações epigenéticas em humanos (TEODORIDIS *et al.*, 2004). Metilações aberrantes, especialmente na região promotora de genes relacionados ao controle do ciclo celular, podem exercer um papel fundamental no desenvolvimento de vários tipos de câncer através de mecanismos de silenciamento gênico (GOTO *et al.*, 2009; TANEMURA *et al.*, 2009; VAISSIÈRE *et al.*, 2009; VASILATOS *et al.*, 2009). Na grande maioria das vezes, a metilação ocorre em regiões promotoras e éxons, onde há presença de dinucleotídeos CG, passíveis de serem metilados (ESTELLER, 2002; FRENCH *et al.*, 2002; HERMAN; BAYLIN, 2003; RAZIN, 1998).

A grande maioria das pesquisas relacionadas à etiopatogênese do ameloblastoma está relacionada a alterações genéticas (BARRETO *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2011; NODIT *et al.*, 2004; PERDIGÃO *et al.*, 2004; VERED *et al.*, 2009). Pouco se conhece sobre a influência de modificações epigenéticas no desenvolvimento de tumores odontogênicos (Moreira *et al.*, 2009), especialmente em relação à metilação de genes moduladores do colágeno, como as metaloproteinases da matriz.

Assim, este estudo buscou avaliar duas abordagens no ameloblastoma: a perda de heterozigosidade no *locus* do gene *PTCH* e a modulação de genes reguladores do metabolismo do colágeno, com um enfoque na expressão gênica e metilação das metaloproteinases *MMP-2* e *MMP-9*.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ameloblastoma

#### 2.1.1 Aspectos Gerais

O ameloblastoma pertence a um amplo grupo de tumores odontogênicos que acomete o complexo maxilo-mandibular. Um dos primeiros relatos do tumor data do século XIX (1811-1813), descrito pelo Dr. Petrus Koning. O crânio do indivíduo encontra-se hoje arquivado no Instituto de Patologia da Universidade de Utrecht, na Holanda (HANEVELD, 1977). Diversas terminologias foram utilizadas para este tumor, incluindo epitelioma adamantino, adamantinoma, cistossarcoma e, em 1853, Wedl realizou a primeira descrição histopatológica (revisado por RASTOGI *et al.*, 2010). Em 1930, Ivy e Churchill introduziram o termo ameloblastoma para designar este tumor, cuja denominação permanece até hoje (IVY; CHURCHILL, 1930).

De maneira geral, os tumores odontogênicos são derivados de elementos epiteliais e/ou mesenquimais provenientes da histogênese dental, como a lâmina dentária, epitélio do órgão do esmalte, bainha epitelial de Hertwig e papila dentária. O comportamento biológico desses tumores é variável, apresentando lesões benignas e tumores malignos. São classificados histologicamente, de acordo com sua origem, em tumores epiteliais, mesenquimais ou mistos (BARNES *et al.*, 2005; MORGAN, 2011).

O ameloblastoma é tumor odontogênico de origem epitelial sem proliferação de componente mesenquimal. É classificado como um tumor benigno; no entanto, apresenta comportamento localmente invasivo e elevadas taxas de recorrência (FREGNANI *et al.*, 2010; GARDNER *et al.*, 2005). Apesar da raridade, é descrita na

literatura, uma variante maligna do ameloblastoma, que apresenta capacidade de originar focos metastáticos, especialmente no pulmão (VAN DAM *et al.*, 2010).

Não há dados precisos em relação à prevalência ou incidência global do ameloblastoma. Um estudo de revisão sistemática buscou estabelecer a prevalência dos tumores odontogênicos na população mundial, a partir de publicações científicas entre 1960 e 2010. O tumor mais frequentemente encontrado foi o ameloblastoma (39,6%), seguido pelo odontoma (20,1%) e tumor odontogênico queratocístico (13,8%) (AVELAR *et al.*, 2011).

Clinicamente, o ameloblastoma apresenta-se como uma lesão assintomática de crescimento lento, acometendo, com maior frequência, a região posterior da mandíbula (Figura 1A). Em alguns casos, está associado a um dente incluso. Não há predileção por gênero e a faixa etária varia, aproximadamente, de 30 a 60 anos, apesar do acometimento em idades mais precoces. O aspecto radiográfico é variável, podendo ser uni ou multilocular com radiolucência cortical (Figura 1B). Reabsorção radicular pode ser observada. Devido ao crescimento infiltrativo pelos espaços medulares, pode-se observar ruptura de corticais ósseas (GARDNER *et al.*, 2005).

O diagnóstico diferencial inclui uma variedade de tumores e cistos odontogênicos, particularmente o tumor odontogênico queratocístico e o mixoma, tumores e cistos não odontogênicos, como lesão central de células gigantes e lesões fibro-ósseas (BARNES *et al.*, 2005; SLOOTWEG *et al.*, 2006).

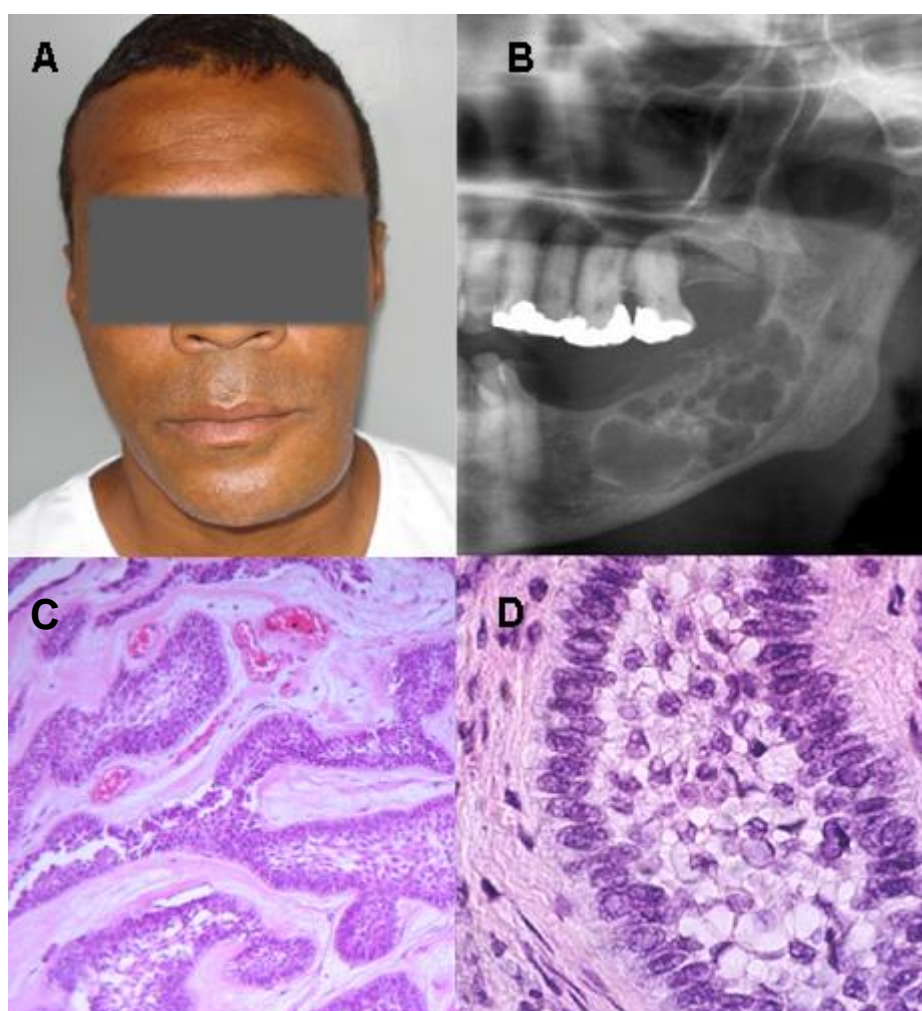
De acordo com a Classificação de tumores odontogênicos da Organização Mundial da Saúde, o ameloblastoma benigno é classificado em sólido/multicístico, extra-ósseo/periférico, desmoplásico e unicístico (BARNES *et al.*, 2005; REICHART *et al.*, 2006).

Histologicamente, são descritos dois padrões básicos do ameloblastoma sólido, o folicular e o plexiforme. O padrão folicular consiste de ilhas de epitélio odontogênico em um estroma fibroso. As células basais dessas estruturas são colunares e os núcleos apresentam um aspecto de polarização reversa à membrana basal. As células centrais são frouxamente arranjadas, semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte (Figura 1C e Figura 1D). Estas áreas, frequentemente, tornam-se císticas. De acordo com o aspecto das células do tumor do ameloblastoma folicular, outras terminologias podem ser utilizadas, como ameloblastoma de células fusiformes, ameloblastoma de células basais, de células granulares ou acantomatoso. O padrão plexiforme apresenta células basais arranjadas em ilhas que se anastomosam; o estroma é delicado, podendo apresentar degeneração cística. Tanto no padrão folicular como no plexiforme, a atividade mitótica e pleomorfismo são características dificilmente identificadas (GARDNER *et al.*, 2005; HERTOOG *et al.*, 2012; SLOOTWEG *et al.*, 2006).

O ameloblastoma unicístico representa uma variante do tumor que, no exame macroscópico, apresenta uma cavidade cística. Três subtipos desse tumor são reconhecidos, luminal, intraluminal e mural. O ameloblastoma periférico apresenta o padrão histológico mais comum o tipo sólido/multicístico, no entanto, sua localização é extraóssea. No tipo desmoplásico, predominam os componentes do estroma com um aspecto de compressão sobre o epitélio odontogênico (GARDNER *et al.*, 2005; HERTOOG *et al.*, 2012; SLOOTWEG *et al.*, 2006).

O tratamento preferencial do tumor é sua ressecção cirúrgica com alguma margem além dos limites clínicos e radiográficos da lesão. Em alguns casos de ameloblastoma unicístico luminal, a enucleação pode ser justificada por apresentar pouca recorrência (GARDNER *et al.*, 2005; HERTOOG *et al.*, 2011).

Pesquisas têm direcionado possíveis vias moleculares alteradas na patogênese do ameloblastoma, como a via de sinalização Hedgehog, além de superexpressão de metaloproteinases da matriz, genes relacionados aos mecanismos da apoptose e regulação do ciclo celular (BARRETO *et al.*, 2002; LUO *et al.*, 2006; QIAN *et al.*, 2010). Assim, sugeriu-se que novos estudos fossem direcionados para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas não-cirúrgicas, tendo como alvo as alterações moleculares presentes no tumor (SAUK *et al.*, 2010).



**Figura 1. Aspecto clínico, radiográfico e histopatológico de um caso de ameloblastoma sólido.**

A: Visão extraoral mostrando assimetria facial no lado esquerdo, na região posterior da mandíbula. B: Radiografia panorâmica revela lesão extensa radiolúcida multilocular. C: Imagem histopatológica de ameloblastoma sólido; ilhas de epitélio odontogênico encontram-se dispostas em um estroma fibroso (HE, 100X). D: Aspecto da ilha de epitélio odontogênico do ameloblastoma evidenciando as células colunares com polarização reversa dos núcleos e a porção central de células frouxamente arranjadas, semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte (HE, 400X) (Imagens clínicas gentilmente cedidas pelo Dr. Júlio César Tanos Lacerda).

### 2.1.2 Patogênese do ameloblastoma

Tumores epiteliais, como o ameloblastoma, são reconhecidos pela sua origem a partir de remanescentes de epitélio odontogênico. No entanto, os mecanismos específicos que levam ao seu desenvolvimento não são bem estabelecidos. A identificação de moléculas sinalizadoras, comuns nas fases da odontogênese e no ameloblastoma, sugere que a ativação aberrante ou a desregulação de genes relacionados à histogênese dental pode desempenhar um papel importante na patogênese do tumor (STOLF *et al.*, 2007). As interações epitélio-mesenquimais que ocorrem durante a odontogênese são finamente reguladas por diversas vias de sinalização e genes relacionados, incluindo BMPs, SHH, Wnt e  $\beta$ -catenina, *AMBN*, responsáveis, de maneira geral, pelos mecanismos de desenvolvimento, interações epitélio-mesênquima, diferenciação celular e formação óssea (SARKAR; SHARPE, 1999). Foi demonstrada uma expressão diferencial da proteína SHH no ameloblastoma comparado com tecido de germe dentário (KUMAMOTO *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2006). A reatividade imuno-histoquímica para BMPs e BMPRs foi identificada tanto em células epiteliais como no estroma do ameloblastoma, sugerindo que estas BMPs agem por meio de mecanismos autócrinos e parácrinos e estão envolvidos na interação epitélio-mesenquimal no tumor. Além disso, foi sugerido que essas proteínas influenciam na citodiferenciação do epitélio odontogênico neoplásico (KUMAMOTO; OOYA, 2006). Acredita-se, ainda, que a desregulação da via de sinalização Wnt, importante na odontogênese, pode influenciar no desenvolvimento do ameloblastoma. Nesse mecanismo, a estabilização da  $\beta$ -catenina citoplasmática e sua translocação para o núcleo favorecem a superexpressão de genes relacionados à proliferação celular

(POLAKIS, 2000). No ameloblastoma, foi identificado um acúmulo nuclear de  $\beta$ -catenina, sugerindo que tal alteração pode estar associada à tumorigênese (KUMAMOTO; OOYA, 2005; TANAHASHI *et al.*, 2008).

Além desses genes, o gene *AMBN*, que codifica a proteína ameloblastina, importante na diferenciação dos ameloblastos e sinalização epitélio-mesenquimal durante a odontogênese, tem mostrado uma função importante na tumorigênese do ameloblastoma e de outros tumores odontogênicos. Mutações somáticas na região codificadora do gene foram identificadas no ameloblastoma multicístico e unicístico, no tumor odontogênico escamoso e tumor odontogênico adenomatóide (PERDIGÃO *et al.*, 2004). A ausência de outras proteínas de matriz no ameloblastoma, como a amelogenina e enamelina, sugere que as células neoplásicas não sofrem maturação funcional com secreção de proteínas do esmalte (PERDIGÃO *et al.*, 2004; SAKU *et al.*, 1992).

Estudos mostraram outros aspectos genéticos e moleculares que podem exercer influência na patogênese do ameloblastoma, destacando a apoptose, clonalidade, genes supressores de tumor e outros relacionados ao ciclo celular (GOMES *et al.*, 2009; LUO *et al.* 2006; NODIT *et al.*, 2004). Acredita-se que genes envolvidos no mecanismo da apoptose sejam reguladores da proliferação de células tumorais no ameloblastoma, uma vez que tais genes participam do processo da tumorigênese em diversos tipos de câncer (LUO *et al.*, 2006; SANDRA *et al.*, 2001). Foi demonstrado um perfil distinto de expressão de proteínas nas células neoplásicas. As células basais periféricas apresentaram um perfil anti-apoptótico com expressão pronunciada da proteína Bcl-2; já as células localizadas nas áreas centrais das ilhas de epitélio foram positivas para a caspase-3, revelando um perfil pró-apoptótico (SANDRA *et al.*, 2001). Apesar desse perfil distinto de expressão, a

apoptose não foi considerada como um marcador de recorrência, uma vez que não foi verificada diferença de tais proteínas entre ameloblastomas primários e recorrentes (LUO *et al.*, 2006).

O gene *TP53* é classicamente conhecido com um gene supressor de tumor, cujas alterações moleculares têm mostrado associação com a carcinogênese. No entanto, no ameloblastoma, acredita-se que alterações nesse gene não sejam tão relevantes. Carvalhais *et al.* (1999) identificaram negatividade da proteína p53 em amostras de ameloblastoma e em outros tumores e cistos odontogênicos, como tumor odontogênico queratocístico e cisto radicular (CARVALHAIS *et al.*, 1999). Vale ressaltar que essa proteína possui um curto período de meia-vida; uma vez alterada em neoplasias, aumenta o seu tempo de meia-vida, sendo assim, identificada nos tecidos (VOUSDEN; LANE, 2007). Além disso, mutações, metilação ou perdas alélicas nesse gene são eventos pouco frequentes no ameloblastoma (KUMAMOTO *et al.*, 2004; MOREIRA *et al.*, 2009; SANDRA *et al.*, 2002; SHIBATA *et al.*, 2002). Sugere-se que o gene *MDM2*, cuja expressão proteica foi altamente expressa no ameloblastoma, seja um importante regulador negativo do *TP53* nesse tumor, independente de outras alterações moleculares (CARVALHAIS *et al.*, 1999; revisado por GOMES *et al.*, 2010). O *PTEN* é outro gene supressor de tumor que vem sendo investigado em amostras de ameloblastoma. A expressão proteica reduzida desse gene (KUMAMOTO; OOYA, 2007), associada a frequentes perdas alélicas, sugere um papel importante do mesmo na patogênese do ameloblastoma (NODIT *et al.*, 2004).

O índice de proliferação celular é outro aspecto importante que parece ser relevante na patogênese do ameloblastoma. Positividade nuclear para a proteína Ki67 foi identificada na periferia das ilhas epiteliais no ameloblastoma sólido e no



unicístico. Esse padrão de marcação sugere que a proliferação celular e o consequente crescimento do ameloblastoma ocorrem, preferencialmente, em áreas periféricas compostas por células tipo-ameloblastos (JÄÄSKELÄINEN *et al.*, 2004). Foi demonstrado um maior índice de proliferação celular em ameloblastomas recorrentes em relação a lesões primárias (HIRAYAMA *et al.*, 2004; PIATTELLI *et al.*, 1998). Uma observação interessante mostrou um maior índice de proliferação celular em ameloblastomas com maior frequência de alterações microssatélites (MIGALDI *et al.*, 2008). No entanto, não é bem esclarecido se a proliferação das células tumorais favorece as alterações microssatélites ou se tais alterações são responsáveis pela desregulação do ciclo celular (revisado por GOMES *et al.*, 2010).

O padrão de clonalidade das células odontogênicas no ameloblastoma é um evento pouco investigado. A natureza clonal de uma lesão pode ser avaliada através de um ensaio fenotípico baseado na inativação do cromossomo X, especialmente em lesões que não têm marcadores genéticos definidos (CHEN; PRCHAL, 2007). Foi demonstrado um padrão monoclonal das células do ameloblastoma sólido, sugerindo a origem tumoral de um único clone alterado de células odontogênicas. Esse padrão de clonalidade pode ser devido à mutação somática em um clone específico de células embrionárias (GOMES *et al.*, 2009).

Não há um conhecimento preciso sobre as causas da invasividade local do ameloblastoma. Acredita-se que o crescimento e proliferação das células neoplásicas estejam relacionados à ruptura da membrana basal e à ação de proteínas envolvidas na osteoclastogênese e componentes da matriz extracelular, como o fator de diferenciação de osteoclastos RANKL e as metaloproteinases da matriz (MMPs) (PINHEIRO *et al.*, 2004; QIAN *et al.*, 2010). Estudos mostraram que células odontogênicas do ameloblastoma podem induzir a osteoclastogênese

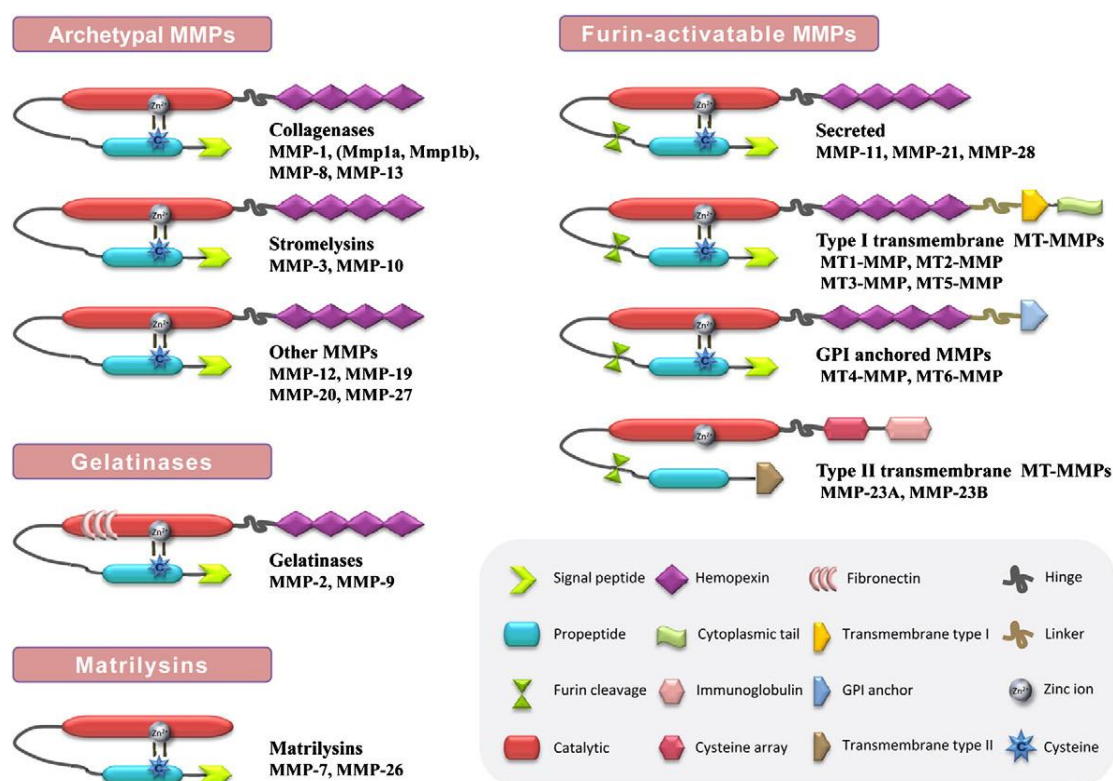
através da síntese de RANKL e TNF $\alpha$  (SANDRA *et al.*, 2005). Dessa forma, a reabsorção do tecido ósseo circundante ao tumor pode favorecer a invasividade das células neoplásicas em proliferação (GOMES *et al.*, 2010). O caráter invasivo do ameloblastoma foi, também, associado à expressão de MMPs (WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010a). Tanto as células do estroma fibroso como as células neoplásicas do ameloblastoma podem ser responsáveis pela síntese dessas enzimas proteolíticas que degradam a matriz óssea e matriz extracelular, criando um microambiente favorável ao crescimento tumoral (HENRIQUES *et al.*, 2011; PINHEIRO *et al.*, 2004).

Outras alterações como perdas alélicas relacionadas a genes supressores de tumor, desregulação da via de sinalização HH, metilação do DNA e função proteolítica de metaloproteinases no ameloblastoma serão abordadas a seguir.

## 2.2 Metaloproteinases da matriz

Metaloproteinases da matriz (MMPs) compreende uma família de enzimas zinco-dependentes, geneticamente distintas, mas estruturalmente relacionadas em sua constituição molecular. Estas enzimas são responsáveis pela degradação de proteínas da matriz extracelular e componentes da membrana basal (FANJUL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010; QUILLARD *et al.*, 2011). As MMPs são, também, relevantes no processamento de proteínas que não são próprias da matriz extracelular, tais como fatores de crescimento, citocinas e quimiocinas (BUTLER *et al.*, 2009; LEVI *et al.*, 1996; MCQUIBBAN *et al.*, 2001). São funcionalmente importantes na organogênese, remodelação de tecidos, migração e adesão celular, angiogênese, desenvolvimento ósseo e nos processos de invasão e metástase de neoplasias malignas (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007; ROWE; WEISS, 2008; ZHOU *et al.*, 2010). Engloba um grupo de 24 enzimas humanas classificadas em diferentes grupos, como colagenases, estromelinas, gelatinases, matrilisinas, MMPs tipo-membrana e outras MMPs, cuja classificação se baseia na especificidade do substrato e estrutura molecular (NAGASE *et al.*, 1992; PUENTE *et al.*, 2003). Basicamente, a arquitetura molecular de uma MMP é constituída por um domínio pró-peptídeo (pró-domínio) contendo um motivo cisteína, um domínio metaloproteinase catalítico que apresenta o íon zinco, um peptídeo de ligação e um domínio hemopexina. De acordo com o tipo de metaloproteinase, a estrutura da enzima pode ser modificada pela perda ou incorporação de alguns domínios adicionais, responsáveis pelas funções distintas das MMPs (Figura 2) (FANJUL-FERNÁNDEZ *et al.*, 2010).

As metaloproteinases são secretadas na matriz extracelular ou encontram-se ligadas à membrana, cujo domínio catalítico se apresenta disposto no meio extracelular (HADLER-OLSEN *et al.*, 2011). São secretadas como zimógenos. A manutenção do estado de latência da enzima é devido à ligação do resíduo cisteína ao íon zinco, presente no domínio catalítico. Sugere-se que a ativação da enzima latente ocorre, principalmente, por mecanismos que levam à dissociação da ligação zinco-cisteína. Assim, essa ruptura é entendida como um “switch” que dispara a ativação da MMP (VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990). As MMPs secretadas são ativadas no meio extracelular ou na membrana celular. No entanto, algumas metaloproteinases podem ser ativadas no meio intracelular, por furinas ou pró-proteínas convertases (NAGASE, 1997; PEI; WEISS, 1995).



**Figura 2. Composição molecular e classificação estrutural das MMPs de acordo com a disposição dos domínios.**

Fonte: FANJUL-FERNANDÉZ *et al.*, 2010

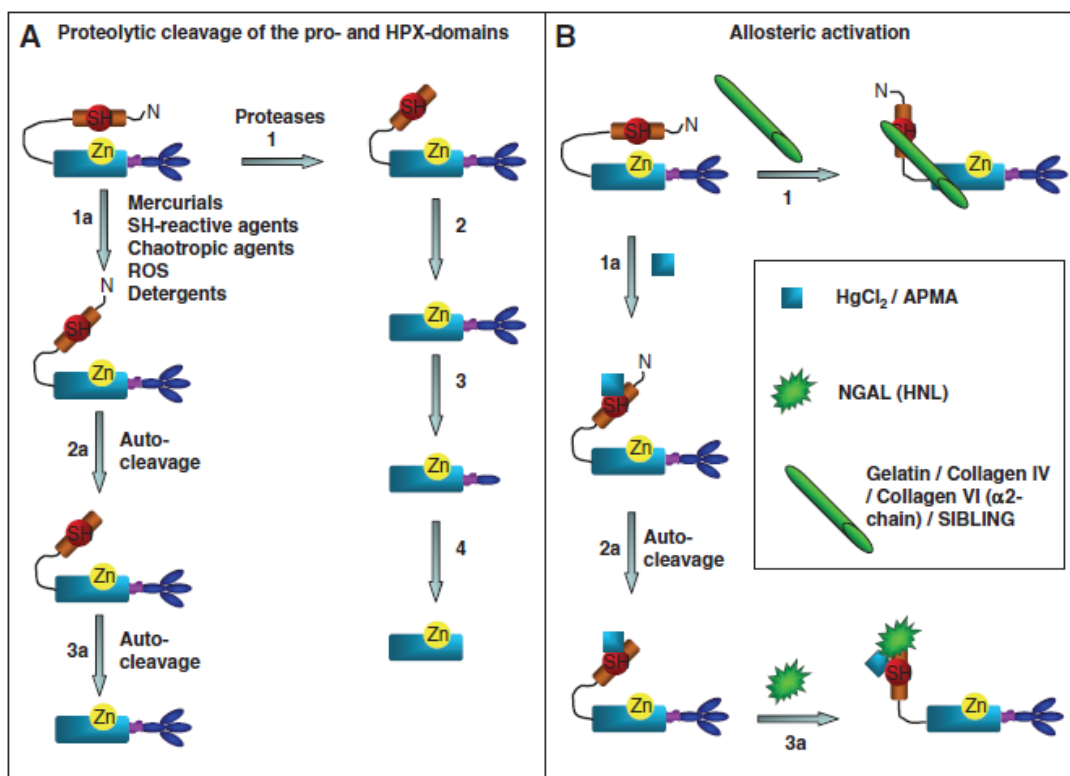
A expressão e a atividade funcional das MMPs podem ser reguladas em diversos níveis, destacando o nível transcricional, a ativação da pró-enzima e sua inibição endógena. Esses mecanismos podem atuar de maneira coordenada para reprimir a ação proteolítica da enzima (CLARK *et al.*, 2008; FANJUL-FERNANDES *et al.*, 2010; SORSA *et al.*, 2004; TIAN *et al.*, 2011). De maneira geral, a atividade da metaloproteinase é controlada pelo equilíbrio entre a síntese da enzima e sua degradação por inibidores e/ou reguladores endógenos (FANJUL-FERNANDES *et al.*, 2010; SORSA *et al.*, 2004).

A expressão dos genes MMPs é, primariamente, regulada através da transcrição, que usualmente resulta em níveis basais dos transcritos nos processos fisiológicos. A maioria das MMPs compartilha de elementos cis-regulatórios comuns na região promotora do gene, como os sítios de ligação de fatores de transcrição TATA, AP-1, STAT e NF- $\kappa$ B. Como resultado, as metaloproteinases podem ser co-reguladas em sua expressão pelos mesmos estímulos (FANJUL-FERNANDES *et al.*, 2010). No entanto, algumas MMPs funcionalmente relacionadas, como as gelatinases MMP-2 e MMP-9, diferem de maneira significativa na composição de seus elementos cis-regulatórios. Dessa forma, essas duas enzimas podem apresentar mecanismos distintos de regulação gênica. Por não apresentarem muita similaridade nos sítios de ligação na região promotora, um determinado fator de transcrição pode influenciar de maneira distinta sobre essas duas gelatinases (FANJUL-FERNANDES *et al.*, 2010). Citocinas e fatores de crescimento podem exercer um papel importante na regulação de metaloproteinases; a interleucina-1 $\alpha$  é capaz de estimular a expressão de MMP-1 e MMP-3 em células do estroma conjuntivo (CHEVRONNAY *et al.*, 2011) De maneira semelhante, o fator de necrose tumoral- $\alpha$ , fator de crescimento transformador- $\beta$ 1 e a interleucina-1 $\beta$  podem

favorecer o aumento da expressão ou a ativação de pró-MMPs, especialmente as gelatinases (ROY *et al.*, 2011).

A ativação da pró-enzima é outro mecanismo pelo qual as MMPs são reguladas. Para isso, faz-se necessária uma modificação física na localização do pro-domínio, visando à separação da ligação zinco-cisteína, responsável pelo caráter inativo da proteína. Dois mecanismos principais estão envolvidos na ativação de metaloproteinases. Um deles envolve a clivagem proteolítica e remoção do pro-domínio. Outro mecanismo é a ativação alostérica, em que ocorre uma modificação conformacional na proteína; o pró-domínio é deslocado do sítio catalítico da enzima sem ocorrer clivagem em sua estrutura (NAGASE *et al.*, 1997; VAN WART; BIRKEDAL-HANSEN, 1990) (Figura 3).

É bem estabelecida a participação de inibidores teciduais de MMPs (TIMPs) atuando como reguladores negativos da expressão dessas enzimas (PAGE-MCCAW *et al.*, 2007; TIAN *et al.*, 2011; YAN; BOYD, 2007). As TIMPs inibem a atividade das MMPs pela formação de um complexo estequiométrico inibidor-enzima, que favorece a inibição endógena da metaloproteinase (BREW *et al.*, 2000).



**Figura 3. Ativação proteolítica e alostérica de MMPs.** A: Clivagem proteolítica do pró-domínio e domínio hemopexina por várias proteinases e outros compostos químicos. B: Ativação alostérica em que o pró-peptídeo permanece intacto. Nesse processo identifica-se uma mudança conformacional na estrutura da proteína, podendo ocorrer uma auto-clivagem que não remove o pró-domínio conservado. Fonte: HADLER-OLSEN *et al.*, 2011.

Mecanismos epigenéticos, como metilação do DNA, modificação na estrutura da cromatina e acetilação de histonas, foram relacionados à regulação da expressão de MMPs (CHERNOV *et al.*, 2009; COUILLARD *et al.*, 2010; MA *et al.*, 2004; SHUKEIR *et al.*, 2006). A metilação de ilhas ricas em dinucleotídeos CpG tem sido amplamente reconhecido como um mecanismo eficiente de repressão da transcrição gênica (MARTÍN-SUBERO; ESTELLER, 2011; ESTELLER, 2011; LUJAMBIO *et al.*, 2010). Foi observada, em células de linfoma, uma associação inversa entre a metilação promotora e os níveis de expressão do gene *MMP-9* (CHICOINE *et al.*,

2002). De maneira similar, a hipometilação de *MMP-2* mostrou uma associação com a transcrição aumentada do gene e a invasividade de células neoplásicas (SHUKEIR *et al.*, 2006). Dessa forma, as evidências sugerem que uma redução dos níveis de metilação de genes MMPs pode ser funcionalmente relevante para o aumento da expressão gênica.

A remodelação da estrutura da cromatina é outro evento epigenético que foi associado ao controle da expressão de algumas MMPs (MA *et al.*, 2004; QIN; HAN, 2010). Esse evento está intrinsecamente relacionado aos níveis de acetilação de histonas, que favorece a manutenção de um estado desenovelado da cromatina para a ação funcional de fatores de transcrição. Foi demonstrado que deacetilação da histona HDAC4 está associada à redução da transcrição e expressão protéica de MMP-9 e MMP-13 (QIN; HAN, 2010). Nesse contexto, o estado deacetilado da histona estaria favorecendo um enovelamento da cromatina, tornando a região promotora dos genes menos acessível aos fatores de transcrição (QIN; HAN, 2010).

O gene *MMP-1* também mostrou ser alvo da acetilação de histonas. Em um modelo de estudo em fibroblastos da derme sob a ação da luz-ultravioleta, foi verificada uma associação entre o aumento da expressão de *MMP-1* e a acetilação da histona H3 (KIM *et al.*, 2009).

Estudos recentes têm mostrado que os micro-RNAs podem influenciar na regulação pós-transcricional das MMPs (OSAKI *et al.*, 2011; YAN *et al.*, 2011). Estes pequenos RNAs são capazes de regular a expressão gênica através da degradação do RNA mensageiro ou repressão da tradução (GARTEL, 2006; ZHANG *et al.*, 2007). Tem-se observado que os micro-RNAs podem atuar direta ou indiretamente sobre a expressão de MMPs. Um estudo funcional em células de glioblastoma mostrou que o microRNA-146b reduziu a migração e capacidade invasiva das



células, sendo tal efeito mediado pela redução da expressão de MMP-16 (XIA *et al.*, 2009). Em um modelo de estudo de infarto no miocárdio, a superexpressão do microRNA-21 foi associada indiretamente ao aumento da expressão de *MMP-2*, através da redução dos níveis de transcrição do gene *PTEN*, que tem o *MMP-2* como alvo (ROY *et al.*, 2009). Outro estudo mostrou que o miR-491-5p tem o *MMP-9* como alvo específico; a superexpressão desse microRNA está associada à redução dos níveis de transcrição de *MMP-9* e à consequente inibição da invasão de células neoplásicas do glioma (YAN *et al.*, 2011). Dessa forma, as MMPs podem ser reguladas no nível transcricional ou pós-transcricional, ser alvo de alterações genéticas ou modificações epigenéticas. Tal regulação pode favorecer o equilíbrio ou a desregulação da expressão protéica e funcionalidade da MMP, seja em processos fisiológicos ou patológicos.

### 2.2.1 Metaloproteinases da matriz na patogênese do ameloblastoma

As MMPs e seus inibidores enzimáticos (TIMPs) foram descritos como elementos fundamentais na interação entre células epiteliais e componentes mesenquimais em tecidos odontogênicos neoplásicos e fisiológicos (KUMAMOTO *et al.*, 2003). A expressão de MMPs e TIMPs foi investigada em germes e folículos dentários, sendo que a interação dessas moléculas pode controlar o *turnover* durante o desenvolvimento dos tecidos derivados do epitélio odontogênico (HEIKINHEIMO; SALO, 1995; SAHLBERG *et al.*, 1999). Os estudos destacaram a relevante função dessas enzimas na patogênese de tumores odontogênicos, sobretudo envolvida no crescimento e invasividade tumoral (SIQUEIRA *et al.*, 2010; WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2010a)

A MMP-2 é uma das mais importantes enzimas proteolíticas que degrada a membrana basal e a matriz extracelular durante a invasão e metástase tumoral (WANG *et al.*, 2007). Acredita-se que as células neoplásicas utilizam as metaloproteinases fisiológicas para facilitar o mecanismo de invasão tumoral (HEPPNER *et al.*, 1996). Embora esta enzima esteja relacionada ao desenvolvimento de tumores, sugere-se que esta seja constitutivamente expressa em tecidos fisiológicos e em vários tipos celulares, apresentando características de um gene endógeno (CROWTHER *et al.*, 2000; GOODALL *et al.*, 2001; HUHTALA *et al.*, 1990).

A atividade da MMP-2 está relacionada à capacidade invasiva do ameloblastoma. Um estudo funcional mostrou que a inibição da enzima MMP-2 foi capaz de inibir a invasão tumoral *in vitro* e *in vivo*. O inibidor MMP-2I reduziu

significativamente os níveis de MMP-2, secretado pelas células neoplásicas, e a taxa de invasividade celular (ZHANG *et al.*, 2009a).

Sugere-se que uma maior expressão e atividade do gene *MMP-2* esteja associada a um comportamento infiltrativo mais agressivo do ameloblastoma (PINHEIRO *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2009a). A proteína MMP-2 foi significativamente mais expressa no carcinoma ameloblástico e no ameloblastoma comparado ao tumor odontogênico queratocístico. Foi demonstrado, ainda, que a enzima pode ser regulada, de maneira importante, pelo gene *RECK*. Uma relação inversa entre a expressão de *RECK* e MMP-2 foi verificada no ameloblastoma. Sugere-se que a regulação inibitória de MMP-2 por esse gene possa ser um mecanismo importante envolvido nos processos de invasão do ameloblastoma, através da regulação pós-traducional de MMP-2 (ZHANG *et al.*, 2009b).

A invasividade do ameloblastoma está intimamente relacionada ao mecanismo da osteoclastogênese. As células do tumor apresentam capacidade de induzir a reabsorção óssea através da secreção de fatores como o RANKL e TNF $\alpha$  (SANDRA *et al.*, 2005). Além disso, a degradação da matriz óssea no tumor está intrinsecamente relacionada à ação de MMPs sintetizadas pelas células neoplásicas do ameloblastoma (QIAN *et al.*, 2010). A MMP-9 é, provavelmente, a mais importante proteinase envolvida na reabsorção óssea (ANDERSEN *et al.*, 2004). Essa proteína, juntamente com RANKL, pode ter uma função primordial na osteoclastogênese durante o crescimento do ameloblastoma (QIAN *et al.*, 2010).

A presença de MMP-2 e MMP-9 no ameloblastoma é, possivelmente, relacionada à diferenciação celular que ocorre nas células neoplásicas. Essas

células não sofrem processo de maturação e possuem a capacidade de síntese de moléculas da matriz extracelular (RIBEIRO *et al.*, 2009; TSUJIGIWA *et al.*, 2005).

A proteína MMP-9 mostrou-se mais expressa em relação à MMP-2 no ameloblastoma. Sugere-se que as MMPs-2 e -9 atuem de maneira combinada com a MMP-1 para promover a degradação do colágeno presente na matriz extracelular (RIBEIRO *et al.*, 2009). É interessante destacar que tais MMPs apresentaram imunolocalização tanto no parênquima como nas células do estroma tumoral. Dessa forma, o caráter invasivo do tumor pode ser explicado, em parte, como resultado da participação ativa das células do estroma e de seus produtos secretados na matriz (RIBEIRO *et al.*, 2009).

Ensaio imuno-histoquímico verificaram a expressão de MMPs na interface ameloblastoma-osso, sugerindo, dessa forma, a importância dessas proteases na degradação da matriz e crescimento tumoral (PINHEIRO *et al.*, 2004). Destacaram, ainda, que a imunopositividade das MMPs nas células neoplásicas pode ser constitutivamente regulada ou estimulada por citocinas e fatores de crescimento (Chang, Werb, 2001; Visse; Nagase, 2003), e a expressão dessas enzimas no estroma é, provavelmente, causada pela indução tumoral (Sternlicht; Werb, 2001). Foi demonstrada uma maior expressão de MMP-9 em células do estroma do ameloblastoma comparada a amostras de tecidos odontogênicos normais, como papila e folículo dentário. Inibidores de MMPs, como TIMP-1 e TIMP-2, foram expressos nas células neoplásicas, componentes do estroma e membrana basal. O equilíbrio entre MMPs e TIMPs pode ser considerado com um possível determinante de progressão do ameloblastoma (KUMAMOTO *et al.*, 2003).

O estudo dos componentes da matriz extracelular e da membrana basal é um fator-chave para o melhor entendimento do comportamento biológico de lesões

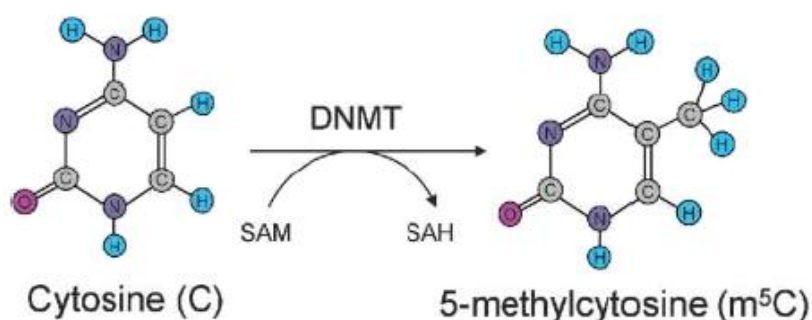
odontogênicas (ALAEDDINI *et al.*, 2009). Nesse contexto, Henriques *et al.* (2011) demonstraram que a interação entre colágeno tipo IV, MMP-9 e TIMP-2 é um importante fator para o estabelecimento de diferenças do comportamento biológico entre cistos e tumores odontogênicos. Ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico apresentaram maior imunopositividade de MMP-9, especialmente no estroma, em relação a lesões de baixa agressividade, como cisto dentífero e cisto radicular. Os tumores em questão, cuja expressão de MMP-9 mostrou-se aumentada, apresentaram, ainda, expressão reduzida de colágeno tipo IV e marcação descontínua da proteína na membrana basal. Assim, sugeriu-se que a degradação da membrana basal pode ser consequência da ação de MMP-9 (HENRIQUES *et al.*, 2011). A perda da integridade da membrana basal é, sabidamente, conhecida por favorecer as alterações na interação epitélio-mesênquima, que pode contribuir para os mecanismos de diferenciação e proliferação tumoral do ameloblastoma (NAKANO *et al.*, 2002).

### 2.3 Metilação do DNA

A adição do radical metil ( $\text{CH}_3$ ) em regiões específicas do DNA, que contém predominantemente nucleotídeos citosina, denomina-se metilação. Esse mecanismo é um dos principais eventos epigenéticos. Exerce funções importantes no controle da expressão gênica, desenvolvimento embrionário, inativação do cromossomo-X e regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular, além de ser um processo essencial para o desenvolvimento de mamíferos (BIRD, 2002; ESTELLER, 2002).

Em 1948, foi descoberta a 5'metil-citosina (WEISSBACH, 1993). Esta corresponde a uma citosina metilada, isto é, possui um grupamento metil adicionado na posição 5 do anel pirimídico. Porém, nem toda citosina presente no genoma pode ser metilada. Para que ocorra o processo de metilação é necessário que a citosina esteja na sequência 5'-CG-3', conhecido como dinucleotídeo CpG, onde se observa o nucleotídeo citosina seguido pela guanina, unidos entre si por uma ligação fosfodiéster (SINGAL, 1999). Os dinucleotídeos CpGs estão distribuídos heterogeneamente no genoma, encontrando-se principalmente em regiões de DNA altamente repetitivo e heterocromatina (FAZZARI; GREALLY, 2004), e na maioria das vezes, cerca de 80%, estão altamente metilados. No entanto, existem regiões no genoma, ricas em CpG, que normalmente não estão metiladas ou estão metiladas em baixa frequência. Trata-se de pequenas regiões do DNA variando entre 0,5 a 5 Kb, ocorrendo em média a cada 100 Kb, conhecidas como ilhas CpG. Normalmente são encontradas nas extremidades 5' dos genes, em geral na região promotora, podendo se estender para o interior do primeiro éxon. Entretanto, nem todas as ilhas CpG localizam-se na região promotora do gene; algumas podem ser encontradas no interior de exons e introns (RUSSH; PLASS, 2002).

Na grande maioria das vezes, a metilação ocorre em regiões promotoras e exons, onde há presença de ilhas CpG (ESTELLER, 2002; FRENCH *et al.*, 2002; HERMAN; BAYLIN, 2003; RAZIN, 1998). Resíduos de citosinas no DNA são convertidos em 5'metil-citosina pela ação de enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). O grupo metil é doado pelo S-adenosil-metionina (SAM), que é então convertida em S-adenosil-homocisteína (SAH) (Figura 4) (GRØNBAEK *et al.*, 2007).



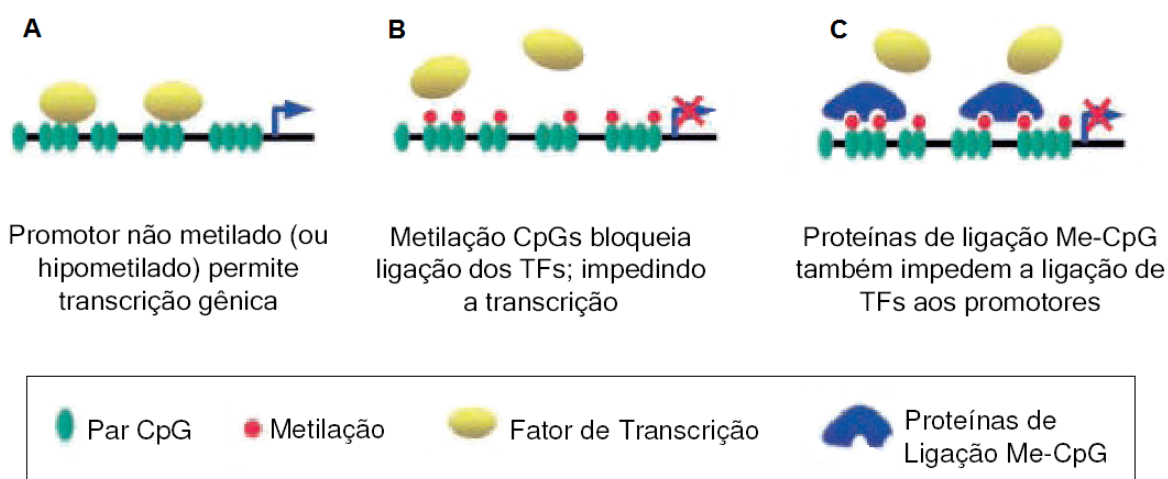
**Figura 4. Metilação da citosina.**

Fonte: GRØNBAEK *et al.*, 2007

Uma maior frequência de citosinas na região promotora intensifica o processo da metilação, podendo levar a um estado de silenciamento gênico. Esse mecanismo pode reprimir a transcrição diretamente pela inibição de fatores de transcrição ligados ao DNA e também, indiretamente, recrutando proteínas que ativam a enzima histona deacetilase, responsável por possuir complexos repressores do DNA metilado (Figura 5) (ESTELLER, 2002; FRENCH *et al.*, 2002; JENUWEIN; ALLIS, 2001).

O mecanismo preciso pelo qual a metilação reprime a transcrição não é bem estabelecido. Uma teoria sugere que a metilação interfira na ligação de fatores de transcrição em sequências regulatórias do DNA. Outra teoria, relacionada ao

silenciamento gênico através da metilação, é a modificação da estrutura da cromatina que bloqueia o acesso dos fatores de transcrição e, também, através da afinidade de ligação do DNA metilado a proteínas que suprimem a expressão gênica, como as proteínas de ligação metil-CpG, destacando MeCP1 e MeCP2. Nesse processo de silenciamento gênico, não só a metilação exerce uma influência; a deacetilação da proteína histona também influencia sobremaneira no mecanismo de modificação da estrutura da cromatina. A deacetilação das histonas é um mecanismo responsável por remover grupos acetil, levando ao envelhecimento do DNA. Este, uma vez condensado em torno das histonas, compromete a ligação dos fatores de transcrição, podendo impedir a transcrição gênica. As citosinas metiladas tendem a recrutar histonas deacetilases favorecendo a condensação do DNA (Figura 6) (ATTWOOD *et al.*, 2002; ENG *et al.*, 2000; NAN *et al.*, 1997).

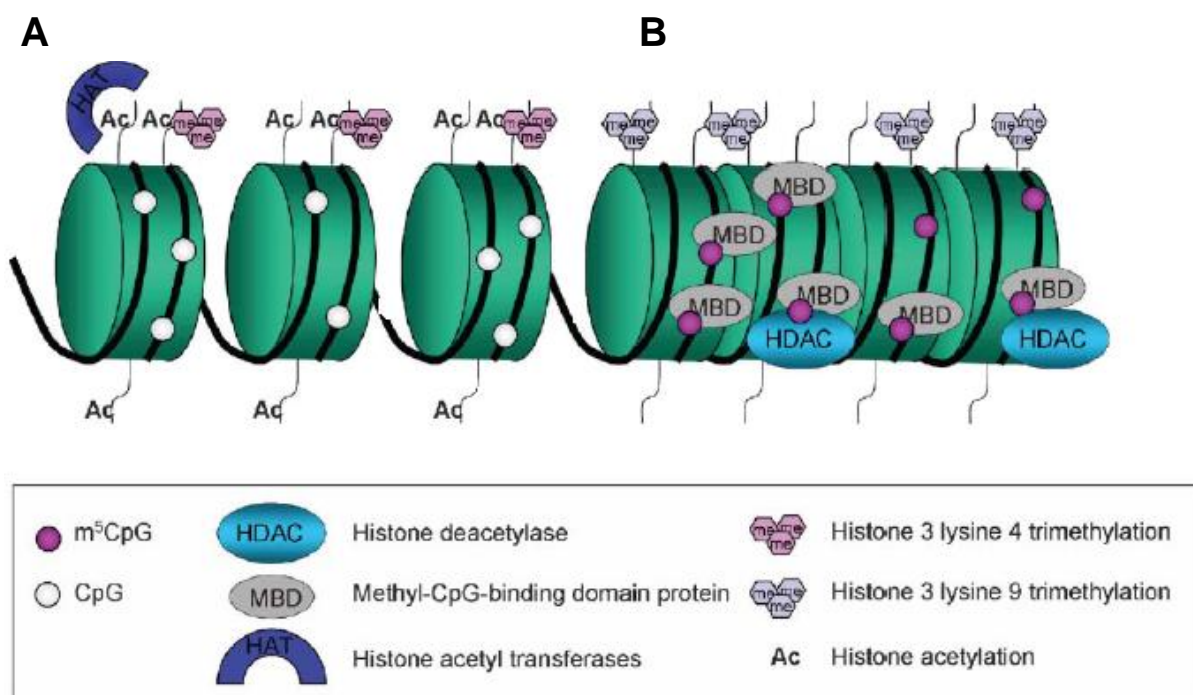


**Figura 5. Mecanismo de inibição da transcrição gênica através da metilação do DNA.**

Na figura 5A, CpGs não-metilados permitem a ligação do DNA a fatores de transcrição (TFs) favorecendo a transcrição gênica. Na figura 5B, a transcrição é comprometida pela metilação dos CpGs, que bloqueia a ligação dos TFs ao DNA. A figura 5C mostra o bloqueio da transcrição, através da afinidade do DNA metilado a proteínas de ligação Me-CpG, que também impedem a ligação de TFs aos promotores.

Fonte: ATTWOOD *et al.*, 2002

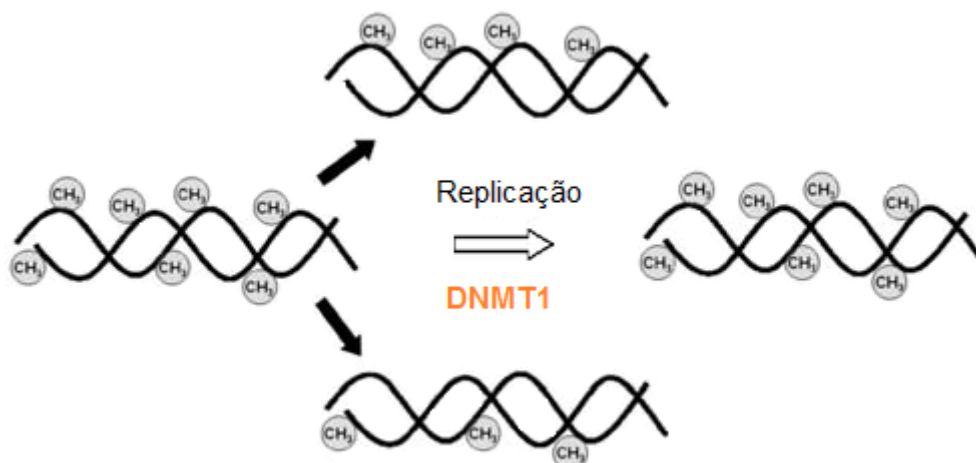




**Figura 6. Estrutura da cromatina ativa e inativa na região promotora do gene.** A) Cromatina ativa na transcrição é caracterizada por citosinas não-metiladas e histona terminal acetilada. Lisina 4 na histona H3 é tri-metilada. B) Quando as citosinas tornam-se metiladas, elas se ligam a domínios protéicos MBDs que atraem histonas deacetilases (HDACs), que removem grupos acetil da histona terminal. O DNA se enovela sob a forma de uma estrutura da cromatina 'fechada', carreando o marcador de silenciamento lisina 9 trimetilada da histona 3. Esse mecanismo compromete a transcrição gênica.  
Fonte: GRØNBAEK *et al.*, 2007

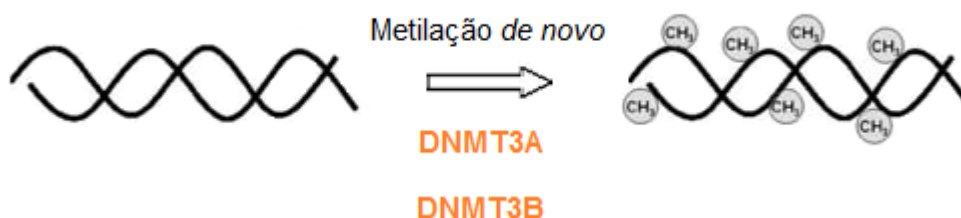
No mecanismo da metilação do DNA, três formas ativas de DNMTs foram identificadas em células de mamíferos, incluindo uma enzima de manutenção, a DNMT1, e duas enzimas que favorecem o processo da metilação *de novo*, destacando a DNMT3A e DNMT3B (HERMANN *et al.*, 2004). Embora tais enzimas atuem cooperativamente para estabelecer um padrão de metilação genômico, funções específicas são executadas pelas DNMTs. A metilação de manutenção, realizada pela DNMT1, ocorre, preferencialmente, pela adição de grupamentos metil a citosinas do DNA hemi-metilado, subsequente à replicação do DNA (Figura 7) (BESTOR, 2000; LUCZAK; JAGODZIŃSKI, 2006; ROBERT *et al.*, 2003). O processo

da metilação *de novo*, realizado pela DNMT3A e DNMT3B, ocorre pela metilação do DNA não-metilado e hemi-metilado, com igual eficiência (Figura 8) (HSIEH, 2000).



**Figura 7. Esquema da metilação de manutenção.** As duas fitas de DNA, inicialmente metiladas, dão origem a duas cópias hemimetiladas. A enzima DNMT1 favorece a adição do radical metil ( $\text{CH}_3$ ) ao DNA hemimetilado, subsequente à replicação, favorecendo a manutenção de um padrão inicial de metilação.

Fonte: LUCZAK; JAGODZINSKY, 2006.



**Figura 8. Esquema da metilação de novo.** As duas fitas de DNA não-metiladas dão origem a duas cópias não-metiladas. Durante a replicação, por exemplo, as enzimas DNMT3A e DNMT3B podem estabelecer um novo padrão de metilação, adicionando radicais metil ( $\text{CH}_3$ ) às fitas de DNA não-metiladas.

Fonte: LUCZAK; JAGODZINSKY, 2006

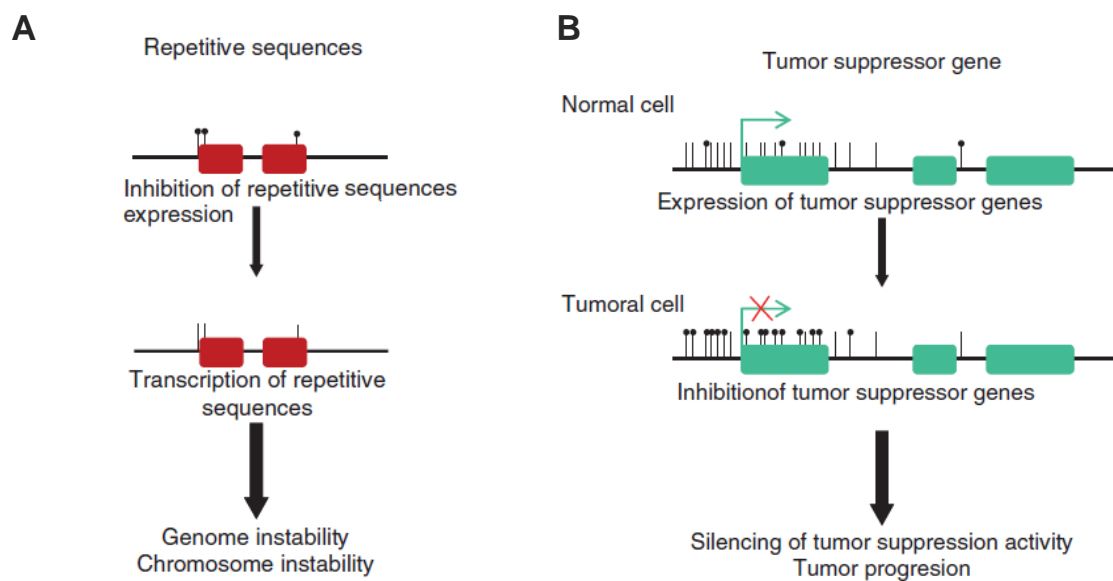
O processo que inicia a metilação *de novo* ainda não é claramente conhecido; entretanto, em plantas, é descrita uma relação com o mecanismo do RNA de interferência (siRNA), que pode ter como alvo a região promotora do gene e iniciar o processo de metilação das ilhas CpG (BIRD, 2002). No entanto, não foi identificado se um mecanismo similar ocorre em células de mamíferos.

Os fatores que influenciam a expressão das DNMTs em células humanas não são claramente determinados. Acredita-se que a idade pode alterar o padrão de metilação do DNA. Os mecanismos pelos quais este fator leva ao aumento ou redução da metilação do DNA não são bem esclarecidos. Não há um consenso sobre o real efeito da idade sobre a metilação (RICHARDSON, 2003; VERTINO *et al.*, 1994; XIAO *et al.*, 2003). Além disso, a idade, influenciada pela diminuição do consumo de folato na dieta e consumo de álcool, pode alterar a metilação. (KIM, 2004; RICHARDSON, 2003). Evidências mostraram uma importante associação entre tabagismo e metilação; esse processo pode estar associado à exposição a fatores carcinogênicos do tabaco (Al *et al.* 2003; HASEGAWA *et al.*, 2002).

Embora as modificações derivadas da metilação da citosina sejam pouco frequentes, elas podem ocasionar mutações (RAZIN, 1998). French *et al.* (2002) propuseram que modificações epigenéticas podem ser eventos iniciais na carcinogênese, enquanto as alterações genéticas podem ser consequência da ruptura de um estado epigenômico. Dessa forma, a metilação pode estar envolvida tanto na causa como na consequência do processo carcinogênico (FRENCH *et al.*, 2002). Além disso, a frequência de metilações ou mutações genéticas varia entre os genes. Essas variações podem resultar em diferentes tipos tumorais, além de exercerem importante influência no prognóstico (GOLUB *et al.*, 1999).

A metilação do DNA foi associada ao desenvolvimento de vários tipos de cânceres, incluindo o câncer de pulmão (HERMAN; BAYLIN, 2003; JONES; LAIRD, 1999), adenocarcinoma pulmonar (KIM *et al.*, 2001), carcinoma epidermóide de cavidade bucal (SHAW *et al.*, 2007) e carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CALMON *et al.*, 2007). Esse evento epigenético está intimamente relacionado à inativação transcricional de genes supressores de tumor (ESTELLER, 2002; HERMAN; BAYLIN, 2003; JONES; LAIRD, 1999). As neoplasias sofrem alterações paradoxais no padrão de metilação do DNA, podendo ser caracterizadas por uma perda global da metilação, que ocorre principalmente em regiões de DNA repetitivo, ou por um ganho de metilação em ilhas CpG na região promotora de genes supressores de tumor, como *p16*, *Rb* e *BRCA1* (ESTELLER, 2011) (Figura 9). Dessa forma, sugere-se que além da hipermetilação, a hipometilação também pode estar envolvida na carcinogênese através de um mecanismo de ativação indevida de oncogenes (AUERKARI, 2006) e, também, através da reativação de regiões de DNA repetitivo, altamente instáveis no genoma (SUBBALEKHA *et al.*, 2009).

Os microRNAs (miRNA) são pequenos RNAs não-codificantes que regulam a expressão de genes-alvo na fase pós-transcricional, atuando na degradação do RNA mensageiro ou inibição da tradução (GARTEL; KANDEL, 2006; ZHANG *et al.*, 2007). Estudos recentes têm mostrado que a repressão transcricional de miRNAs supressores de tumor através da hipermetilação parece ser uma característica presente em neoplasias. Dessa forma, a inativação epigenética de miRNAs supressores de tumor pode vir a ser utilizada como biomarcador de neoplasias e, também, um alvo potencial de tratamento da doença através de estratégias terapêuticas que promovam a ativação funcional de miRNAs supressores inativados pela metilação (MELO *et al.*, 2011).



**Figura 9. Padrão de metilação aberrante do DNA no câncer humano.**  
 A: Sequências de DNA repetitivo altamente metiladas tornam-se hipometiladas, podendo levar a instabilidades genômicas. B: Ilhas CpG não-metiladas em genes codificantes ou microRNAs supressores de tumor tornam-se hipermetilados e, portanto, silenciados em células neoplásicas.  
 Fonte: LOPEZ-SERRA; ESTELLER, 2011.

### 2.3.1 Metilação do DNA na patogênese do ameloblastoma

A pesquisa de eventos epigenéticos envolvendo a patogênese do ameloblastoma ou outros tumores odontogênicos é muito limitada. Somente alguns estudos investigaram o padrão de metilação do DNA nesses tumores, incluindo o ameloblastoma, tumor odontogênico queratocístico, tumor odontogênico adenomatóide, tumor odontogênico cístico calcificante e mixoma odontogênico (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2010; MOREIRA *et al.*, 2009a; MOREIRA *et al.*, 2009b, MOREIRA *et al.*, 2011).

Kitkumthorn e Mutirangura, em 2010, compararam diferenças nos níveis de metilação de retrotransposons *LINE-1* em ameloblastoma e tumor odontogênico queratocístico. Foi demonstrada uma redução significativa dos níveis de metilação de *LINE-1* no ameloblastoma (KITKUMTHORN; MUTIRANGURA, 2010). As sequências *LINE-1* são regiões amplamente distribuídas no genoma, ricas em dinucleotídeos CpG, portanto, passíveis de sofrer alterações no perfil de metilação (SCHULZ, 2006). Em vários tipos de câncer, a hipometilação de *LINE-1* é identificada especialmente em estágios tardios de progressão da neoplasia (DASKALOS *et al.*, 2009; PATTAMADILOK *et al.*, 2008; SUBBALEKHA *et al.*, 2009). Além disso, esses retrotransposons foram descritos como sequências importantes nos processos de tumorigênese, podendo levar a instabilidades genômicas, aumento de mutações, fragmentações no DNA e indução na diferenciação e proliferação celular (ORICCHIO *et al.*, 2007; ST LAURENT *et al.*, 2010). Dessa forma, a redução dos níveis de metilação de *LINE-1* pode ser um fator epigenético importante na patogênese do ameloblastoma (KITKUMTHORN, MUTIRANGURA, 2010).

A metilação de genes relacionados ao ciclo celular foi investigada em tumores odontogênicos. O ameloblastoma mostrou diferentes frequências de metilação para os genes *P16*, *P21*, *P27*, *TP53* e *RB1*. Os genes supressores de tumor *P16* e *P21* apresentaram maiores frequências do perfil metilado em relação aos demais. A metilação do gene *TP53* foi um evento pouco comum. Esses achados sugerem que a metilação de genes supressores de tumor, regulatórios do ciclo celular, pode contribuir para a tumorigênese de lesões odontogênicas (MOREIRA *et al.*, 2009a).

Considerando a metilação de MMPs no ameloblastoma, não há estudos na literatura relacionados à investigação do perfil de metilação de tais genes nesse tumor. Apesar de ser bem estabelecida a importância das metaloproteinases da matriz nos mecanismos de proliferação e invasividade das células do ameloblastoma (QIAN *et al.*, 2010; ZHANG *et al.*, 2010b; ZHOU *et al.*, 2010), é desconhecida a importância de eventos epigenéticos em MMPs na patogênese do ameloblastoma.

## 2.4 Perda de Heterozigosidade

Perda de heterozigosidade (LOH) refere-se a uma alteração genética caracterizada pela perda de um ou ambos os alelos parentais, presentes em células normais (NAKAMURA *et al.*, 2009). Ou ainda, a LOH pode ser entendida como uma mudança do estado de heterozigose no genoma normal para um estado de homozigose no genoma tumoral pareado (BEROUKHIM *et al.*, 2006). Este desequilíbrio alélico pode levar à ruptura dos mecanismos regulatórios e funções celulares, especialmente aqueles envolvidos no processo da carcinogênese (NAKAMURA *et al.*, 2009).

Células neoplásicas são geneticamente instáveis e susceptíveis a alterações cromossômicas. A LOH é um evento comumente identificado em células tumorais, podendo ser um dos mecanismos de inativação de genes supressores de tumor. Acredita-se que a LOH seja um evento frequente nos estágios iniciais da tumorigênese (PAN *et al.*, 2010), além disso, pode estar associada com a progressão do câncer (PLOUSSARD *et al.*, 2011; ZIKAN *et al.*, 2011)

A LOH pode ser decorrente de deleção, duplicação, amplificação, recombinação mitótica ou perda cromossômica. Tal alteração genética pode ser identificada através do estudo de marcadores microssatélites em regiões cromossômicas, analisados pela comparação dos alelos do DNA normal com o DNA tumoral. Marcadores microssatélites correspondem a regiões de DNA repetitivo, altamente polimórficos e, portanto, passíveis de sofrer erros durante a replicação do DNA (VAN HOUTEN *et al.*, 2000).

A LOH em um marcador microssatélite na região de um gene específico é uma alteração cromossômica importante, que pode desencadear alterações funcionais na



expressão gênica (HAWTHORN *et al.*, 2010; PALACIOS *et al.*, 2003; XIN *et al.*, 1999). Na década de 1970, foi proposto por Knudson, que alterações genéticas, como mutações, podem ser um dos passos importantes para a completa perda de um gene supressor de tumor. De acordo com esse modelo de supressão tumoral, conhecido como “Two-hit”, a inativação de um gene supressor de tumor requer alterações genéticas nos dois alelos (KNUDSON, 1971). Sabe-se, hoje, que dentre outras alterações, a LOH pode ser um evento relevante para a inativação de genes supressores de tumor. Dessa forma, segundo o Modelo de Knudson, um alelo poderia ser inativado por mutação, e o outro, por LOH (PAN *et al.*, 2010). No entanto, estudos contrapõem essa idéia, pontuando que a LOH é um evento que pode estar associado a um estado de haploinsuficiência gênica. Nesse contexto, a perda ou inativação de apenas um único alelo pode ser um fator importante para o comprometimento funcional de um gene supressor de tumor, podendo induzir ao câncer (BERGER *et al.*, 2011; WETMORE *et al.*, 2000; ZURAWEL *et al.*, 2000).

### 2.4.1 Perda de heterozigosidade no ameloblastoma e outros tumores odontogênicos

Diversos estudos têm buscado identificar os eventos moleculares responsáveis pelo desenvolvimento e progressão do ameloblastoma, destacando os de caráter genético e epigenético (BARRETO *et al.*, 2002; KITKUMTHORN, MUTIRANGURA, 2010; MIGALDI *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2008). No entanto, pouco se sabe sobre a influência de alterações cromossômicas na patogênese deste tumor. A LOH é um mecanismo que tem sido associado a várias neoplasias, incluindo as de natureza odontogênica (HAWTHORN *et al.*, 2010; MIGALDI *et al.*, 2008; UCHIDA *et al.*, 2011; XIN *et al.*, 1999).

Em tumores e cistos odontogênicos, como tumor odontogênico queratocístico, cisto odontogênico ortoqueratinizado, fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico, cisto dentígero, a LOH foi identificada em genes como o *L-myc*, *PTEN*, *FHIT*, *PTCH*, *TP53*, *p16* e locus do gene *Rb1* (AGARAM *et al.*, 2004; DINIZ *et al.*, 2011; GALVÃO *et al.*, 2012; LEVANAT *et al.*, 2000; MIGALDI *et al.*, 2008; NODIT *et al.*, 2004). Neoplasias malignas de natureza odontogênica como o carcinoma ameloblástico e o fibrossarcoma ameloblástico também apresentaram LOH com elevadas taxas de perdas alélicas (GALVÃO *et al.*, 2012; NODIT *et al.*, 2004).

A LOH na região cromossômica 9q22-31, em que o gene *PTCH1* foi mapeado, tem sido observada como um evento frequente no tumor odontogênico queratocístico síndrômico, embora a prevalência da alteração seja variável, de 16-75% aproximadamente (CHENEVIX-TRENCH *et al.*, 1993; DANAEE *et al.*, 2006; PAN *et al.*, 2010; VORECHOVSKÝ *et al.*, 1997).

A variante esporádica do tumor odontogênico queratocístico também apresentou maior frequência de LOH do supressor de tumor *FHIT* em relação ao cisto radicular e cisto dentífero, cuja prevalência foi quatro vezes maior (MALCIĆ *et al.*, 2008). No entanto, a prevalência de LOH nos diversos tumores odontogênicos não é bem estabelecida.

No ameloblastoma, em específico, há uma escassez de estudos na literatura sobre perdas alélicas em regiões cromossômicas. Nodit *et al.* (2004) estudaram a LOH em um painel de genes supressores de tumor, comparando subtipos de ameloblastoma e carcinoma ameloblástico. A LOH não foi associada com o tipo histológico, recorrência ou malignidade. Além disso, os genes *L-myc* e *PTEN* apresentaram maiores frequências de perda alélica, contrapondo ao *TP53*, cujas alterações alélicas foram menos frequentes (NODIT *et al.*, 2004).

LOH em genes da família *ING* parece ser uma alteração genética importante no ameloblastoma sólido. As proteínas dessa família são supressoras de tumor e interagem física e funcionalmente com o *TP53*, para atuar nos mecanismos de apoptose, reparo do DNA e regulação do ciclo celular. Uma relação significativa foi verificada entre LOH no locus do gene *ING5* e o tipo sólido do ameloblastoma. Além disso, notou-se uma tendência para maiores frequências de LOH nos casos recorrentes do tumor (BORKOSKY *et al.*, 2010).

Apesar da possível associação entre alteração microsatélite e transformação neoplásica, pouco se conhece sobre sua real influência no desenvolvimento do ameloblastoma. Migaldi *et al.* (2008) analisaram uma variedade de marcadores microsatélites relacionados a genes supressores de tumor e foi identificada uma maior frequência de LOH em tumores que apresentaram maior

índice de proliferação celular, além de ter sido um preditor de risco para a recorrência do ameloblastoma (MIGALDI *et al.*, 2008)

A LOH no *locus* do gene *PTCH* foi verificada em outras lesões odontogênicas, no entanto, no ameloblastoma, esse evento genético não foi ainda identificado nesse *locus*. Convém ressaltar que o *PTCH* é um gene importante nos mecanismos da odontogênese e, possivelmente, envolvido do desenvolvimento de tumores odontogênicos. Dessa forma, o estudo de alterações cromossômicas nesse gene no ameloblastoma é um alvo interessante de investigação.

## 2.5 Via de sinalização Hedgehog

A sinalização Hedgehog (HH) foi inicialmente investigada nos clássicos estudos de Eric Wieschaus e Christiane Nüsslein-Volhard (1980). Eles identificaram genes que controlam o padrão de segmentação em embriões de *Drosophila melanogaster* (mosca de fruta). A perda de função de um determinado gene conferiu um fenótipo mutante, que acarretou o desenvolvimento de embriões cobertos por dentículos lembrando um ouriço (do inglês: *hedgehog*). Esse gene veio a ser denominado *Hedgehog*, cujo nome intitulou a via de sinalização da qual é um dos componentes (NÜSSLEIN-VOLHARD; WIESCHAUS, 1980).

Em 1993, foram identificadas, em vertebrados, três formas parálogas do gene, denominadas *Sonic Hedgehog* (SHH), *Indian Hedgehog* (IHH) e *Desert Hedgehog* (DHH). O primeiro recebeu o nome do ouriço do videogame da Sega e, os demais, receberam o nome de espécies de ouriços, devido à semelhança dos embriões com esses animais (CHANG *et al.*, 1994; ECHELARD *et al.*, 1993; RIDDLE *et al.*, 1993). Os genes da família HH são altamente conservados durante a evolução e desempenham importante papel no desenvolvimento embrionário, proliferação e diferenciação celular (VARJOSALO; TAIPALE, 2008). O gene *HH* codifica uma proteína ligante, importante nos eventos iniciais da via de sinalização (STECCA; RUIZ I ALTABA, 2010).

Na *Drosophila melanogaster*, os eventos moleculares da via de sinalização HH são identificados na membrana celular. Em vertebrados, no entanto, a via HH é processada, fundamentalmente, no cílio primário da membrana, uma organela primitiva conservada durante a evolução. Uma questão central nessa via de sinalização é o seguinte questionamento em torno do cílio primário: como animais de

maior escala de evolução podem utilizar uma estrutura celular tão primitiva? Estudos recentes mostraram que, apesar da maioria dos componentes da via HH está localizada no cílio primário e exercer suas funções nessa estrutura, a regulação de algumas proteínas, como os fatores transcrição GLI pela proteína SUFU, ocorre independentemente dessa estrutura (CHEN *et al.*, 2009).

Os genes *PTC*, *SMO* e *GLI* também são componentes fundamentais nos mecanismos de transdução da via. O gene *PTC* da *Drosophila* codifica uma proteína transmembrana que atua como receptora para a proteína HH (STONE *et al.*, 1996). Dois homólogos desse gene foram identificados no peixe-zebra, camundongos e humanos: *PTCH1* e *PTCH2*. Em humanos, o *PTCH1* é o mais bem identificado e é classificado como um gene supressor de tumor. Encontra-se mapeado no cromossomo 9q22.3 e codifica uma glicoproteína constituída por 1500 aminoácidos. A sua estrutura molecular apresenta um domínio carboxi-terminal e amino-terminal localizados no meio intracelular, e uma estrutura extracelular em forma de *loop*, que serve como sítio de ligação para a proteína HH (HOOPER; SCOTT, 1989; MARIGO *et al.*, 1996). Estudos experimentais demonstraram que o *PTCH1* exerce função importante no sequestro e transdução de HH (Chen; Struhl, 1996). PTCH interage bioquimicamente com a proteína HH e transduz sinais para outras proteínas após sua ativação (RUIZ-GÓMEZ *et al.*, 2007).

Outro componente da via é o gene Smoothened (*SMO*), que codifica uma proteína do mesmo nome. Esta proteína é do tipo receptor acoplado à proteína G (RUIZ-GÓMEZ *et al.*, 2007). É responsável por intermediar a sinalização HH no interior da célula (TAIPALE *et al.*, 2002). A proteína *SMO* encontra-se no cílio primário da membrana e possui um mecanismo dinâmico, podendo estar localizada na membrana do cílio ou internalizada no interior de vesículas endocíticas,

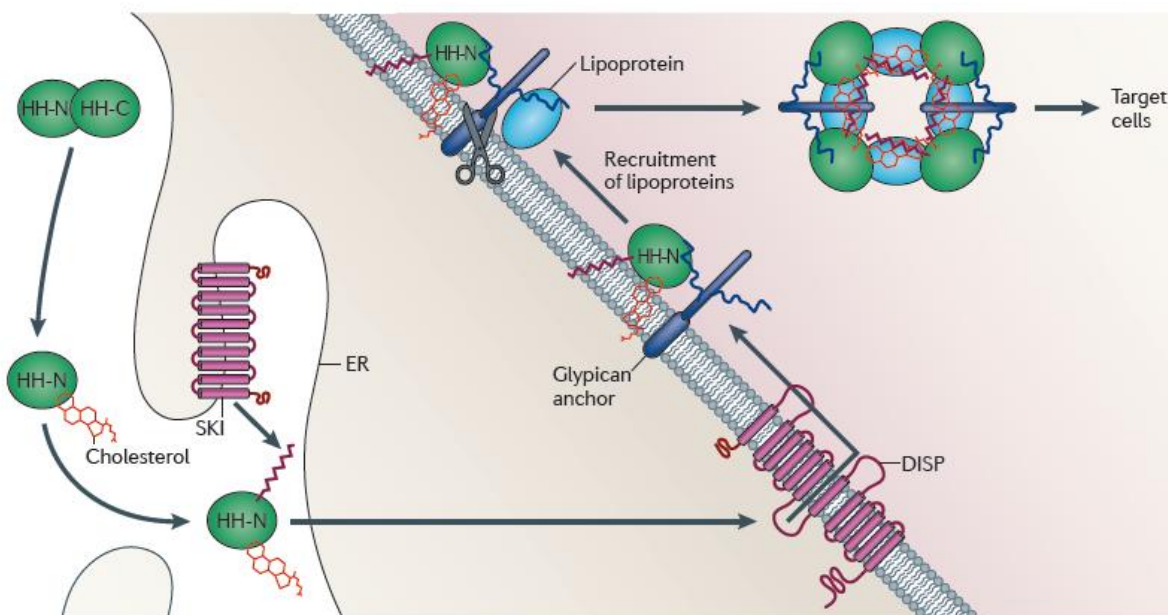
dependendo do seu estado de ativação (KIM *et al.*, 2009; ROHATGI *et al.*, 2009). Esta proteína apresenta-se sob três diferentes estados: uma forma inativa, internalizada em vesículas endocíticas (SmoA), que co-existe em equilíbrio com uma outra forma inativa, que se encontra ligada ao cílio (SmoB), e uma forma ativa (SmoC), gerada a partir de SmoB, disposta na membrana do cílio (KIM *et al.*, 2009; ROHATGI *et al.*, 2009).

Fatores de transcrição da família GLI são efetores-chave da sinalização HH. Os genes que codificam as proteínas GLI são encontrados nos metazoários mais primitivos (HERETSCH *et al.*, 2010). A *D. melanogaster* codifica apenas uma única proteína dessa família - uma proteína “zing finger” sintetizada pelo gene *cubitus interruptus* (*ci*) (ALEXANDRE *et al.*, 1996). Em humanos, três homólogos são descritos, *GLI1*, *GLI2* e *GLI3*. De maneira geral, tais fatores de transcrição são bifuncionais; podem ativar ou inibir a transcrição através da ligação da proteína a genes específicos, e pela interação com complexos de transcrição. Um delicado equilíbrio entre as formas Gli ativadoras e repressoras parece ser o principal determinante do grau de resposta da via sinalização HH (CHEN *et al.*, 2009).

Em sua estrutura molecular, os fatores de transcrição possuem um domínio repressor amino-terminal e um domínio ativador carboxi-terminal flanqueando um domínio central “zinc finger”, que favorece sua ligação a sequências consenso em genes alvo para iniciar ou reprimir a transcrição (SASAKI *et al.*, 1997). Entretanto, na proteína GLI1 o domínio repressor está ausente. Dessa forma, na via de sinalização HH, GLI1 age como um ativador transcricional crítico, GLI2 pode atuar como ativador ou repressor, e GLI3, como potencial repressor da transcrição, apesar de ser um ativador fraco da via (STECICA; RUIZ I ALTABA, 2010).

A sinalização HH tem como foco inicial a ligação da proteína HH ao seu receptor transmembrana, a proteína PTCH1, em células-alvo. Inicialmente, HH sofre um processo de maturação em sua estrutura molecular; ainda no retículo endoplasmático, ocorre um processo de auto-clivagem, promovido pelo domínio carboxi-terminal (CHEN *et al.*, 2011). Em seguida, o domínio amino-terminal é covalentemente acoplado a uma molécula de colesterol e palmitoil em suas extremidades C-terminal e N-terminal, respectivamente (KOONIN, 1995). Acredita-se que esta modificação lipídica seja importante na interação com a membrana plasmática durante o transporte do ribossomo para o meio extracelular (PETERES *et al.*, 2004). A secreção de HH requer a atividade da proteína Dispatched (DISP) (BURKE *et al.*, 1999), que provavelmente transporta HH através da membrana plasmática. No meio extracelular, HH se associa a lipoproteínas e a algumas frações de proteínas de ancoragem da membrana (Figura 10). Uma vez sofrido esse processo de maturação, a proteína HH é sequestrada pelo *PTCH* em células-alvo (BURKE *et al.*, 1999). Nesse contexto, a ativação da via HH leva à superexpressão de PTCH, que por sua vez aumenta o sequestro de HH. Após atingir certos níveis de expressão, o PTCH realiza um mecanismo de *feedback* negativo, regulando negativamente sua própria transcrição (GOODRICH *et al.*, 1996). Além do PTCH, há outras proteínas reguladoras de HH que podem aumentar ou reduzir a ligação de HH ao PTCH. A proteína Hhip é um regulador negativo que compete com o PTCH. Imunoglobulinas, proteínas contendo repetições de fibronectina como Cdo e Boc, bem como a proteína de ancoragem Gas1 podem regular HH positivamente, favorecendo o aumento da ligação de HH ao PTCH (HERETSCH *et al.*, 2010).





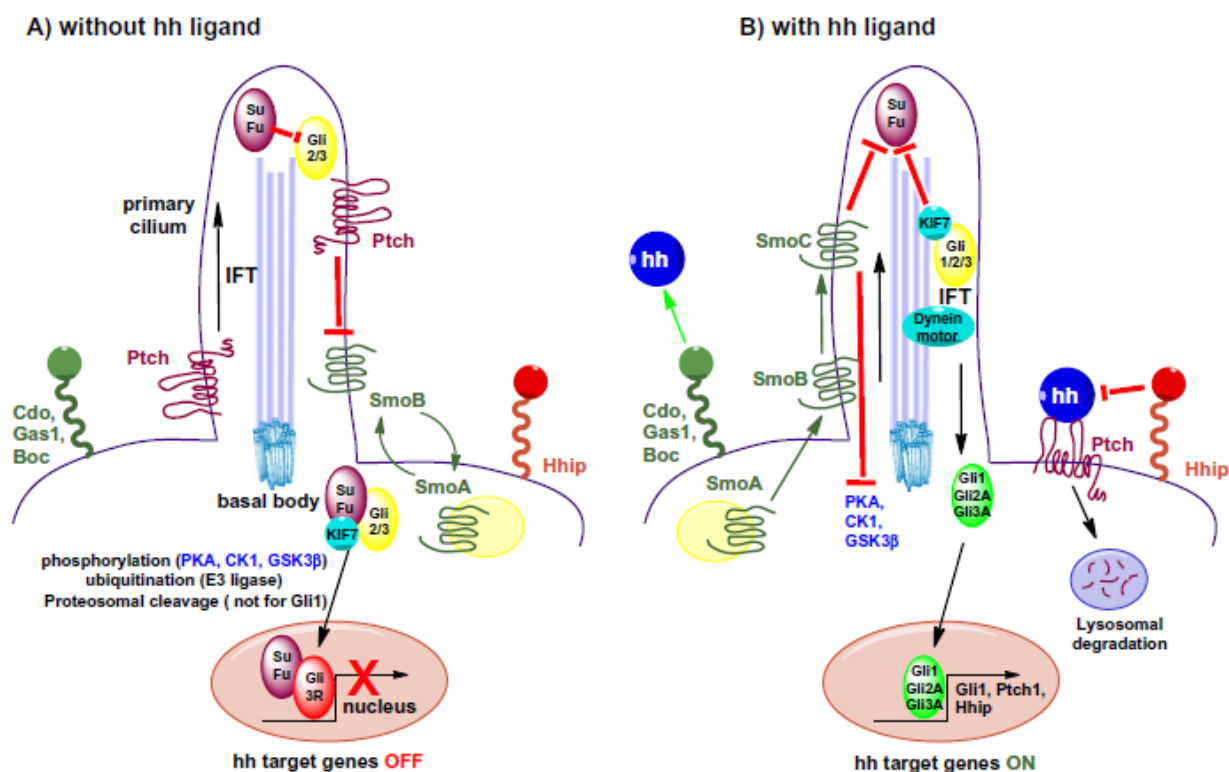
**Figura 10. Modificação lipídica e secreção da proteína Hedgehog.** No retículo endoplasmático, a proteína Hedgehog (HH) sofre um processo de auto-clivagem e modificação bi-lipídica. Em sua fração N-terminal ocorre a adição das moléculas de colesterol e palmitoil em suas extremidades C-terminal e N-terminal, respectivamente. HH é, então, transportada para o meio extracelular, onde se associa a lipoproteínas e a algumas frações de proteínas de ancoragem da membrana.  
Fonte: INGHAM *et al.*, 2011.

Quando a via está inativa, a proteína HH não se encontra ligada ao seu receptor PTCH1, que atua favorecendo a inibição catalítica de Smo (TAIPALE *et al.*, 2002). PTCH1 encontra-se disposto na base do cílio primário (ROHATGI *et al.*, 2007). Geralmente, Smo não está associada ao cílio, pois o complexo IFT, responsável pelo transporte intraflagelar, impede o deslocamento de Smo no cílio (CORBIT *et al.*, 2005). Na base do cílio primário, PTCH1 inibe a ativação de SmoB em SmoC por um mecanismo pouco conhecido (ROHATGI; SCOTT, 2007). Na ausência da forma ativa de Smo, fatores de transcrição latentes da família GLI, em um complexo com a proteína SUFU, são proteossomicamente processados. Na sequência de eventos, as formas GLI2/GLI3 sofrem os mecanismos de fosforilação e ubiquitinação, o que resulta em uma degradação proteossômica parcial para formar GLI3-R, ou a completa degradação de GLI2 (PAN *et al.*, 2006; WANG *et al.*, 2000).

GLI3-R é transportada para o interior do núcleo e inibe a transcrição de genes-alvo da via HH (HAYCRAFT *et al.*, 2005; LIU *et al.*, 2005). Gli1 está sempre funcional, ativando a transcrição dos próprios genes componentes da via HH para a manutenção da funcionalidade da sinalização. No entanto, a transcrição do repressor GLI3-R é predominante, quando a via está inativa. Supressor de fused (SUFU) também atua nesse mecanismo, agindo como um regulador negativo da via através da ligação ao GLI nuclear e citoplasmático, inibindo assim, a ativação dos genes alvos da via HH (DING *et al.*, 1999) (Figura 11).

Quando a via HH está ativa, a proteína HH liga-se ao PTCH1. Este acaba perdendo sua função supressora de tumor, uma vez que a ligação HH-PTCH1 favorece a internalização de PTCH1 em vesículas e a degradação lisossômica da proteína. Na ausência de PTCH1, SmoC ativa é gerada no cílio primário, onde inibe proteínas que fosforilam as formas GLI-repressoras. GLI2 e GLI3 são, então, processados para sua forma ativa GLI2/GLI3-A e transportadas para o núcleo, onde, juntamente com GLI1 exercem sua função ativadora da transcrição de genes alvo da via HH (HERETSCH *et al.*, 2010) (Figura 11).

Os alvos da via de sinalização HH incluem genes relacionados aos processos de proliferação celular. Dessa forma, esta via exerce função importante nos mecanismos de embriogênese, diferenciação celular e morfogênese de órgãos e tecidos. Estudos mostraram um papel relevante da sinalização HH nas fases da odontogênese, coordenando, inclusive, a fase inicial de invaginação do epitélio oral no tecido embrionário subjacente (HADCASTLE *et al.* 1998). Além disso, a supressão de HH no epitélio odontogênico provocou retardo de desenvolvimento do dente, interrupção de sua morfogênese e levou, ainda, a uma alteração na disposição do dente na mandíbula (DASSULE *et al.*, 2000).



**Figura 11. Mecanismo de sinalização da via Hedgehog.** (A) Na ausência do ligante HH, PTCH localiza-se no cílio primário, onde inibe a formação de SmoC ativo. Sem o SmoC, os fatores de transcrição Gli2/3 passam por eventos de clivagem proteossômica gerando uma forma repressora truncada de GLI (Gli3 para Gli3-R) ou pode ocorrer a completa degradação de GLI2. Gli3-R é transportada para o núcleo da célula, inibindo a transcrição de genes alvo da via HH. GLI-1 é sempre ativa a transcrição dos próprios componentes da via. (B) Na presença do ligante HH, este se liga ao PTCH, que é inibido pela internalização e degradação lisossômica. A ligação HH-PTCH pode ser inibida por Hhip. Sem o PTCH, SmoC é formado na membrana do cílio, o que favorece o processamento de GLI2/3 para suas formas ativas (Gli2/3-A). Tais formas são, então, transportadas para o núcleo, onde ativam a transcrição de genes alvos da via de sinalização.

Fonte: HERETSCH *et al.*, 2010.

O entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na sinalização HH é fundamental para a compreensão tanto do envolvimento da via nos processos fisiológicos de desenvolvimento embrionário, como em condições patológicas, como anomalias congênitas e neoplasias, originadas de uma desregulação da sinalização HH.

A superatividade da via causada por mutação ou superexpressão de algum dos componentes é uma alteração molecular identificada em diversos tumores, como no carcinoma basocelular, gliomas, câncer de pulmão, próstata e pâncreas (DAHMANE *et al.*, 1997; RAFFEL *et al.*, 1997; SANCHEZ *et al.*, 2004; THAYER *et al.*, 2003; WATKINS *et al.*, 2003).

Diversos mecanismos de desregulação da via HH podem ser importantes para a patogênese do câncer. Mutações ativantes de *SMO* ou inativas do gene *PTCH1*, além da LOH do gene *PTCH1* podem levar à ativação exacerbada da via mesmo na ausência do ligante, especialmente em neoplasias associadas à síndrome de Gorlin (PAN *et al.*, 2010). Em linhagem de célula de câncer de colo uterino, foi demonstrado que a ativação da via HH pode ocorrer de maneira autócrina, dependente da ligação da proteína HH ao seu receptor (VARNAT *et al.*, 2009). A ativação parácrina também pode ser um modo de ativação da via; células tumorais podem secretar o ligante no estroma, cujas células respondem, indiretamente, gerando um microambiente favorável ao crescimento do tumor. Um exemplo desse mecanismo de ativação aberrante seria a estimulação parácrina de células no estroma, próximo às células neoplásicas, como células endoteliais, fibroblastos e células do sistema imune. Nesse contexto, o ligante HH produzido pelas células tumorais pode favorecer a angiogênese tumoral e a síntese de metaloproteinases para a degradação da matriz colágena circundante ao tumor (CURRAN; NG, 2008). É descrita, ainda, uma superestimulação da via HH, através de um modo parácrino reverso, em que o ligante HH, que se liga ao PTCH nas células tumorais, é secretado pelas células do estroma (YAUCH *et al.*, 2008). Dessa forma, diversos são os mecanismos de desregulação da sinalização HH que podem estar associados a neoplasias. No entanto, tais mecanismos necessitam ser mais

bem elucidados, podendo, futuramente, ser alvo para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas de doenças relacionadas à desregulação funcional da via HH, especialmente no ameloblastoma e outros tumores odontogênicos.

### 2.5.1 Via de sinalização Hedgehog no ameloblastoma e outros tumores odontogênicos

A via de sinalização HH exerce um papel crucial na odontogênese, favorecendo o desenvolvimento das estruturas dos dentes (Dassule *et al.*, 2000; Hardcastle *et al.*, 1998; Takahashi *et al.*, 2007). Estudos demonstraram que alterações na via HH podem estar presentes em cistos e tumores odontogênicos, sendo essas lesões provenientes dos mesmos tecidos componentes da histogênese dental (BARNES *et al.*, 2005; BARRETO *et al.*, 2002; PAVELIĆ *et al.*, 2001; VERED *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2006).

Alterações no gene *PTCH* tem sido foco de estudo para exercer uma função na patogênese do ameloblastoma e de outros tumores odontogênicos (BARRETO *et al.*, 2000; GOMES; GOMEZ, 2011; LEVANAT *et al.*, 1996; MIGALDI *et al.*, 2008;).

A literatura tem mostrado um papel importante da via HH na patogênese do tumor odontogênico queratocístico. Em um estudo de Levanat *et al.* (1996) foi demonstrada perda alélica na região cromossômica do gene *PTCH1* no tumor odontogênico queratocístico; nessa época a lesão ainda era classificada pela OMS como um cisto odontogênico (LEVANAT *et al.*, 1996). Além da LOH, mutação do *PTCH1* foi identificada em indivíduos portadores do tumor odontogênico queratocístico associado à síndrome de Gorlin (LENCH *et al.*, 1996). Barreto *et al.* (2000) demonstraram que a forma esporádica desse tumor também apresenta mutação nesse gene (BARRETO *et al.*, 2000). Dessa forma, esses estudos ressaltaram a importância da via de sinalização HH na patogênese do tumor e vieram contribuir para um melhor entendimento da patogênese do tumor odontogênico queratocístico.

Inicialmente, acreditou-se que alterações genéticas no *PTCH* eram específicas do tumor odontogênico queratocístico (BARRETO *et al.*, 2000; DINIZ *et al.*, 2009). No entanto, alterações cromossômicas neste gene foram identificadas no tumor odontogênico ortoqueratinizado (DINIZ *et al.*, 2011), tumor odontogênico epitelial calcificante (PEACOCK *et al.*, 2010) e cisto dentígero (LEVANAT *et al.*, 2000; PAVELIC´ *et al.*, 2001). Dessa forma, sugere-se que alterações funcionais do *PTCH1* não são exclusivas da patogênese do tumor odontogênico queratocístico (GOMES; GOMEZ, 2011).

Apesar de mutação inativante no *PTCH1* ter sido identificada no tumor odontogênico queratocístico, a expressão da proteína é uma característica marcante neste tumor. Foi sugerido que essa alteração genética nem sempre resulta em baixos níveis da proteína (BARRETO *et al.*, 2000). Um aspecto interessante do envolvimento desse gene na patogênese de tumores é a perda de sua capacidade de autorregulação. Uma vez mutado, um transcrito aberrante do *PTCH1* torna-se superexpresso, levando ao acúmulo da proteína mutada devido à perda do mecanismo *feedback* negativo do gene (GAILANI *et al.*, 1996; UNDÉN *et al.*, 1997).

Além de mutações do gene *PTCH1* em tumores odontogênicos, outras alterações em genes da via HH podem estar presentes nessas lesões. A haploinsuficiência no tumor odontogênico queratocístico e no carcinoma de nevóide basocelular pode estar implicada com a inativação do gene *PTCH1* (GOMES *et al.*, 2009; PAN *et al.*, 2010). A LOH na região cromossômica do *PTCH1* é uma alteração identificada no tumor odontogênico queratocístico, cisto odontogênico ortoqueratinizado e no cisto dentígero. No entanto, no ameloblastoma, não há estudos relacionando perdas alélicas em genes da via HH.

Estudos têm sugerido o envolvimento da sinalização HH no ameloblastoma, demonstrado especialmente pela expressão das proteínas SHH, PTCH, SMO e GLI (KUMAMOTO *et al.*, 2004; VERED *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2006). Além do ameloblastoma, o tumor odontogênico epitelial calcificante, ameloblastoma maligno e tumores odontogênicos mistos apresentaram imunopositividade similar dessas proteínas. No entanto, em tumores odontogênicos de origem mesenquimal, como mixoma e fibroma odontogênico, nenhuma proteína mostrou-se expressa (ZHANG *et al.*, 2006).

Apesar dos estudos sugerirem a ativação da via HH no ameloblastoma, observa-se um conhecimento ainda limitado a respeito de alterações nos genes envolvidos na via de sinalização nesse tumor (KUMAMOTO *et al.*, 2004; VERED *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2006). Dessa forma, faz-se necessária a realização de estudos que busquem elucidar o real significado da via HH no desenvolvimento de tumores odontogênicos.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo Geral

Identificar eventos epigenéticos e genéticos no ameloblastoma, com um enfoque na metilação e transcrição de metaloproteinases da matriz e perda de heterozigosidade do gene *PTCH*.

#### 3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Investigar o perfil de metilação das metaloproteinases *MMP-2* e *MMP-9* no ameloblastoma em relação a tecidos fisiológicos.

3.2.2 Verificar uma possível associação entre o padrão de metilação das metaloproteinases *MMP-2* e *MMP-9* com os níveis de transcrição e a expressão da proteína no ameloblastoma.

3.2.3 Investigar a presença de perda de heterozigosidade na região cromossômica do gene *PTCH* e sua possível relação com a ativação da via através da análise de transcrição dos genes *GLI-1*, *GLI-2* e expressão da proteína *PTCH*.

## **4 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 Considerações éticas**

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (Anexo I), obedecendo à resolução brasileira do Conselho Nacional de Saúde CNS nº 196/96, que dispõe sobre as Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

### **4.2 Desenho do estudo**

O presente trabalho trata-se de um estudo transversal.

O universo de estudo envolveu indivíduos assistidos na Clínica de Semiologia e Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFMG, com o diagnóstico de ameloblastoma, segundo os critérios estabelecidos pela OMS (BARNES *et al.*, 2005). As questões éticas foram obedecidas; o paciente e/ou responsável foram esclarecidos sobre os objetivos da pesquisa e solicitada, então, a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), específico de acordo com a idade (Apêndices I.A a I.F). Aqueles que recusaram participar não foram incluídos na pesquisa.

Assim, o grupo de estudo foi uma amostra de conveniência composta por 12 indivíduos portadores de ameloblastoma. A faixa etária foi variável, entre 08 e 50 anos (Tabela 1). Como grupo de comparação, foram utilizadas 12 amostras de folículos pericoronários e 12 fragmentos de gengiva, sem evidência de quaisquer alterações inflamatórias clinicamente identificadas. Essas amostras foram obtidas

durante cirurgia de dentes inclusos de indivíduos com idade superior a 18 anos, contando, também, com a concordância do paciente e assinatura do TCLE. As informações clínicas e anatomopatológicas pertinentes (idade, gênero, localização da lesão, tipo histológico e recorrência) foram obtidas à partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia - UFMG.

Tabela 1. Dados clínico-patológicos dos indivíduos portadores de ameloblastoma incluídos no estudo

<b>Ameloblastoma</b>	<b>Gênero</b>	<b>Idade</b>	<b>Classificação</b>	<b>Localização</b>	<b>Tipo histológico</b>	<b>Tipo de lesão</b>
Caso 1	Feminino	40	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 2	Masculino	25	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Recorrente
Caso 3	Feminino	51	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 4	Feminino	33	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 5	Feminino	37	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 6	Feminino	12	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 7	Masculino	50	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 8	Feminino	39	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 9	Feminino	19	Unicístico	Mandíbula	Unicístico	Primitiva
Caso10	Masculino	28	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 11	Masculino	08	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva
Caso 12	Masculino	37	Sólido/multicístico	Mandíbula	Folicular	Primitiva

Além dos aspectos clínico-patológicos, o estudo envolveu a análise dos seguintes parâmetros moleculares:

1. Perda de heteroziguidade no *locus* cromossômico do gene *PTCH*,
2. Expressão de genes e proteína relacionados à via de sinalização HH, incluindo os genes *GLI-1* e *GLI-2* e a proteína *PTCH*.
3. Análise do padrão de metilação dos genes *MMP-2* e *MMP-9*,
4. Análise dos níveis de transcrição e identificação das proteínas *MMP-2* e *MMP-9*.

É importante ressaltar, que as análises moleculares foram segmentadas em dois estudos distintos. No primeiro estudo, intitulado “Perda de heteroziguidade do gene *PTCH*”, os procedimentos experimentais foram os seguintes: análise da perda de heteroziguidade no *locus* cromossômico do gene *PTCH*, análise da transcrição de *GLI-1*, *GLI-2* e da proteína *PTCH*. No segundo estudo, “Regulação epigenética da expressão de metaloproteinases da matriz no ameloblastoma”, foram avaliados o padrão de metilação dos genes *MMP-2* e *MMP-9*, os níveis de transcrição de tais genes e a identificação das proteínas *MMP-2* e *MMP-9*.

Para as análises moleculares, inicialmente, procedeu-se à extração de DNA, RNA e proteína. Para isso, foram utilizadas amostras de tecido biológico acondicionadas em blocos de parafina e, também, congeladas em nitrogênio. Todas as amostras de ameloblastoma foram coletadas em formaldeído 10%, processadas e incluídas em parafina, para realização de diagnóstico. Esse material foi utilizado para extração de DNA. Apenas as amostras de ameloblastoma de maiores tamanhos foram congeladas em RNAHolder<sup>®</sup> (BioAgency Biotecnologia, SP, Brasil)

e, também, em solução contendo cálcio (BioAgency Biotecnologia, SP, Brasil) destinadas à extração de RNA e proteína, respectivamente.

A seguir, encontram-se descritos os procedimentos experimentais realizados em cada análise.

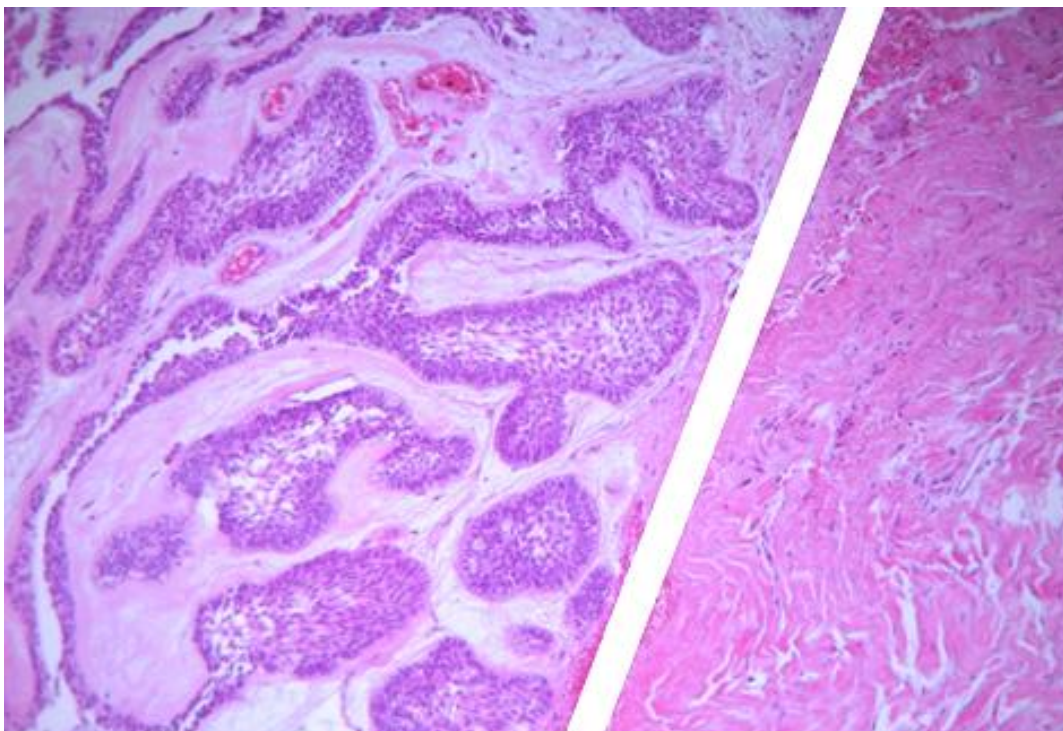
### **4.3 Procedimentos experimentais**

#### **4.3.1 Extração de DNA**

O DNA genômico foi isolado de amostras parafinadas utilizando o kit Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), segundo as instruções do fabricante. De maneira geral, o método se baseia na desparafinização do tecido, seguida pela digestão com proteinase K, sucessivas lavagens e eluição em tampão específico.

Vale ressaltar que, para análise da LOH, os blocos de ameloblastoma foram microdissecados manualmente, com o objetivo de isolar áreas de ameloblastoma contendo epitélio odontogênico neoplásico, e áreas de tecido conjuntivo não-neoplásico (Figura 12). Em seguida, foi realizada a extração de DNA proveniente das áreas distintas.

O DNA foi quantificado e sua integridade verificada através de reação em cadeia da polimerase (PCR) com primers específicos para o gene da  $\beta$ -globina (F: 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' e R: 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3') sob as seguintes condições térmicas: 94°C por 2 min seguido de 35 ciclos de 94°C por 45s, 56°C por 30s, 72°C por 30s e extensão final por 7 min.



**Figura 12. Representação da microdissecção manual em um corte histológico de ameloblastoma.** Na lâmina colorada em HE, é feita a delimitação da área de epitélio odontogênico e de estroma. Em seguida, a lâmina é sobreposta ao bloco de parafina e é realizada a delimitação das áreas. Em seguida, no bloco de parafina contendo o tecido, faz-se a separação manual do epitélio odontogênico e do conjuntivo, para posterior extração do DNA de ambas as regiões.

#### 4.3.2 Extração de proteína

O extrato protéico foi extraído de fragmentos de ameloblastoma congelados em nitrogênio. Tal procedimento não foi realizado nas amostras de folículo pericoronário e gengiva normal devido à escassez de tecido.

As amostras foram descongeladas e maceradas em 1,0 ml de tampão de extração (100 mM Tris-HCl, pH 7,6, 200 mM NaCl, 100 mM CaCl<sub>2</sub> e 1% Triton X-100) a 4°C. Em seguida, o conteúdo foi centrifugado durante 20 min., a 15.000 g em centrífuga refrigerada a 4 °C. O sobrenadante foi coletado e transferido para outro

tubo plástico de 1,5 ml. A concentração da proteína foi quantificada pelo método de Bradford (BRADFORD, 1976). Aproximadamente 15 µg de extrato de proteína foi utilizado no ensaio de zimografia, para a identificação das metaloproteinases MMP-2 e MMP-9.

#### **4.3.3 Extração de RNA**

O RNA total foi isolado de amostras de tecido congelado, utilizando o reagente TRIZOL<sup>®</sup> (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA) de acordo com a especificação do fabricante. As amostras de RNA foram quantificadas por espectrofotometria e a pureza considerada foi de 1,8 a 2,0 (leitura 260/280). A integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo a solução reveladora Gelred, sensível à luz ultravioleta (Biotium, Hayward, CA). Foram identificadas duas bandas distintas representando o RNA ribossomal (28S e 18S), confirmando a integridade do RNA (Apêndice II).

#### **4.3.4 Análise da metilação dos genes *MMP-2* e *MMP-9***

A metilação dos genes *MMP-2* e *MMP-9* foi avaliada através da técnica MSP-PCR e análise de metilação através de sítios de restrição, respectivamente. A primeira se baseia na análise da metilação de regiões ricas em dinucleotídeos CG (ilhas CpG), onde primers específicos se anelam. Nessa técnica, faz-se necessário o tratamento do DNA com o bissulfito de sódio. As citosinas não-metiladas são convertidas em uracila, em uma reação de deaminação; as citosinas metiladas são resistentes a esta modificação. De maneira geral, o DNA é desnaturado, modificado

pelo bissulfito de sódio, seguida pela amplificação por PCR, utilizando dois pares de primers, um específico para o DNA metilado, e outro para o DNA não metilado (GOLDENBERG *et al.*, 2004). A segunda técnica está fundamentada na presença de sítios de restrição contendo dinucleotídeos CG e na utilização de enzimas de restrição sensíveis à metilação. A enzima de restrição cliva o DNA em sítios de restrição contendo CGs não-metilados; os sítios que possuem CGs metilados são resistentes à ação da enzima. Sugere-se que a MSP-PCR seja utilizada para regiões com maior número de CG em sequência, e análise da metilação por sítios de restrição, para uma análise mais específica de dinucleotídeos CG esparsos na região promotora de um gene (ROACH *et al.*, 2005). O software *MethPrimer*<sup>®</sup> foi utilizado para identificar a presença de ilhas CpG e dinucleotídeos CpG esparsos nos genes estudados (LI; DAHIYA, 2002) (Figura 13).

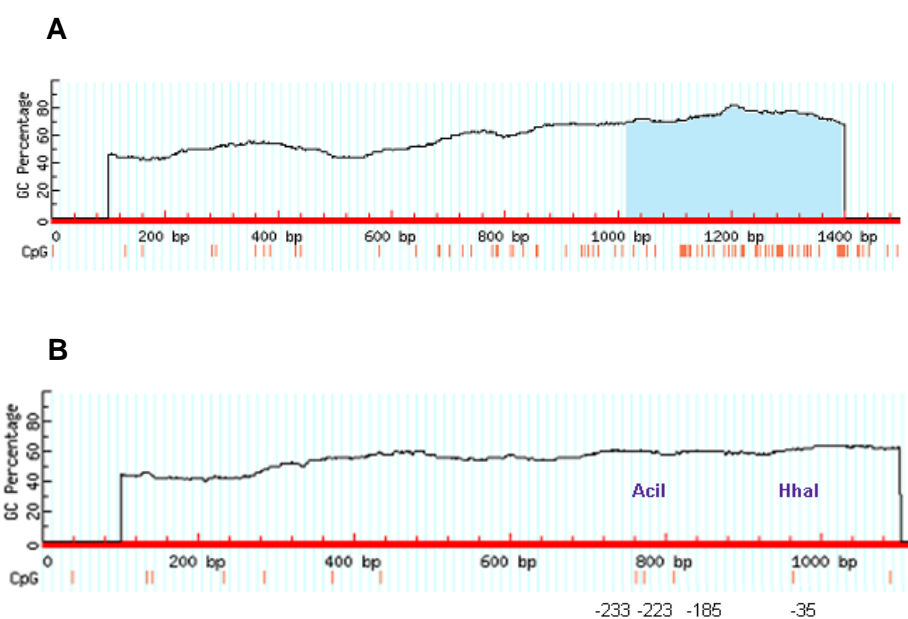
Para avaliar a metilação da ilha CpG na região promotora do gene *MMP-2*, o DNA genômico extraído das amostras parafinadas foram tratadas pelo bissulfito de sódio como previamente descrito (GOLDENBERG *et al.*, 2004). Após esse tratamento, verificou-se a viabilidades do DNA através da amplificação de um fragmento do gene  $\beta$ -actina (NM 001101), utilizando os seguintes primers F: 5'-TG GTGATGGAGGAGGTTTAGTAAGT-3' e R: 5'-AACCAATAAAACCTACTCCTCCCTTAA-3'. Estes foram desenhados para este gene pós-tratamento *in silico* com bissulfito de sódio, no software *Methprimer* (LI; DAHIYA, 2002).

Em seguida, o DNA tratado pelo bissulfito foi amplificado com primers específicos para a reação do DNA metilado e reação do DNA não-metilado (Apêndice III).

A análise da metilação do gene *MMP-9* foi realizada através do estudo de CGs em sítios de restrição na região promotora, próximos ao início da transcrição.



Optou-se por essa técnica, pois o gene não apresenta ilha CpG na região promotora, possuindo apenas CGs esparsos (ROACH *et al.*, 2005). Foram escolhidos os CGs localizados nas posições -35, -185, -223, -233 por estarem mais próximos do início da transcrição, de acordo com o estudo da sequência em banco de dados do NCBI. Foram utilizadas as enzimas de restrição HhaI e AclI, segundo o protocolo do fabricante (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). A análise de um *site* de bioinformática (<http://www.restrictionmapper.org>) mostrou que a primeira enzima HhaI cliva o sítio de restrição contendo o CG -35, e os demais sítios são clivados pela AclI. Nessa técnica o DNA genômico é, inicialmente, submetido à digestão enzimática e, em seguida, amplificado, utilizando primers que flanqueiam a região de interesse para análise da metilação (LIU; MAEKAWA, 2003). 200 ng de DNA genômico, não-tratado pelo bissulfito, foi digerido separadamente com cada uma das enzimas, segundo o protocolo do fabricante (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). Em seguida, o produto de digestão foi amplificado com primers específicos para o gene *MMP-9*, flanqueando a região dos quatro sítios de restrição (Apêndice III). Os CGs metilados produzem produto de PCR equivalente ao controle positivo metilado (DNA de placenta), ao passo que a clivagem dos CGs não-metilados leva à fragmentação do DNA, e a banda não é identificada no gel. Como controle positivo para o DNA não-metilado foi utilizada uma amostra de DNA humano não-metilado (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).



**Figura 13. Representação esquemática de ilha CpG e dinucleotídeos CG nos genes *MMP-2* e *MMP-9*, respectivamente.** A: Em azul está representada a ilha CpG no gene *MMP-2*, no início do 1º exon. B: Traços verticais, em vermelho, indicam os dinucleotídeos CGs, nas posições -35, -223 e -233, na região promotora do gene *MMP-9*. Observa-se a ausência de ilha CpG na região. Fonte: software Methprimer®.

#### 4.3.5 PCR quantitativo em tempo real (qRT-PCR) para os genes *MMP-2*, *MMP-9*, *GLI-1* e *GLI-2*

A análise da expressão gênica através da técnica de PCR quantitativo em tempo real requer, previamente, a extração do RNA total e sua conversão em DNA complementar (cDNA) por meio da enzima transcriptase reversa. Tal procedimento faz-se necessário devido à instabilidade do RNA.

### Síntese do cDNA e Transcrição reversa

O Kit SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR (Invitrogen, USA) foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA total tratado com DNase (Invitrogen, USA). Ao RNA, equivalente a 8 µl, foram adicionados 1 µl de Oligo(dT) (50 µM) e 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65°C por 5 min. Após este período, a mistura permaneceu no gelo por 1 min. Então, foram adicionados 2 µl de tampão específico 10X concentrado, 4 µl de MgCl<sub>2</sub> 25 mM, 1 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNase OUT (40U/ml) e 1 µl da enzima SuperScript III RT (200U/ml). Em seguida, o mix de amostra e reagentes foi incubado a 50°C durante 50 min, seguido por 85°C por 5 min. Então, 1 µl da enzima RNase H foi adicionado para remover a fita de RNA complementar ao cDNA. As amostras foram aquecidas a 37°C por 20 min e o conteúdo final foi diluído em água livre de RNase e armazenadas a -20°C.

### Quantificação relativa dos genes *MMP-2*, *MMP-9*, *GLI-1* e *GLI-2*

A expressão quantitativa dos níveis de transcrição dos genes *MMP-2*, *MMP-9*, *GLI-1* e *GLI-2* foi analisada através da técnica qRT-PCR. Esse método interpreta, quantitativamente, a amplificação das fitas de DNA em um determinado número de ciclos, utilizando uma molécula fluorescente. Essa análise se dá através da detecção de um sinal fluorescente a cada ciclo de amplificação. Para isso, é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente. Para se estabelecer uma base de comparação entre as amostras utiliza-se o valor de Ct (*Threshold cycle*)

onde cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*. À medida que a reação ocorre, a fluorescência emitida pela amostra, excitada por um laser ou por uma lâmpada de halogênio, é detectada a cada ciclo e enviada para uma unidade processadora. Em seguida, um valor CT é atribuído a cada amostra.

Foi adotado o método da quantificação relativa para avaliar os níveis de transcrição dos genes estudados (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001). Esse método consiste na comparação entre os Cts de cada amostra em relação a um gene endógeno e a um tecido calibrador, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza. Um gene endógeno ideal deve ser aquele cuja expressão ocorre em níveis constantes em diferentes tecidos do organismo, em todos os estágios de desenvolvimento e não deve ser afetado pelo tratamento experimental (GIULIETTI *et al.*, 2001). O endógeno selecionado nesse estudo foi o gene  $\beta$ -actina. O tecido calibrador é aquele que expressa o transcrito em níveis semelhantes em um número de amostras do mesmo tecido. Foram realizados testes, em diferentes tecidos, para identificar o calibrador ideal para cada gene estudado. O calibrador para os genes *GLI-1* e *GLI-2* foi cDNA de folículo pericoronário e, para os genes *MMP-2* e *MMP-9* foi cDNA de placenta humana.

Para testar a cinética de amplificação dos primers, foi realizado um teste de eficiência através da amplificação de uma amostra com concentração conhecida, utilizando os primers do gene de estudo e do gene endógeno normalizador, em uma diluição seriada na proporção 1:10 (100 ng - 10 ng - 0,1 ng - 0,01 ng - 0,001 ng). Para analisar a eficiência da cinética de amplificação dos primers, são considerados os seguintes parâmetros no teste de eficiência: a variação esperada de CT entre as diluições deverá ser de 3,3; o valor ideal de *slope*, que corresponde à inclinação da reta passando por diferentes pontos de diluição, deverá corresponder a,

aproximadamente, -3,33 e, o valor de  $R^2$ , deverá ser em torno de 0,99. O valor da eficiência ( $R^2$ ) deve variar entre 85 e 100%. O teste de eficiência foi realizado para todos os primers estudados; a eficiência e os demais parâmetros foram considerados satisfatórios (Anexos II a Anexo V). A curva de Melting é outro parâmetro importante nesse método, que indica a temperatura de dissociação dos primers, específicos para sequências-alvo. Dessa forma, na análise da curva de melting, todas as amostras amplificadas por um determinado primer deverão apresentar a mesma temperatura de dissociação. As curvas de melting para os genes estudados apresentaram resultados satisfatórios (Apêndices IV ao VII).

De acordo com o método adotado para análise da expressão gênica, as diferenças nos valores de CT entre o gene alvo e o endógeno ( $\Delta CT$ ) foram calculadas, para cada amostra, pela média dos CT das duplicatas, da seguinte forma:

$$\Delta CT = CT(\text{gene alvo}) - CT(\text{gene endógeno})$$

Os níveis dos transcritos entre os grupos experimentais foi determinada pela comparação entre o  $\Delta Ct$  da amostra estudada e o  $\Delta cT$  da amostra de referência (calibrador):

$$\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra estudada}) - \Delta CT (\text{calibrador})$$

Assim, a expressão relativa corresponderá à fórmula  $2^{-\Delta\Delta CT}$

As análises foram realizadas em um aparelho *Step-One Real-time PCR 48-well plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Para as reações de amplificação em tempo real foi utilizado o reagente SYBR<sup>®</sup> Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. As sequências de primers e condições térmicas estão apresentadas no Apêndice III.

#### **4.3.6 Zimografia**

A zimografia é uma técnica eletroforética utilizada para identificar proteínas que apresentam atividade enzimática, como MMPs (KLEINER; STETLER-STEVENSON, 1994). Nessa técnica, as proteínas presentes no extrato digerem o substrato protéico presente no gel de poliacrilamida. Para a análise das MMPs, o colágeno tipo IV (gelatina) é adicionado ao gel. Assim, as MMPs irão degradar o colágeno. A proteína é identificada em relação a um marcador de peso molecular.

O extrato protéico de ameloblastoma foi submetido à eletroforese, sob condições não-redutoras do dodecil sulfato de sódio (SDS), em um gel de poliacrilamida co-polimerizado com 1mg/ml de gelatina (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), como previamente descrito (SNOEK-VAN BEURDEN; VON DEN HOFF, 2005).

Após a eletroforese, os géis foram lavados em solução de 2.5% Triton-X 100 2,5%, e incubados a 37°C durante 18h em tampão de incubação (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, contendo 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.01% Triton X-100). Em seguida, os géis foram corados com solução 2,0% de azul de Coomassie R-250 e, descorados em metanol. Os géis foram escaneados para a análise representativa das bandas de MMP-2 e MMP-9.

#### 4.3.7 Análise da perda de heterozigosidade no *locus* do gene *PTCH*

O estudo da LOH foi realizado através de dois métodos: análise de marcadores microssatélites e avaliação de regiões de polimorfismos de um único nucleotídeo (SNP), localizados no *locus* cromossômico do gene *PTCH*.

Foram avaliados três marcadores microssatélites localizados no braço longo do cromossomo 9, incluindo D9S252 (9q21.33), D9S287 (9q22.3) e D9S127 (9q31) (Anexo II). Para isso, após a extração do DNA do ameloblastoma microdissecado em tecido normal e tumoral, foi realizada a amplificação da região microssatélite por meio de PCR convencional. Os primers e as condições térmicas foram descritas previamente (DINIZ *et al.*, 2011) (Apêndice III).

Todas as reações de PCR foram realizadas em ambas as amostras pareadas de DNA, normal e tumoral. Entende-se por DNA normal àquele extraído de áreas de tecido conjuntivo não-neoplásico, obtido pela microdissecção. DNA tumoral refere-se ao DNA extraído de áreas quem contém epitélio odontogênico da mesma amostra do ameloblastoma. Os produtos de amplificação foram submetidos à eletroforese capilar utilizando o sequenciador ABI PRISM 310 e o *software* GeneMapper® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A LOH foi calculada pela razão entre alelo curto normal/alelo longo normal e o alelo curto tumoral/alelo longo tumoral. A LOH é evidenciada quando ocorre a diminuição de, pelo menos 50% em um dos alelos na amostra tumoral, quando comparado com o mesmo alelo do DNA normal. Ou ainda, quando se observa a perda de um dos alelos no DNA tumoral (VAN HOUTEN *et al.* 2000) (Apêndice VIII). Os casos, cujo DNA normal apresentou-se como homocigoto, foram considerados não-informativos.

Amostras de carcinoma basocelular foram incluídas como controle positivo para as análises de LOH no cromossomo 9q, uma vez que a LOH nesta região é descrita em tais lesões (DANAEE *et al.*, 2006).

Outro método utilizado, neste estudo, para a análise de LOH é a avaliação de regiões de SPNs (BEROUKHIM *et al.*, 2006).

Foram estudados três SNPs localizados na posição intragênica do *PTCH*, incluindo rs112794371 (exon 5), rs111446700 (exon 17), rs357564 (exon 23). Estes SNPs foram selecionados devido à alta frequência de heterozigosidade relatada no banco de dados dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). Inicialmente, foram realizadas reações de PCR, utilizando ambas as amostras de DNA do tecido microdissecado (tecido normal e tumoral). As sequências de primers que flanqueia os SNPs, bem como as condições térmicas de amplificação, estão apresentadas na tabela 2 (Apêndice III). Os produtos de PCR foram purificados e sequenciados no sequenciador ABI PRISM 310. Por esse método, considera-se LOH quando o DNA normal é heterozigoto e, o DNA tumoral, homozigoto (BEROUKHIM *et al.*, 2006). Nos Apêndices IX e X estão apresentados, respectivamente, casos não-informativos (DNA normal homozigoto) e de retenção de heterozigosidade (DNA normal e tumoral heterozigotos). Não se encontra ilustrada a LOH, através desse método, pois não foi identificada tal alteração em nenhum dos sítios de SNPs intragênicos do *PTCH* nas amostras estudadas.



#### 4.3.8 Imuno-histoquímica para a proteína PTCH

Para a identificação da proteína PTCH em amostras parafinadas de ameloblastoma, realizou-se cortes histológicos de 4µm. Desparafinização/hidratação e recuperação antigênica foram realizadas através de uma solução específica Trilogy solution® (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) submetida a 98°C durante 20 min. em uma panela a vapor. Para bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio.

O anticorpo primário utilizado foi o anti-PTCH policlonal, gentilmente cedido pelo Dr. Allen Bale (Yale University, New Haven, CT). A incubação primária foi realizada por 30 minutos em temperatura ambiente, na diluição 1:500, sob agitação. Após lavagem com Tris-HCl, foi realizada incubação com o sistema Envision (Dako® Corporation, Carpinteria, CA, USA) por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação leve.

As reações foram reveladas em solução de diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO, USA), e contra-coradas com hematoxilina de Mayer. Cortes histológicos de ameloblastoma sem o anticorpo primário foram utilizados como controle negativo; como controle positivo, foram utilizados cortes histológicos de tumor odontogênico queratocístico. As lâminas foram analisadas, independentemente, por dois patologistas, sendo adotado o critério de presença ou ausência de imuno-marcação pelo anticorpo, classificando a lesão como positiva ou negativa, respectivamente.

#### 4.3.9 Análise estatística

Foram realizados os testes não paramétricos Mann-Whitney, Kruskal-Wallis e Qui-quadrado, quando aplicáveis. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos. Para as análises, utilizou-se o *software* estatístico SPSS versão 17.0.

## 5 ARTIGO I

O artigo dessa seção, intitulado “Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases expression in ameloblastoma”, foi submetido ao periódico “Tumor Biology” (ISSN 1010-4283, Fator de impacto: 2.026). As normas de formatação estão apresentadas no Anexo III, de acordo com o periódico.

### **Epigenetic regulation of matrix metalloproteinases expression in ameloblastoma**

Lucyana Conceição Farias<sup>1</sup>

Carolina Cavaliéri Gomes<sup>2</sup>

Marcela Carolina Rodrigues<sup>1</sup>

Wagner Henriques de Castro<sup>1</sup>

Júlio César Tanos Lacerda<sup>3</sup>

Efigênia Ferreira e Ferreira<sup>4</sup>

Ricardo Santiago Gomez<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>2</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. <sup>3</sup>Department of Oral Surgery and Diagnosis, Odilon Behrens Hospital, Belo Horizonte, Brazil. <sup>4</sup>Department of Social and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

Correspondence:

Ricardo Santiago Gomez. Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627, CEP 31270 901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: +55 31 34092477; Fax: +55 31 34092430. E-mail: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br)

## Abstract

Ameloblastoma is a benign odontogenic neoplasm with an aggressive behavior and high recurrence rates. Increased expression of matrix metalloproteinases (MMPs) is reported in ameloblastomas. In the present study we hypothesized that epigenetic alterations may regulate *MMP* expression in ameloblastomas. Therefore, we investigated the *MMP-2* and *MMP-9* genes methylation status together with mRNA transcription and protein expression in ameloblastoma. Methylation-specific polymerase chain reaction (MSP-PCR) and methylation analysis by restriction enzyme was performed to evaluate methylation profile of *MMP-2* and *MMP-9* genes in 12 ameloblastoma samples, 12 dental follicles and 12 healthy gingiva fragments, included as controls. Furthermore, we investigated the transcription levels of the genes by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR). Zymography was performed to verify protein expression in ameloblastomas. Ameloblastoma and dental follicle showed a high frequency of unmethylated *MMP-2* and *MMP-9*, whereas healthy gingival samples presented a sharp prevalence of methylated MMPs. Dental follicles showed a significantly higher *MMP-2* mRNA expression than ameloblastomas and healthy gingiva. However, higher expression levels of *MMP-9* were found in ameloblastomas than in dental follicles and healthy gingiva. All ameloblastomas showed positive expression of *MMP-2* and *MMP-9* proteins. Taken together, almost all ameloblastoma samples were unmethylated *MMP-9*, along with increased mRNA levels and evident expression of *MMP-9* protein. In conclusion, our findings point to an increased expression of *MMP-9* in ameloblastoma, possibly modulated by methylation of the gene.

Keywords: ameloblastoma, odontogenic tumours, metalloproteinase, MMP-2, MMP-9, methylation, epigenetic.

## Introduction

Ameloblastoma is a benign odontogenic tumour that exhibits high recurrence risk, aggressive behavior and local invasiveness [1]. Histologically, the ameloblastoma consists of epithelial strands or islands of ameloblastic epithelium. Peripheral cells are columnar, while cells lying more centrally are fusiform to polyhedral and are loosely connected to each other [1].

Different studies have demonstrated genetic alterations in odontogenic tumours [2-4], but few studies addressed epigenetic events analysis in these tumours [5-7]. Methylation is an epigenetic alteration that plays an important role in controlling gene activity, embryonic development, genomic imprinting, and it has been associated with gene silencing by transcriptional inactivation [8]. DNA methylation or hypomethylation of *p16*, *p21* and *LINE-1* genes was reported in ameloblastoma by our and other groups [5, 9, 10], but the significance of this data remains to be determined.

Matrix metalloproteinases (MMPs) are zinc-dependent enzymes important in extracellular matrix remodeling and associated with tumour growth and invasion through collagen matrix degradation [11]. The invasive characteristic of ameloblastoma has been associated with the expression of genes related to bone turnover and extracellular matrix remodeling, among them, *BMP*, *RANKL* and its receptor, *MMP* and *TIMP* [12-17]. As MMPs may be regulated by DNA methylation in malignant neoplasms [18, 19], such phenomenon might be important in

ameloblastoma pathogenesis and should be investigated. Therefore, the purpose of this study was to investigate the association between *MMP-2* and *MMP-9* methylation, and their mRNA transcription and protein expression in ameloblastoma.

## **Materials and methods**

### *Patients and tissue samples*

Twelve specimens of ameloblastoma were collected during surgical care in the Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Diagnoses were confirmed by histopathologic analysis based on the classification of histological typing of odontogenic tumours of the World Health Organization [1]. Eleven tumour samples were classified as solid follicular ameloblastoma, and only one case was unicystic ameloblastoma. Others clinical data are shown in table 1. Since an ideal normal tissue control for odontogenic tumours has not been established in the literature, we used as comparison group 12 dental follicles and 12 healthy gingival fragments without clinical evidence of inflammation. These tissue samples were collected during extraction of third molars. The samples were obtained after informed consent and with the approval by Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee (reference number 266/11).

### *DNA isolation and methylation analysis of MMP-2 and MMP-9*

Genomic DNA was isolated from tissue samples using Qiagen DNeasy Tissue Kit (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA) according to the manufacturer's instructions. *MethPrimer* software [20] was used to search CpG islands and sparse CG

dinucleotides. Distinct methods are suggested to analyze methylation profile according to presence of CpG islands or sparse CG dinucleotides located in promoter region or in near exons to that region [21].

To access *MMP-2* gene CpG island methylation, genomic DNA was modified by sodium bisulfite as described previously [6] and subsequently amplified with primer sets specific to reaction of methylated (F 5'-GCGGTTATACGTATCG AGTTAGC-3' and R 5'-ACTCTTTATCCGTTTTAAA ACGAC-3'; 205 bp) and unmethylated DNA (F 5'-GGTGGTTATATGTATTGAGTTAGTGA-3' and R 5'-ACTCTTTATCCATTTTAA AAACAAC-3'; 206 bp). Bisulfite-treated unmethylated DNA of PBMC cells were used as positive control of unmethylated reaction of *MMP-2* gene. Methylation-induced DNA of same cells by MSssI methylase enzyme (New England Biolabs, Beverly, USA) was used as positive control to methylated reaction.

The methylation-sensitive restriction enzymes HhaI and AclI were used to access methylation of CG dinucleotides in the *MMP-9* promoter, including those CG sites located at positions -35, -185, -223, -233, as described previously [21]. Restriction enzymes cleave DNA at unmethylated CG sites, while they are unable to cut methylated cytosines. Analysis of bioinformatics web site (<http://www.restrictionmapper.org>) showed that HhaI enzyme cleaves the restriction site at position -35, and the other sites are cleaved by AclI. CG dinucleotides analyzed in this study are located closer to the transcription start of the *MMP-9* gene. 200 ng of genomic DNA was digested separately with each of the restriction enzymes HhaI and AclI to cleave the specific regions containing CG sites, according to manufacturer's protocol (New England BioLabs, Beverly, MA, USA). Digestion was followed by PCR amplification (primers: F 5'-GCTTCATCCCCCTCCCTCC-3', R 5'-AGCACCAGGACCAGGGGC-3'; 369 bp). PCR products were subjected to



electrophoresis in 6.5% polyacrilamde gels. While methylated cytosine produces band equivalent to that of control methylated DNA of placenta tissue, the cleavage by restriction enzyme at unmethylated CpG induces DNA strand breaks, and thus no band is detected. To verify if enzymatic digestion did not damage the DNA, DNA samples were also amplified without previous digestion by restriction enzymes. Undigested and digested PCR products were electrophoresed in parallel. Human unmethylated DNA (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), which is sensitive to action of the enzyme, was also used as unmethylated positive control.

#### *RNA extraction and Quantitative Real-time PCR (qRT-PCR) of MMP-2 and MMP-9*

Total RNA was extracted from frozen tissue samples by Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). RNA integrity was analyzed by 1% agarose gel electrophoresis. Reverse transcription of 1µg of RNA to cDNA was performed using SuperScript III First-Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instruction. Primer sequences were designed using the *PrimerExpress* software (v.3, Applied Biosystems) as follows: *MMP-2* (F: 5'-AGCTCCCGGAAAAGATTGATG-3'; R: 5'-CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT-3', 101 bp) and *MMP-9* (F: 5'-GAGGTTCGACGTGAAGGCGCAGAT-3'; R: 5'-CATAGGTCACGTAGCCCACT TGGT3', 200 bp). All reactions were run in duplicates in a StepOne Real time PCR System using SYBR-green fluorescence quantification system (Applied Biosystems, Warrington, UK). Comparative  $C_t$  method was used [22]. Expression levels of *MMP-2* and *MMP-9* genes were obtained by normalization to endogenous  $\beta$ -*actin* and relative to a calibrator sample (placenta tissue).

### *Gelatin Zymography*

Ameloblastoma protein was extracted and subjected to electrophoresis under nonreducing conditions on SDS-polyacrylamide gels copolymerized with 1 mg/ml gelatin (Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), as previously described [23]. After electrophoresis, gels were washed in 2.5% Triton-X 100 and incubated for at least 18h at 37°C in incubation buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 100 mM NaCl, 0.01% Triton X-100). Zymographic gels were stained in 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250 and de-stained. Gels were scanned to analyse the bands representative of MMPs, according to molecular weight.

### *Statistical analysis*

Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests were used to compare the relative quantification of *MMP-2* and *MMP-9* between groups. Chi-square or Fisher's exact were used when appropriate to test the association between methylation profile of the genes. The analyses were carried out using the SPSS 17.0 software and probability values <0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

*MMP-2* and *MMP-9* methylation status are shown in table 2 and represented in figure 1. While all healthy gingival samples showed *MMP-2* methylation, about half of ameloblastomas and half of dental follicles were unmethylated. Similarly, it was identified an increased frequency of unmethylated *MMP-9* of specific CpG sites digested by HhaI in ameloblastoma and dental follicles. Almost all ameloblastoma and dental follicle samples showed unmethylated profile for *MMP-9*. No difference

was found between the methylation of CG sites digested by *Acil* among the groups studied.

qRT-PCR results are summarized in figures 2A and 2B. Dental follicles showed a significantly higher *MMP-2* mRNA expression than ameloblastomas and healthy gingiva. However, higher expression levels of *MMP-9* were found in ameloblastomas than in dental follicles and healthy gingiva.

When we investigated the association between the methylation status of both genes and their transcription, we observed an inverse association of *MMP-2* transcription with methylation of the gene in dental follicles ( $p=0.037$ ) (Table 3). As most of the ameloblastoma and dental follicles were unmethylated for *MMP-9* gene considering all restriction sites, it was not possible to statistically compare the transcription of the gene in the cases with or without methylated sequences. However, our results showed that almost all tumor samples presented unmethylated *MMP-9* profile together with increased mRNA levels.

All ameloblastoma samples showed expression of *MMP-2* and *MMP-9* proteins, verified by zymography (Figure 3). However, pro-*MMP-2* and pro-*MMP-9* forms were not identified in ameloblastomas. Analysis of protein expression in dental follicles and healthy gingiva was not performed due to scarcity tissue samples.

## **Discussion**

The underlying molecular pathways associated with the pathogenesis of ameloblastoma are not well established yet. Previous investigations have assessed molecular and genetic alterations related mainly to apoptosis, allelic loss of tumour

suppressor genes, deregulation of Sonic Hedgehog signaling pathway, as well as clonality of these tumours [3,24,25].

Matrix metalloproteinases are involved in the degradation of collagen as well as bone matrix and have been shown to play a key role in the local invasiveness of ameloblastoma cells [15,26]. Overexpression of *MMP-2* and *MMP-9* was associated to an infiltrative behavior of ameloblastoma, as well as of several malignant neoplasms [17,27]. The suppression of *MMP-2* activity was able to inhibit the invasiveness capacity of ameloblastoma cells *in vitro* [14,15]. Furthermore, it was suggested that increased expression of *MMP-9* may be involved in the proliferation and invasive behavior of ameloblastoma [26].

Some papers, including studies from our research group, have demonstrated epigenetic alterations in odontogenic tumours [5,6,9,10,28]. In the present study, we hypothesized that methylation may regulate the expression of MMPs in ameloblastoma and/or dental follicles. We also investigated the association between methylation and the transcription levels of these genes. As most of the ameloblastoma samples were solid follicular type, the association between each clinical or histological type with the molecular data was not possible to be performed.

MMPs are involved in tooth eruption mechanisms, being important in dental follicles tissue [29]. In the present study, the dental follicles showed a more unmethylated profile of *MMP-2* and *MMP-9* in regard to gingiva. Compared to the others study groups, dental follicles presented increased transcription of *MMP-2* mRNA, confirming a previous study [16]. Although *MMP-2* is related to tumor pathogenesis, this enzyme seems to be constitutively expressed in physiologic tissues and many cell types and also exhibits characteristics of a housekeeping gene

[30, 31, 32]. Perhaps this could explain higher expression of mRNA *MMP-2* in dental follicles than in ameloblastomas.

In addition, an inverse association of *MMP-2* transcription and methylation of the gene was noted in dental follicles. Therefore, our data suggests that *MMP-2* expression in these tissues may be modulated by methylation.

Ameloblastomas presented an unmethylated profile of *MMP-2* and *MMP-9* genes compared to gingiva. Furthermore, this tumour showed increased transcription of *MMP-9* compared to dental follicles and healthy gingiva.

It is well established the important role of the methylation for epigenetic silencing, particularly, through regulatory mechanisms of transcription. Accordingly, our data lead us to suggest that preferably unmethylated profile of *MMP-9* gene, in ameloblastomas, may be a permissive event for binding of transcription factors to DNA, thus favoring, the gene transcription.

All ameloblastomas showed *MMP-9* protein expression and were unmethylated for *MMP-9*, so it was not possible to statistically compare the transcription of the gene according to its methylation status, due to the small frequency of ameloblastomas with methylated *MMP-9*. However, our study suggests that the increased transcription of *MMP-9* in ameloblastoma could be possibly influenced by unmethylation of the gene. The evident protein expression, identified by zymography, provides additional data to the possible gene regulation by unmethylated *MMP-9*.

It is interesting to note that hypomethylation of *MMP-2* and *MMP-9* genes increases gene expression and contributes to cancer cell invasiveness and tumorigenesis in malignant neoplasms, such as prostate cancer and lymphoma [18,33].

In conclusion, our study provides new insights into the epigenetic regulation of MMPs in ameloblastoma and points to hypomethylation of *MMP-9* as a possible mechanism involved in the increased transcription of the gene in this tumour. However, functional studies are needed to better explain the role of matrix metalloproteinases methylation in the pathogenesis of ameloblastoma.

#### **Conflict of interest statement**

None.

#### **Acknowledgements**

Grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), and MS/SCTIE/Decit, Brazil. Professor RS Gomez is research fellow of CNPq.

## References

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of the head and neck. Lyon: IARC; 2005. p. 296-300.
2. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000;79:1418-22.
3. 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.
4. Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 2006;35:65-74.
5. Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis* 2010;16:286-91.
6. Moreira PR, Guimarães MM, Guimarães AL, et al. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2009;38:99-103.
7. Pan S, Dong Q, Sun LS, Li TJ. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: modification of the two-hit hypothesis. *Clin Cancer Res* 2010;16:442-50.
8. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21:5427-40.
9. Zhong M, Yan Y, Wang J, Liu J, Li L, Gong YB. DNA methylation of human telomerase reverse transcriptase promoter region in human ameloblastoma. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007;42:304-7.
10. Moreira PR, Guimarães MM, Gomes CC, et al. Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol* 2009;54:893-7.
11. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J* 2011;278:28-45.
12. Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncol* 2005;41:637-44.
13. Kumamoto H, Ooya K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis* 2006;12:163-70.
14. Wang A, Zhang B, Huang H, et al. Suppression of local invasion of ameloblastoma by inhibition of matrix metalloproteinase-2 in vitro. *BMC Cancer* 2008;8:182.
15. Zhang B, Zhang J, Huang HZ, et al. Inhibition of ameloblastoma invasion in vitro and in vivo by inhibitor of metalloproteinase-2 activity. *J Oral Pathol Med* 2009;38:731-6.
16. Zhang B, Zhang J, Huang HZ, Xu ZY, Xie HL. Expression and role of metalloproteinase-2 and endogenous tissue regulator in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2010;39:219-22.
17. Qian Y, Huang HZ. The role of RANKL and MMP-9 in the bone resorption caused by ameloblastoma. *J Oral Pathol Med* 2010;39:592-8.

18. Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani SA. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res* 2006;66:9202-10.
19. Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, Strongin AY. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem* 2009;284:12727-34.
20. Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002;18:1427-31.
21. Roach HI, Yamada N, Cheung KS, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005;52:3110-24.
22. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25:402-8.
23. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38:73-83.
24. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez R. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2010;39:585-91.
25. Farias LC, Gomes CC, Brito JAR, et al. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol* 2012. *In press*
26. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2003;32:114-20.
27. Zhou CX, Gao Y, Johnson NW, Gao J. Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. *Aust Dent J* 2010;55:385-9.
28. Moreira PR, Cardoso FP, Brito JA, Batista AC, Gomes CC, Gomez RS. Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. *Braz Dent J* 2011;22:422-7.
29. Omar NF, Gomes JR, Neves JD, Salmon CR, Novaes PD. MT1-MMP expression in the odontogenic region of rat incisors undergoing interrupted eruption. *J Mol Histol* 2011;42:505-11.
30. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem* 1990;265:11077-82.
31. Crowther M, Goodall S, Jones JL, et al. Localization of matrix metalloproteinase-2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *Br J Surg* 2000;87:1391-1400.
32. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation* 2001 Jul 17;104:304-9.
33. Chicoine E, Estève PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun* 2002;297:765-72.



## Figure legends

**Figure 1** Representative figure of methylation analysis. A: Methylation status of *MMP-2* in ameloblastoma. M: PCR products when amplified by methylated primers (205bp); U: PCR products when amplified by unmethylated primers (206pb); +M: positive control to methylated reaction; +U: positive control to unmethylated reaction. -M and -U: negative control without DNA. Lines 1 to 3 represent DNA from ameloblastoma samples. B: Methylation status of *MMP-9* in dental follicle. DNA samples were digested by HhaI restriction enzyme followed by PCR, flanking the restriction site. Absent band indicates unmethylated profile (U) due to DNA cleavage by restriction enzyme. Presence of PCR band represents methylated profile (M) of the *MMP-9* gene. +M: methylated positive control; +U: unmethylated positive control.

**Figure 2** qRT-PCR results of *MMP-2* (A) and *MMP-9* (B) mRNA transcription in ameloblastoma, dental follicle and healthy gingiva. In both analyses, gene expression is shown as mean $\pm$ SE. All reactions were normalized to  $\beta$ -actin and relative to a calibrator sample. \*Kruskal-Wallis and Mann-Whitney tests ( $p < 0.05$ ).

**Figure 3** Zymography gel electrophoresis representing MMP-2 (72 KDa) and MMP-9 protein (92 KDa) in ameloblastoma samples. Lines 1 to 7 represent protein extracts from ameloblastoma samples

Figure 1

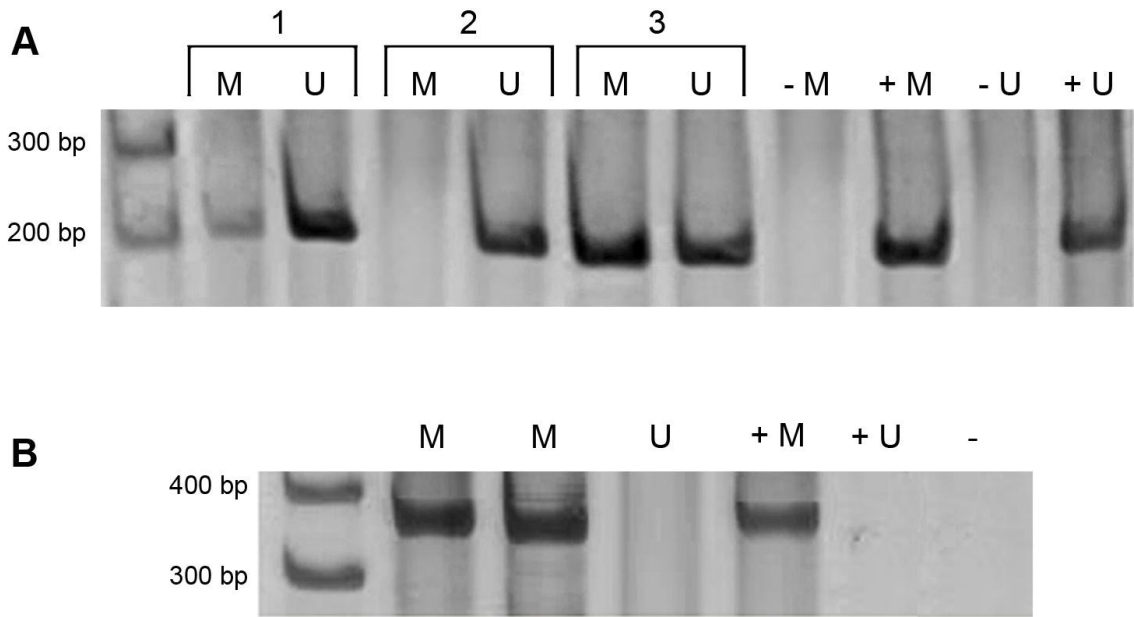


Figure 2

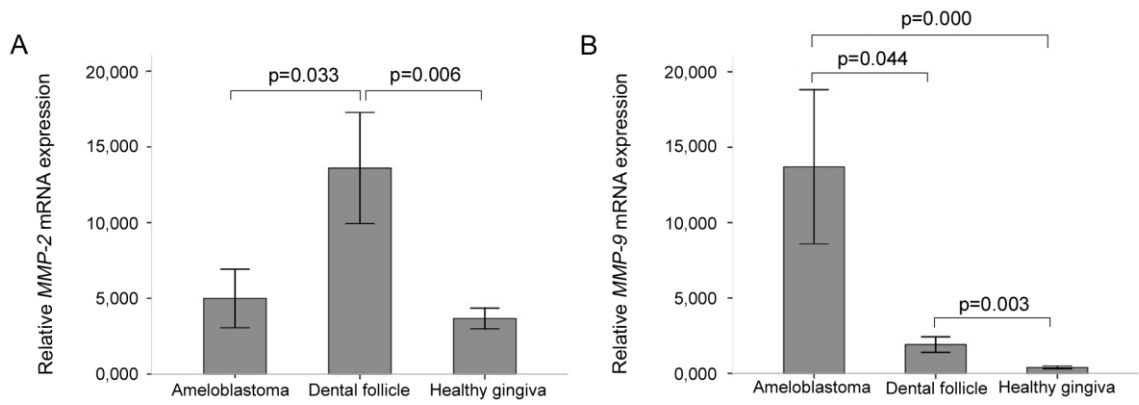
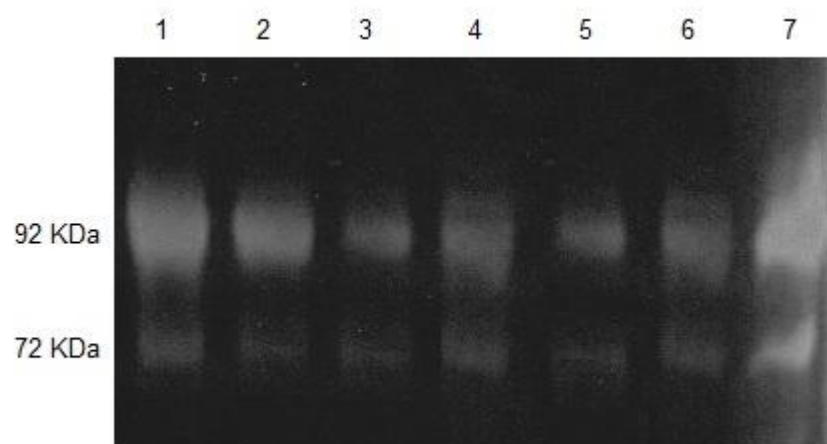


Figure 3



## Tables

**Table 1**

Distribution of subjects according to gender, age and anatomic sites

Parameters	Ameloblastoma (n=12)	Dental follicle (n=12)	Healthy gingiva (n=12)
<b><u>Gender</u></b>			
Male	05 (41.7%)	06 (50.0%)	07 (58.3%)
Female	07 (58.3%)	06 (50.0%)	05 (41.7%)
<b><u>Age (years)</u></b>			
Variation	8-51	16-28	19-28
Mean $\pm$ SD	31.0 $\pm$ 14.6	21.58 $\pm$ 3.8	25.4 $\pm$ 5.3
<b><u>Anatomic Sites</u></b>			
Mandible			
Anterior region	01 (8.3%)	0	0
Posterior region	11 (91.7%)	12 (100.0%)	4 (33.3%)
Maxilla	0	0	8 (66.7%)

**Table 2**

Methylation status of *MMP-2* and *MMP-9* genes in ameloblastoma, dental follicle and healthy gingiva

Parameters	Ameloblastoma (n=12)	Dental follicle (n=12)	Healthy gingiva (n=12)	<i>p-value</i> *
<b><u>MMP-2 methylation</u></b>				
Methylated	05 (41.7%)	07 (58.3%)	12 (100.0%)	0.008*
Unmethylated	07 (58.3%)	05 (41.7%)	0 (0.0%)	
<b><u>MMP-9 methylation/restriction site digested by HhaI</u></b>				
Methylated	0 (0.0%)	02 (16.7%)	06 (50.0%)	0.011*
Unmethylated	12 (100.0%)	10 (83.3%)	06 (50.0%)	
<b><u>MMP-9 methylation/restriction site digested by AclI</u></b>				
Methylated	01 (8.3%)	0 (0.0%)	0 (0.0%)	0.358
Unmethylated	11 (91.7%)	12 (100.0%)	12 (100.0%)	

\* Fisher's exact test ( $p < 0.05$ )

**Table 3**Relative expression of *MMP-2* according to methylation status in dental follicles

	Relative expression of <i>MMP-2</i> (qRT-PCR) Mean Rank	<i>p-value</i> *
<b><u>Dental follicles</u></b>		
Methylated <i>MMP-2</i>	4.86	0.037
Unmethylated <i>MMP-2</i>	8.80	

\* Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ )

## 6 ARTIGO II

O artigo dessa seção, intitulado “Loss of heterozygosity of the *PTCH* in ameloblastoma”, foi aceito para publicação no periódico “Human Pathology” (ISSN 0046-8177, Fator de impacto: 2.998). As normas de formatação estão apresentadas no Anexo IV, de acordo com o periódico.

**ARTICLE IN PRESS**

Human Pathology (2012) xx, xxx–xxx



---

**Human  
PATHOLOGY**


---

[www.elsevier.com/locate/humpath](http://www.elsevier.com/locate/humpath)

Original contribution

## Loss of heterozygosity of the *PTCH* gene in ameloblastoma <sup>☆</sup>

Lucyana Conceição Farias DDS, MSc<sup>a</sup>, Carolina Cavalieri Gomes DDS, PhD<sup>b</sup>,  
 João Artur Ricieri Brito DDS, PhD<sup>a</sup>, Clarice Ferreira Galvão DDS, MSc<sup>a</sup>,  
 Marina Gonçalves Diniz MSc<sup>a</sup>, Wagner Henriques de Castro DDS, PhD<sup>a</sup>,  
 Vanessa de Fátima Bernardes DDS, PhD<sup>a</sup>, Luiz Armando De Marco MD, PhD<sup>c</sup>,  
 Ricardo Santiago Gomez DDS, PhD<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Belo Horizonte-MG CEP 31270, Brazil

<sup>b</sup>Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Belo Horizonte-MG CEP 31270, Brazil

<sup>c</sup>Department of Surgery, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Belo Horizonte-MG CEP 31270, Brazil

Received 20 May 2011; revised 25 August 2011; accepted 31 August 2011

## Loss of heterozygosity of the *PTCH* gene in ameloblastoma

Lucyana Conceição Farias<sup>a</sup>

Carolina Cavalieri Gomes<sup>b</sup>

João Artur Ricieri Brito<sup>a</sup>

Clarice Ferreira Galvão<sup>a</sup>

Marina Gonçalves Diniz<sup>a</sup>

Wagner Henriques de Castro<sup>a</sup>

Vanessa de Fátima Bernardes<sup>a</sup>

Luiz Armando De Marco<sup>c</sup>

Ricardo Santiago Gomez<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, <sup>b</sup>Department of Pathology, <sup>c</sup>Department of Surgery. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Corresponding author:

Ricardo Santiago 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 address: rsgomez@ufmg.br

Grant support:

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



## Abstract

Ameloblastoma is a locally aggressive benign neoplasm derived from odontogenic epithelium, with high recurrence rates. Alterations in the Hedgehog signalling pathway, including *PTCH* gene mutations, have been associated with the pathogenesis of some odontogenic tumours. The purpose of the present study was to assess loss of heterozygosity (LOH) at the *PTCH* locus in ameloblastoma. Twelve ameloblastomas were included and LOH was assessed by using 3 microsatellite markers D9S252, D9S127, and D9S287, and 3 single-nucleotide polymorphisms (SNPs) rs112794371, rs111446700, rs357564 all located at the *PTCH* gene locus. Furthermore, we investigated *GLI1* and *GLI2* transcription levels by quantitative reverse-transcription PCR (qRT-PCR) in 8 ameloblastomas and concomitantly, *PTCH* protein levels by immunohistochemical analysis. LOH at 9q21.33-9q.31 was detected in 4/10 (40.0%) informative cases of ameloblastoma. All 8 analyzed samples expressed *GLI1* mRNA and seven cases *GLI2* mRNA. Interestingly, LOH at the *PTCH* locus was not correlated with *GLI1* or *GLI2* transcription levels, nor was there any correlation with *PTCH* protein expression. In conclusion, our findings suggest that LOH in the *PTCH* region may be relevant to the pathogenesis of ameloblastoma, but may target a different gene than *PTCH*.

Keywords: Ameloblastoma; Loss of heterozygosity; *PTCH*; *GLI1*; *GLI2*; Sonic Hedgehog pathway

## Introduction

Ameloblastoma is a benign tumour originating from odontogenic epithelium. It has an aggressive behaviour associated with significant destruction of the jaws, especially in the posterior region of the mandible. This odontogenic tumour presents high recurrence rates [1,2]. Histologically, ameloblastoma consists of epithelial strands or islands of ameloblastic epithelium [1,3]. Several studies have already demonstrated genetic and epigenetic alterations in ameloblastoma [4-7], but the precise pathogenic mechanisms have not been elucidated yet [8].

The Sonic hedgehog (*SHH*) signalling pathway is a key regulator of embryonic development and cell growth control. *SHH* signalling acts through several components, including SHH ligand and the transmembrane proteins Patched (PTCH) and Smoothed (SMO), to activate GLI transcription factors. Evidence indicates that in the absence of the SHH ligand, *PTCH* acts as a tumour suppressor gene and normally represses *SMO*. *PTCH* negatively modulates the SHH signalling pathway but when SHH binds to the PTCH receptor, this inhibition is released, allowing SMO to activate the *GLI*-family transcription factors, among them, *GLI1* and *GLI2* [9]. Aberrant activation of genes regulating *SHH-GLI* has reportedly been associated with tumorigenesis in humans and animals [10]. Genetic alterations in the *PTCH* gene were previously reported in different odontogenic tumours and cysts [11], but the putative involvement of this gene and genetic locus was not reported in ameloblastoma.

Loss of heterozygosity (LOH) is the loss of 1 allele by comparison of non tumorous DNA with tumour DNA, and is a common somatic hallmark of an inactivation of a tumor suppressor gene [12]. To date only immunohistochemical data were published regarding the putative involvement of the SHH pathway in

ameloblastoma [5,13,14], Therefore, the purpose of the present study was to expand the body of knowledge by LOH analysis at the *PTCH* gene locus in ameloblastoma. In order to provide further insight into the SHH signalling pathway in these tumors, we also measured mRNA levels of *GLI1* and *GLI2* and the immunohistochemical expression of PTCH.

## **Materials and Methods**

### *Patients and tissue samples*

Twelve human ameloblastoma samples were included in this study. Of these 12 samples, 8 had fresh tissue collected as well as paraffin-embedded tissue. Diagnosis of all specimens was confirmed by histopathologic analysis based on the classification of histological typing of odontogenic tumours of the World Health Organization [1]. The samples were obtained after informed consent and with the approval of the local ethics committee. Clinical data as well as classification of the lesions are displayed in table 1.

### *DNA isolation*

Tumour tissue and stroma fragments were obtained by microdissection. Tissue was microdissected from a series of 20- $\mu$ m-thick paraffin-embedded tissue sections under direct visualization using a stereoscopic microscope and a surgical blade. Microdissected tissue was digested with proteinase K, and genomic DNA was isolated using Qiagen DNeasy Tissue Kit following the manufacturer's instructions (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA).

### *LOH by Microsatellite analysis*

Three polymorphic DNA markers located on the long arm of chromosome 9, including D9S252 (9q21.33), D9S287 (9q22.3), and D9S127 (9q31), were evaluated. The primers and PCR conditions were as described elsewhere [15]. All PCR reactions were performed for tumour and normal tissue under the same conditions. Amplification products were detected using an ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). LOH was calculated as the ratio between short allele-normal (Sn)/long allele-normal (Ln) and short allele-tumour (St)/long allele-tumour (Lt), using the formula: (Sn:Ln)/(St:Lt). LOH was scored if 1 allele was decreased by more than 50% in the tumour sample when compared with the same allele in normal tissue DNA after stutter correction when necessary (score < 0.5 or > 2) [12].

When DNA for normal tissue was found to be homozygous for the polymorphic markers (i.e., showing only 1 allele in the normal control tissue), the case was considered non-informative. Samples of basal cell carcinoma were used as positive control for LOH assays on chromosome 9q since LOH in this region is reported in such lesions.

### *LOH by single-nucleotide polymorphisms markers*

Three single-nucleotide polymorphisms (SNPs) located in intragenic position of *PTCH* were also used to further evaluate LOH, including rs112794371 (exon 5), rs111446700 (exon 17), rs357564 (exon 23). These SNPs were selected due to high frequency of heterozygosity (0.5) reported in the dbSNP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>). The following primers flanking the SNPs were used: F 5'ctgctcgtttgacagatgc3', R 5'tgaaatttaatgacgcct3' (rs112794371); F 5'gccatgtgcagaactgtgtt3', R 5'acgtgagagcaacgcctaata3' (rs111446700); F

5'aaccaaggaggaagtgtg3', R 5'aagccgtcacagtgggtgatg3' (rs357564). Purified PCR products were sequenced using an ABI PRISM 310. Analysis of LOH by heterozygous SNP markers implies that normal sample is heterozygote and tumour sample is homozygote [16].

#### *RNA extraction and quantitative reverse transcription-PCR*

Total RNA was extracted from 8 ameloblastoma samples by means of Trizol reagent according to the manufacturer's protocol (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Total RNA was treated with DNase. Reverse transcription of 1 µg of RNA to cDNA was performed using SuperScript III First-Strand (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) following the manufacturer's instructions. Quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR) analysis was carried out using 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). Reactions were performed in duplicate and run on a Step One machine (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The cycling parameters were 10 min denaturation at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 15 s and 56°C for 1 min. The cycling was followed by melting curve analysis to distinguish specificity of the PCR products. *GLI1* and *GLI2* expression was normalized to  $\beta$ -actin (*ACTB*) as internal control [17]. Primer efficiency was tested. The amount of targets was obtained by normalization to endogenous  $\beta$ -actin and relative to a calibrator sample (pericoronar dental follicle). All reactions were run in duplicate. The data were quantified with the comparative  $C_t$  method as previously described [18].

#### *Immunohistochemistry*

Deparaffinization/rehydration and antigen retrieval were performed in paraffin sections of ameloblastoma using the Trilogy solution® (Cell Marque, Rocklin,

CA, USA) in a steamer at 98°C for 20 minutes. The endogenous peroxidase was blocked by incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Anti-PTCH C terminus polyclonal antibody was kindly donated by Dr. Allen Bale (Yale University, New Haven, CT) and was used as the primary antibody at 1:500 dilution for 30 minutes at room temperature. After washing in Tris–HCl buffer, sections were incubated for 30 min at room temperature with EnVision™+Dual Link System-HRP (Dako; Carpinteria, CA, USA). The reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution (DAB) (Dako; Carpinteria, CA, USA). The tissue sections were counterstained with Mayer's hematoxylin and mounted in Permount (Fisher Scientific; NJ, USA). Keratocystic odontogenic tumour was used as positive control and the negative control consisted of the omission of primary antibody. Each slide was analysed by two pathologists and the tumour was scored as positive or negative according to the presence or absence of the protein staining respectively.

#### *Statistical analysis*

The Mann-Whitney test was used to compare the relative quantification of *GLI1* and *GLI2* in the samples with and without LOH at 9q21.33-q31. The statistical analyses were carried out using the SPSS 17.0 software, and probability values <0.05 were considered statistically significant.

## **Results**

#### *Clinicopathologic characteristics*

A total of 12 cases of ameloblastoma were included in the study. They included 7 women and 5 men (mean age, 31.58 ± 13.67 years; range, 8-51 years). All tumours affected the mandible. Eleven cases were diagnosed as multicystic ameloblastoma and 1 was unicystic ameloblastoma (table 1).

### *LOH analysis of PTCH gene and quantitative real-time PCR of GLI1 and GLI2*

LOH results obtained with the combined use of microsatellite markers and single-nucleotide polymorphisms are summarized in table 1. LOH was identified in at least 1 locus in 4 (40.0%) out of 10 informative ameloblastoma samples. Among the 4 ameloblastoma cases with LOH at 9q21.33-9q.31, 3 were multicystic and 1 was unicystic. Representative examples of LOH are shown in Figure 1.

Table 2 shows the combination of LOH and relative quantification of *GLI* mRNA levels. All eight samples showed transcription of *GLI1* mRNA and seven cases expressed *GLI2* mRNA. The transcription of both genes in the samples that presented LOH in the *PTCH* region was not statistically different from the ones that were heterozygous at the *PTCH* locus ( $p > 0.05$ ; Mann-Whitney test) (table 2).

### *PTCH protein expression*

All ameloblastoma samples showed positive intra-cytoplasmic immunostaining of PTCH. A representative immunostaining pattern is shown in Figure 2.

## **Discussion**

The human homologue of *Drosophila* patched gene (*PTCH*), located at 9q22.3, have been suggested to have a potential role in the pathogenesis of some odontogenic cysts and tumours [19,20,21]. In the present study, we analysed 12 ameloblastoma cases for LOH in the *PTCH* region, at 9q21.33-9p31. LOH was present in at least 1 locus in 4 (40.0%) of 10 samples of informative cases of ameloblastoma. Since the unique unicystic ameloblastoma case studied also

presented LOH of the *PTCH* gene, we suggest that this alteration is not exclusive of multicystic ameloblastoma form. Koutlas *et al.* [22], using only 2 microsatellite markers to study 3 cases of ameloblastoma, did not find LOH of microsatellite markers in the region of the *PTCH* gene.

In order to validate the hypothesis that the *SHH/PTCH* pathway is indeed contributing to the pathogenesis of ameloblastoma, we further investigated the transcription of the downstream *GLI1* and *GLI2* genes. While *GLI1* encodes a zinc finger transcription factor that acts as an activator of target genes, the *GLI2* acts as a transcriptional repressor or activator. The transcription of both proteins occurs when the signalling pathway is activated [10]. We found that all ameloblastoma samples showed transcription of the *GLI1* and 7 out of 8 of the frozen samples presented transcription of the *GLI2*. This data confirm previous evidence of presence of *GLI1* mRNA and protein in ameloblastomas [5,14,23] and gives further support to the assumption that the *PTCH* pathway is activated in ameloblastoma. Yet, no correlation was shown between LOH at the *PTCH* gene locus and the transcription of *GLI1* and *GLI2* or even protein expression of the *PTCH* gene.

Although some studies have previously investigated *PTCH* protein expression in ameloblastoma [5,13,14,23], none of them evaluated the possible association between *PTCH* LOH and protein expression. We found strong positive staining in all samples independent of the *PTCH* locus LOH status, suggesting that the expression of this protein is not strictly influenced by the genetic alteration of the gene. Interestingly, the same result was reported by our group some years ago regarding keratocystic odontogenic tumor, a well-known tumour clearly associated with *PTCH* gene alterations [13]. These results may also suggest that LOH may not be targeting the *PTCH* gene but a nearby gene that may affect tumorigenesis of these tumors.



In conclusion, our study shows that some ameloblastoma cases present LOH of the *PTCH* gene. Increased transcription of mainly *GLI1* is observed in these tumours, but no correlation with LOH of the *PTCH* gene. These results may implicate another gene at the same locus.

## References

1. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D, eds. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of the head and neck. Lyon: IARC; 2005.
2. Fregnani ER, Da Cruz Perez DE, De Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, De Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39:145-9.
3. Slootweg PJ. Odontogenic tumours-An update. *Curr Diagn Pathol* 2006;12:54-65.
4. 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.
5. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med* 2009;38:597-604.
6. Moreira PR, Guimarães MM, Gomes CC, *et al.* Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol* 2009;54:893-7.
7. Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis* 2010;16:286-91.
8. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med* 2010;39:585-91.
9. Ruiz i Altaba A, Sánchez P, Dahmane N. Gli and hedgehog in cancer: tumours embryos and stem cells. *Nat Rev Cancer* 2002;2:361-72.

10. Stecca B, Ruiz I, Altaba A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol* 2010;2:84-95.
11. Gomes CC, Gomez RS. PTCH1 gene inactivation is not a keratocystic odontogenic tumour exclusive alteration. *Oral Oncol* 2011;47:226-7.
12. 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.
13. Barreto DC, Bale AE, De Marco L, Gomez RS. Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors. *J Dent Res* 2002;81:757-60.
14. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2004;33:185-90.
15. 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;40:277-80.
16. Beroukhim R, Lin M, Park Y, *et al.* Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol* 2006;2:0323-32.
17. Kallassy M, Toftgård R, Ueda M, *et al.* Patched (ptch)-associated preferential expression of smoothed (smoh) in human basal cell carcinoma of the skin. *Cancer Res* 1997;57:4731-5.
18. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25:402-8.
19. Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2009;45:1011-4.

20. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat Genet* 1996;12:85-7.
21. 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.
22. Koutlas IG, Koch CA, Vickers RA, Brouwers FM, Vortmeyer AO. An unusual ostensible example of intraoral basal cell carcinoma. *J Cutan Pathol* 2009;36:464-70.
23. Zhang L, Chen XM, Sun ZJ, Bian Z, Fan MW, Chen Z. Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. *Oral Oncol* 2006;42:398-408.

## Legends

Figure 1. Representative ameloblastoma samples showing LOH, using microsatellite markers D9S252 (A), D9S127 (B) and D9S287 (C) located on chromosome 9q. Loss of an allele is observed in the tumour compared to stroma DNA in all cases. \* allele

Figure 2. Positive PTCH staining in ameloblastoma. Both membranous and cytoplasmic immunostaining are shown.

Figure 1

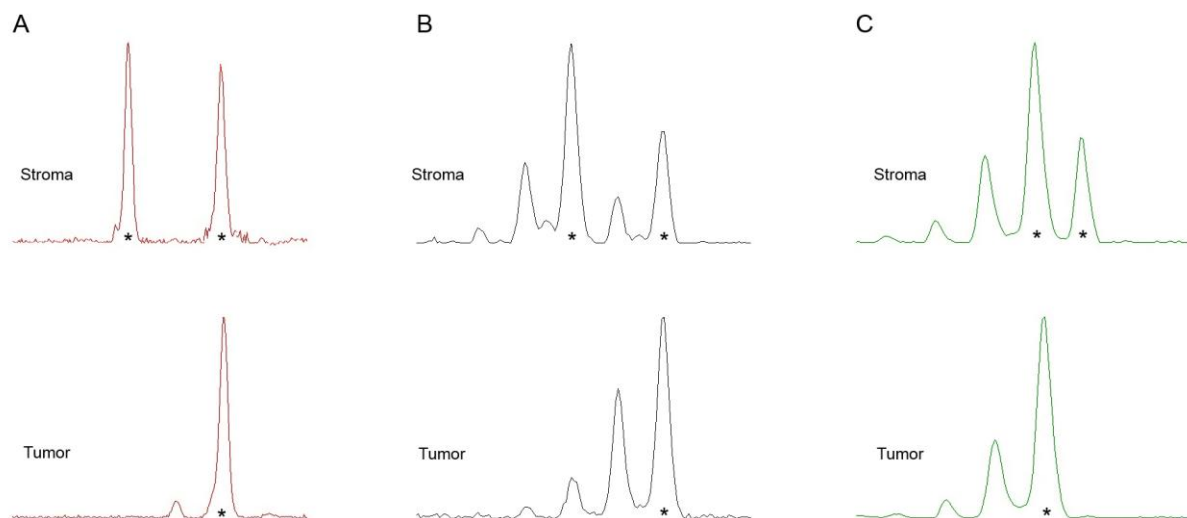
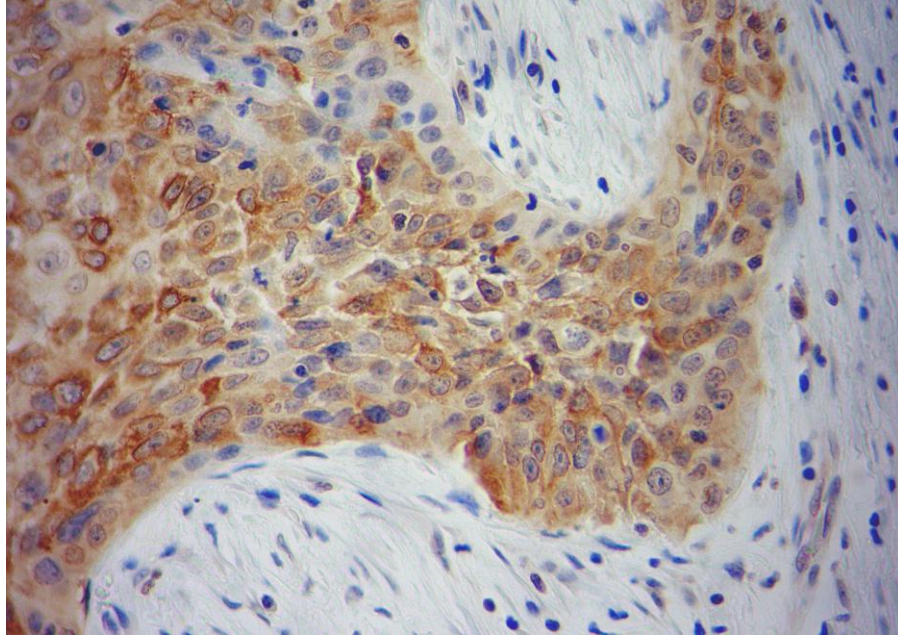


Figure 2



## Tables

Table 1. Analysis of loss of heterozygosity (LOH) in 12 ameloblastoma samples using microsatellite markers and single nucleotide polymorphisms (SNPs) located in and around the region of the *PTCH* gene.

Sample	Gender	Age	Clinical Type	Microsatellite Marker			<i>PTCH</i> SNPs		
				D9S252	D9S127	D9S287	rs112794371	rs111446700	rs357564
				9q21.33	9q31	9q22.3	Exon 5	Exon 17	Exon 23
Case 1	Female	40	Multicystic	○	-	○	-	-	-
Case 2	Male	25	Multicystic	●	-	●	-	-	*
Case 3	Female	51	Multicystic	-	●	●	-	-	*
Case 4	Female	33	Multicystic	-	-	-	-	*	-
Case 5	Female	37	Multicystic	-	●	○	*	*	*
Case 6	Female	12	Multicystic	-	-	○	*	*	*
Case 7	Male	50	Multicystic	-	-	○	*	*	-
Case 8	Female	39	Multicystic	○	○	○	-	-	*
Case 9	Female	19	Unicystic	●	-	○	-	-	-
Case10	Male	28	Multicystic	-	-	-	-	-	*
Case 11	Male	08	Multicystic	○	○	○	-	-	○
Case 12	Male	37	Multicystic	-	-	○	-	-	○

- : Homozygote (non informative); ○: Heterozygote; ●: LOH; \*: Uninterpretable data .

Table 2. Loss of heterozygosity (LOH) in the *PTCH* region and relative quantification of the *GLI1* and *GLI2* genes in ameloblastoma

Ameloblastoma samples	LOH in the <i>PTCH</i> *	Relative quantification	Relative quantification
		of <i>GLI1</i> **	of <i>GLI2</i> **
Case 2	Yes	0.017	Undetected
Case 3	Yes	9.721	3.278
Case 4	No	10.957	15.965
Case 7	No	2.095	6.026
Case 8	No	0.027	0.058
Case 9	Yes	0.042	0.156
Case 11	No	0.788	0.078
Case 12	No	0.524	0.116

\*: LOH in at least 1 microsatellite marker

\*\*  $2^{-\Delta\Delta CT}$ . Dental follicles were used as calibrator to quantitative PCR of the *GLI1* and *GLI2* genes.



## 7 CONCLUSÕES

O ameloblastoma apresenta aumento na expressão de *MMP-9* em comparação com folículos pericoronários e mucosa normal.

A predominância do padrão não-metilado do gene *MMP-9* sugere possível regulação epigenética.

Perda de heterozigosidade na região do gene *PTCH* é encontrada no ameloblastoma. A expressão aumentada de *GLI-1* e *GLI-2* sugere ativação desta via neste tumor.

## REFERÊNCIAS

1. Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, Finkelstein S, Hunt JL. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med.* 2004;128(3):313-7.
2. Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, Hanna E, Fan CY. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol.* 2003;16(9):944-50.
3. Alaeddini M, Salah S, Dehghan F, Eshghyar N, Etemad-Moghadam S. Comparison of angiogenesis in keratocystic odontogenic tumours, dentigerous cysts and ameloblastomas. *Oral Dis.* 2009;15(6):422-7.
4. Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW. Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 1996;10(16):2003-13.
5. Andersen TL, del Carmen Ovejero M, Kirkegaard T, Lenhard T, Foged NT, Delaisse JM. A scrutiny of matrix metalloproteinases in osteoclasts: evidence for heterogeneity and for the presence of MMPs synthesized by other cells. *Bone* 2004; 35: 1107-19.
6. Attwood JT, Yung RL, Richardson BC. DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59(2):241-57.
7. Auerkari EI. Methylation of tumor suppressor genes p16(INK4a), p27(Kip1) and E-cadherin in carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2006;42:5-13.
8. Avelar RL, Primo BT, Pinheiro-Nogueira CB, Studart-Soares EC, de Oliveira RB, Romulo de Medeiros J, Hernandez PA. Worldwide incidence of odontogenic tumors. *J Craniofac Surg.* 2011;22(6):2118-23.
9. Barnes L, Eveson JW, Reichart PA, Sidransky D, editors. World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of tumours of the head and neck. Lyon: IARC; 2005. p.282-326.
10. Barreto DC, Bale AE, De Marco L, Gomez RS. Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors. *J Dent Res.* 2002;81(11):757-60.

11. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, De Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res*. 2000;79(6):1418-22.
12. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. *Nature*. 2011 Aug 10;476(7359):163-9.
13. Beroukhim R, Lin M, Park Y, Hao K, Zhao X, Garraway LA, Fox EA, Hochberg EP, Mellinghoff IK, Hofer MD, Descazeaud A, Rubin MA, Meyerson M, Wong WH, Sellers WR, Li C. Inferring loss-of-heterozygosity from unpaired tumors using high-density oligonucleotide SNP arrays. *PLoS Comput Biol*. 2006;2(5):e41.
14. Bestor TH. The DNA methyltransferases of mammals. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:2395-402.
15. Bird A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev*. 2002;16:6-21.
16. Borkosky SS, Gunduz M, Beder L, Tsujigiwa H, Tamamura R, Gunduz E, Katase N, Rodriguez AP, Sasaki A, Nagai N, Nagatsuka H. Allelic loss of the ING gene family loci is a frequent event in ameloblastoma. *Oncol Res*. 2010;18(10):509-18.
17. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 1976;72:248-54.
18. Brew K, Dinakarandian D, Nagase H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000;1477(1-2):267-83.
19. Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell*. 1999;99(7):803-15.
20. Butler GS, Overall CM. Updated biological roles for matrix metalloproteinases and new "intracellular" substrates revealed by degradomics. *Biochemistry*. 2009;48(46):10830-45.
21. Calmon MF, Colombo J, Carvalho F, Souza FP, Filho JF, Fukuyama EE, Camargo AA, Caballero OL, Tajara EH, Cordeiro JA, Rahal P. Methylation profile of genes CDKN2A (p14 and p16), DAPK1, CDH1, and ADAM23 in head and neck cancer. *Cancer Genet Cytogenet*. 2007;173(1):31-7.
22. Carvalhais J, Aguiar M, Araújo V, Araújo N, Gomez R. p53 and MDM2 expression in odontogenic cysts and tumours. *Oral Dis*. 1999;5(3):218-22.

23. Chang C, Werb Z. The many faces of metalloproteases: cell growth, invasion, angiogenesis and metastasis. *Trends Cell Biol.* 2001;11;S37-S43.
24. Chang DT, López A, von Kessler DP, Chiang C, Simandl BK, Zhao R, Seldin MF, Fallon JF, Beachy PA. Products, genetic linkage and limb patterning activity of a murine hedgehog gene. *Development.* 1994;120(11):3339-53.
25. Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood* 2007;110:1411-9.
26. Chen MH, Wilson CW, Li YJ, Law KK, Lu CS, Gacayan R, Zhang X, Hui CC, Chuang PT. Cilium-independent regulation of Gli protein function by Sufu in Hedgehog signaling is evolutionarily conserved. *Genes Dev.* 2009;23(16):1910-28.
27. Chen X, Tukachinsky H, Huang CH, Jao C, Chu YR, Tang HY, Mueller B, Schulman S, Rapoport TA, Salic A. Processing and turnover of the Hedgehog protein in the endoplasmic reticulum. *J Cell Biol.* 2011;192(5):825-38
28. Chen Y, Struhl G. Dual roles for Patched in sequestering and transducing Hedgehog. *Cell* 1996;87:553-563.
29. Chenevix-Trench G, Wicking C, Berkman J, et al. Further localization of the gene for nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) in 15 Australasian families: linkage and loss of heterozygosity. *Am J Hum Genet* 1993;53:760-7.
30. Chernov AV, Sounni NE, Remacle AG, Strongin AY. Epigenetic control of the invasion-promoting MT1-MMP/MMP-2/TIMP-2 axis in cancer cells. *J Biol Chem.* 2009;284(19):12727-34.
31. Chevronnay HP, Selvais C, Emonard H, Galant C, Marbaix E, Henriët P. Regulation of matrix metalloproteinases activity studied in human endometrium as a paradigm of cyclic tissue breakdown and regeneration. *Biochim Biophys Acta.* 2011 (*in press*).
32. Chicoine E, Estève PO, Robledo O, Van Themsche C, Potworowski EF, St-Pierre Y. Evidence for the role of promoter methylation in the regulation of MMP-9 gene expression. *Biochem Biophys Res Commun.* 2002;297(4):765-72.
33. Clark IM, Swingler TE, Sampieri CL, Edwards DR. The regulation of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Int J Biochem Cell Biol* 2008;40(6-7):1362-78

34. Corbit KC, Aanstad P, Singla V, Norman AR, Stainier DY, Reiter JF. Vertebrate Smoothed functions at the primary cilium. *Nature*. 2005;437(7061):1018-21.
35. Couillard J, Estève PO, Pradhan S, St-Pierre Y. 5-aza-2'-deoxycytidine and interleukin-1 cooperate to regulate matrix metalloproteinase-3 gene expression. *Int J Cancer*. 2010 (in press)
36. Crowther M, Goodall S, Jones JL, et al. Localization of matrix metalloproteinase-2 within the aneurysmal and normal aortic wall. *Br J Surg*. 2000;87: 1391-1400.
37. Curran T, Ng JM. Cancer: Hedgehog's other great trick. *Nature*. 2008;455(7211):293-4.
38. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. *Nature*. 1997;389(6653):876-81.
39. Danaee H, Karagas MR, Kelsey KT, Perry AE, Nelson HH. Allelic loss at Drosophila patched gene is highly prevalent in Basal and squamous cell carcinomas of the skin. *J Invest Dermatol* 2006;126:1152–8.
40. Daskalos A, Nikolaidis G, Xinarianos G, Savvari P, Cassidy A, Zakopoulou R, Kotsinas A, Gorgoulis V, Field JK, Liloglou T. Hypomethylation of retrotransposable elements correlates with genomic instability in non-small cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2009;124:81–7.
41. Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. 2000;127(22):4775-85.
42. Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C. Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol*. 1999;9(19):1119-22.
43. Diniz MG, Borges ER, Guimarães AL, Moreira PR, Brito JA, Gomez MV, De Marco L, Gomez RS. PTCH1 isoforms in odontogenic keratocysts. *Oral Oncol*. 2009;45(3):291-5.
44. 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;40(3):277-80.

45. Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993;75(7):1417-30.
46. Eng C, Herman JG, Baylin SB. A bird's eye view of global methylation. *Nat Genet*. 2000;24(2):101-2.
47. Esteller M. Cancer Epigenetics for the 21st Century: What's Next? *Genes Cancer*. 2011 Jun;2(6):604-6.
48. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene*. 2002;21(35):5427-40.
49. Esteller M. Epigenetic changes in cancer. *F1000 Biol Rep*. 2011;3:9.
50. Fanjul-Fernández M, Folgueras AR, Cabrera S, López-Otín C. Matrix metalloproteinases: evolution, gene regulation and functional analysis in mouse models. *Biochim Biophys Acta*. 2010;1803(1):3-19.
51. Fazzari MJ, Grealley JM. Epigenomics: beyond CpG islands. *Nature Rev Gen*. 2004;5:446-455.
52. Fregnani ER, da Cruz Perez DE, de Almeida OP, Kowalski LP, Soares FA, de Abreu Alves F. Clinicopathological study and treatment outcomes of 121 cases of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010;39(2):145-9.
53. French SW, Dawson DW, Miner MD, Doerr JR, Malone CS, Wall R, Teitell MA. DNA methylation profiling: a new tool for evaluating hematologic malignancies. *Clin. Immunol*. 2002;103:217-230
54. Gailani MR, Ståhle-Bäckdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Undén AB, Dean M, Brash DE, Bale AE, Toftgård R. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*. 1996;14(1):78-81.
55. 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. *In press*.
56. Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen HP, Coleman H. Ameloblastomas. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World*

- Health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 296-300.
57. Gartel AL, Kandel ES. RNA interference in cancer. *Biomolecular Engineering* 2006; 23:17-32.
  58. Giulietti A, Overbergh L, Valckx D, Decallonne B, Bouillon R, Mathieu C. An overview of real-time quantitative PCR: applications to quantify cytokine gene expression. *Methods*. 2001;25(4):386-401.
  59. Goldenberg D, Harden S, Masayesva BG, Ha P, Benoit N, Westra WH, Koch WM, Sidransky D, Califano JA. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 2004;130(1):39-44.
  60. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999;286(5439):531-7.
  61. Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2009a;45:1011-4.
  62. Gomes CC, Duarte AP, Diniz MG, Gomez RS. Review article: Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(8):585-91.
  63. Gomes CC, Gomez RS. PTCH1 gene inactivation is not a Keratocystic odontogenic tumour exclusive alteration. *Oral Oncol*. 2011;47(3):226-7.
  64. Gomes CC, Oliveira CS, Castro WH, Lacerda JC, Gomez RS. Clonal nature of odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med* 2009b; 38: 397-400.
  65. Goodall S, Crowther M, Hemingway DM, Bell PR, Thompson MM. Ubiquitous elevation of matrix metalloproteinase-2 expression in the vasculature of patients with abdominal aneurysms. *Circulation*. 2001;104(3):304-9.
  66. Goodrich LV, Johnson RL, Milenkovic L, McMahon JA, Scott MP. Conservation of the hedgehog/patched signaling pathway from flies to mice: induction of a mouse patched gene by Hedgehog. *Genes Dev*. 1996;10(3):301-12.
  67. Grønbaek K, Hother C, Jones PA. Epigenetic changes in cancer. *APMIS*. 2007;115(10):1039-59.
  68. Hadler-Olsen E, Fadnes B, Sylte I, Uhlin-Hansen L, Winberg JO. Regulation of matrix metalloproteinase activity in health and disease. *FEBS J*.

2011;278(1):28-45.

69. Haneveld GT. An early 19th century case of ameloblastoma of the jaw. *Arch Chir Neerl.* 1977;29(1):9-17.
70. Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development.* 1998;125(15):2803-11.
71. Hasegawa M, Nelson HH, Peters E, Ringstrom E, Posner M, Kelsey KT. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene.* 2002;21(27):4231-6.
72. Hawthorn L, Luce J, Stein L, Rothschild J. Integration of transcript expression, copy number and LOH analysis of infiltrating ductal carcinoma of the breast. *BMC Cancer.* 2010;10:460.
73. Haycraft CJ, Banizs B, Aydin-Son Y, Zhang Q, Michaud EJ, Yoder BK. Gli2 and Gli3 localize to cilia and require the intraflagellar transport protein polaris for processing and function. *PLoS Genet.* 2005;1(4):e53.
74. Heikinheimo K, Salo T. Expression of basement membrane type IV collagen and type IV collagenases (MMP-2 and MMP-9) in human fetal teeth. *J Dent Res* 1995;74:1226-34.
75. Henriques AC, Vasconcelos MG, Galvão HC, de Souza LB, de Almeida Freitas R. Comparative analysis of the immunohistochemical expression of collagen IV, MMP-9, and TIMP-2 in odontogenic cysts and tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011;112(4):468-75.
76. Heppner, K. J., Matrisian, L. M., Jensen, R. A., and Rodgers, W. H. Expression of most matrix metalloproteinase family members in breast cancer represents a tumor induced host response. *Am. J. Pathol* 1996;149:273-282.
77. Heretsch P, Tzagkaroulaki L, Giannis A. Modulators of the hedgehog signaling pathway. *Bioorg Med Chem.* 2010;18(18):6613-24.
78. Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003;349:2042-54.
79. Hermann A, Gowher H, Jeltsch A. Biochemistry and biology of mammalian DNA methyltransferases. *Cell Mol Life Sci.* 2004;61:2571-2587
80. Hertog D, Bloemena E, Aartman IH, van der Waal I. Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years



- single institution experience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(1):e76-82.
81. Hertog D, Schulten EA, Leemans CR, Winters HA, Van der Waal I. Management of recurrent ameloblastoma of the jaws; a 40-year single institution experience. *Oral Oncol*. 2011;47:145-6.
  82. Hirayama T, Hamada T, Hasui K, Semba I, Murata F, Sugihara K. Immunohistochemical analysis of cell proliferation and suppression of ameloblastoma with special reference to plexiform and follicular ameloblastoma. *Acta Histochem Cytochem* 2004; 37: 391-8.
  83. Hooper JE, Scott MP. Communicating with hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6:306-317.
  84. Hsieh CL. Dynamics of DNA methylation pattern. *Curr Opin Genet Dev*. 2000;10:224-8.
  85. Huhtala P, Chow LT, Tryggvason K. Structure of the human type IV collagenase gene. *J Biol Chem*. 1990;265(19):11077-82.
  86. Ingham PW, Nakano Y, Seger C. Mechanisms and functions of Hedgehog signalling across the metazoa. *Nat Rev Genet*. 2011;12(6):393-406.
  87. Ivy RH, Churchill HR. The need of a standardized surgical and pathological classification of tumors and anomalies of dental origin. *Am Assoc Dent Sch Trans* 1930;7:240-245.
  88. Jääskeläinen K, Jee KJ, Leivo I, Saloniemi I, Knuutila S, Heikinheimo K. Cell proliferation and chromosomal changes in human ameloblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2002; 136: 31-7.
  89. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science*. 2001;293:1074-1080.
  90. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet*. 1999;21:163-167.
  91. Kim DH, Nelson HH, Wiencke JK, Zheng S, Christiani DC, Wain JC, Mark EJ, Kelsey KT. p16(INK4a) and histology-specific methylation of CpG islands by exposure to tobacco smoke in non-small cell lung cancer. *Cancer Res*. 2001;61(8):3419-24.

92. Kim J, Kato M, Beachy PA. Gli2 trafficking links Hedgehog-dependent activation of *Smoothed* in the primary cilium to transcriptional activation in the nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009a;106(51):21666-71.
93. Kim MK, Shin JM, Eun HC, Chung JH. The role of p300 histone acetyltransferase in UV-induced histone modifications and MMP-1 gene transcription. *PLoS One*. 2009b;4(3):e4864.
94. Kim YI. Folate and DNA methylation: a mechanistic link between folate deficiency and colorectal cancer? *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13:511-9.
95. Kitkumthorn N, Mutirangura A. LINE-1 methylation difference between ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Oral Dis* 2010;16:286-91.
96. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 1971; 68: 820-823.
97. Koonin EV. A protein splice-junction motif in hedgehog family proteins. *Trends Biochem Sci*. 1995;20(4):141-2.
98. 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* 2004b;33:292-9.
99. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of Sonic Hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. *J. Oral Pathol. Med*. 2004a;33:185-190.
100. Kumamoto H, Ooya K. Expression of bone morphogenetic proteins and their associated molecules in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis*. 2006;12(2):163-70.
101. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of beta-catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med* 2005;3: 401-6.
102. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of phosphorylated Akt, PI3K, and PTEN in ameloblastic tumours. *Oral Dis* 2007;13:461-7.
103. Kumamoto H, Yamauchi K, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(2):114-20.

104. Lench NJ, High AS, Markham AF, Hume WJ, Robinson PA. Investigation of chromosome 9q22.3-q31 DNA marker loss in odontogenic keratocysts. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996;32B(3):202-6.
105. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat Genet* 1996;12:85-7.
106. Levanat S, Pavelić B, Crnić I, Oresković S, Manojlović S. Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts. *J Mol Med* 2000;78(3):140-6.
107. Levi E, Fridman R, Miao HQ, Ma YS, Yayon A, Vlodavsky I. Matrix metalloproteinase 2 releases active soluble ectodomain of fibroblast growth factor receptor 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:7069-7074.
108. Li LC and Dahiya R. MethPrimer: designing primers for methylation PCRs. *Bioinformatics* 2002;18:1427-31.
109. Liu A, Wang B, Niswander LA. Mouse intraflagellar transport proteins regulate both the activator and repressor functions of Gli transcription factors. *Development.* 2005 Jul;132(13):3103-11.
110. Liu ZJ, Maekawa M. Polymerase chain reaction-based methods of DNA methylation analysis. *Anal Biochem.* 2003;317(2):259-65.
111. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods* 2001;25:402-8.
112. Lopez-Serra P, Esteller M. DNA methylation-associated silencing of tumor-suppressor microRNAs in cancer. *Oncogene.* 2011 (*in press*).
113. Luczak MW, Jagodziński PP. The role of DNA methylation in cancer development. *Folia Histochem Cytobiol.* 2006;44(3):143-54.
114. Lujambio A, Portela A, Liz J, Melo SA, Rossi S, Spizzo R, Croce CM, Calin GA, Esteller M. CpG island hypermethylation-associated silencing of non-coding RNAs transcribed from ultraconserved regions in human cancer. *Oncogene.* 2010;29(48):6390-401
115. Luo HY, Yu SF, Li TJ. Differential expression of apoptosis-related proteins in various cellular components of ameloblastomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(8):750-5.
116. Ma Z, Shah RC, Chang MJ, Benveniste EN. Coordination of cell signaling, chromatin remodeling, histone modifications, and regulator recruitment in

- human matrix metalloproteinase 9 gene transcription. *Mol Cell Biol.* 2004;24(12):5496-509.
117. Malčić A, Jukić S, Anić I, Pavelić B, Kapitanović S, Kruslin B, Pavelić K. Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(5):294-301.
  118. Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that Patched is the Hedgehog receptor. *Nature* 1996;384:176-179.
  119. Martín-Subero JI, Esteller M. Profiling epigenetic alterations in disease. *Adv Exp Med Biol.* 2011;711:162-77
  120. McQuibban GA, Butler GS, Gong JH, Bendall L, Power C, Clark-Lewis I, Overall CM. Matrix metalloproteinase activity inactivates the CXC chemokine stromal cell-derived factor-1. *J Biol Chem* 2001;276:43503-43508.
  121. Melo S, Villanueva A, Moutinho C, Davalos V, Spizzo R, Ivan C *et al.* Small molecule enoxacin is a cancer-specific growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(11):4394-9.
  122. 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.
  123. Moreira PR, Cardoso FP, Brito JA, Batista AC, Gomes CC, Gomez RS. Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. *Braz Dent J.* 2011;22(5):422-7.
  124. Moreira PR, Guimarães MM, Gomes CC, Diniz MG, Brito JA, de Castro WH, Gomez RS. Methylation frequencies of cell-cycle associated genes in epithelial odontogenic tumours. *Arch Oral Biol.* 2009a;54(10):893-7
  125. Moreira PR, Guimarães MM, Guimarães AL, Diniz MG, Gomes CC, Brito JA, Gomez RS. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med.* 2009b;38(1):99-103.
  126. Morgan PR. Odontogenic tumors: a review. *Periodontol* 2000. 2011;57(1):160-76.
  127. Nagase H, Barrett AJ, Woessner JF Jr. Nomenclature and glossary of the matrix metalloproteinases. *Matrix Suppl.* 1992;1,421-424.
  128. Nagase H. Activation mechanisms of matrix metalloproteinases. *Biol Chem*

- 1997;378:151-160.
129. Nagatsuka H, Han PP, Tsujigiwa H, Siar CH, Gunduz M, Sugahara T, Sasaki A, Nakajima M, Naomoto Y, Nagai N. Heparanase gene and protein expression in ameloblastoma: possible role in local invasion of tumor cells. *Oral Oncol.* 2005;41: 542-548.
  130. Nakamura T, Sunami E, Nguyen T, Hoon DS. Analysis of loss of heterozygosity in circulating DNA. *Methods Mol Biol.* 2009;520:221-9.
  131. Nakano K, Siar CH, Nagai N, Naito I, Sado Y, Nagatsuka H, Hoh C, Kurada K, Tsujigiwa H, Gunduz M. Distribution of basement membrane type IV collagen alpha chains in ameloblastoma: an immunofluorescence study. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(8):494-9.
  132. Nan X, Campoy FJ, Bird A. MeCP2 is a transcriptional repressor with abundant binding sites in genomic chromatin. *Cell.* 1997;88(4):471-81.
  133. Nodit L, Barnes L, Childers E, Finkelstein S, Swalsky P, Hunt J. Allelic loss of tumour suppressor genes in ameloblastic tumours. *Mod Pathol* 2004; 17: 1062-7.
  134. Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature* 1980; 287(5785):795-801.
  135. of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathology* 2004, 45:65-72.
  136. Oricchio E, Sciamanna I, Beraldi R, Tolstonog GV, Schumann GG, Spadafora C. Distinct roles for LINE-1 and HERV-K retroelements in cell proliferation, differentiation and tumor progression. *Oncogene.* 2007;26(29):4226-33.
  137. Osaki M, Takeshita F, Sugimoto Y, Kosaka N, Yamamoto Y, Yoshioka Y, Kobayashi E, Yamada T, Kawai A, Inoue T, Ito H, Oshimura M, Ochiya T. MicroRNA-143 regulates human osteosarcoma metastasis by regulating matrix metalloprotease-13 expression. *Mol Ther.* 2011;19(6):1123-3.
  138. Page-McCaw A, Ewald AJ, Werb Z. Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(3):221-33.
  139. Palacios J, Sarrió D, García-Macias MC, Bryant B, Sobel ME, Merino MJ. Frequent E-cadherin gene inactivation by loss of heterozygosity in pleomorphic lobular carcinoma of the breast. *Mod Pathol.* 2003;16(7):674-8.
  140. Pan S, Dong Q, Sun LS, Li TJ. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: modification of the two-hit hypothesis. *Clin Cancer Res.* 2010;16(2):442-50.

141. Pan Y, Bai CB, Joyner AL, Wang B. Sonic hedgehog signaling regulates Gli2 transcriptional activity by suppressing its processing and degradation. *Mol Cell Biol.* 2006;26(9):3365-77.
142. Pattamadilok J, Huapai N, Rattanatanyong P et al. LINE-1 hypomethylation level as a potential prognostic factor for epithelial ovarian cancer. *Int J Gynecol Cancer* 2008;18:711-717.
143. Pavelić B, Levanat S, Crnić I, Kobler P, Anić I, Manojlović S, Sutalo J. PTCH gene altered in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med.* 2001;30(9):569-76.
144. Peacock ZS, Cox D, Schmidt BL. Involvement of PTCH1 mutations in the calcifying epithelial odontogenic tumor. *Oral Oncol.* 2010;46(5):387-92.
145. Pei D, Weiss SJ. Furin-dependent intracellular activation of the human stromelysin-3 zymogen. *Nature.* 1995;375(6528):244-7.
146. Perdigão PF, Gomez RS, Pimenta FJ, De Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncol.* 2004;40(8):841-6.
147. Peters C, Wolf A, Wagner M, Kuhlmann J, Waldmann H. The cholesterol membrane anchor of the Hedgehog protein confers stable membrane association to lipid-modified proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101(23):8531-6.
148. Piattelli A, Fioroni M, Santinelli A, Rubini C. Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts. *Oral Oncol* 1998; 34: 408-12.
149. Pinheiro JJ, Freitas VM, Moretti AI, Jorge AG, Jaeger RG. Local invasiveness of ameloblastoma. Role played by matrix metalloproteinases and proliferative activity. *Histopathol.* 2004; 45(1): 65-72.
150. Ploussard G, Soliman H, Dubosq F, Méria P, Vérine J, Desgrand-Champs F, Dethé H, Mongiat-Artus P. The prognostic value of FGFR3 mutational status for disease recurrence and progression depends on allelic losses at 9p22. *Am J Cancer Res.* 2011;1(4):498-507
151. Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev* 2000;14:1837-51.
152. Puente XS, Sánchez LM, Overall CM, López-Otín C. Human and mouse proteases: a comparative genomic approach. *Nat Rev Genet.* 2003;4(7):544-58

153. Qian Y, Huang HZ. The role of RANKL and MMP-9 in the bone resorption caused by ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(8):592-8.
154. Qin L, Han YP. Epigenetic repression of matrix metalloproteinases in myofibroblastic hepatic stellate cells through histone deacetylases 4: implication in tissue fibrosis. *Am J Pathol.* 2010;177(4):1915-28.
155. Quillard T, Tesmenitsky Y, Croce K, Travers R, Shvartz E, Koskinas KC, Sukhova GK, Aikawa E, Aikawa M, Libby P. Selective inhibition of matrix metalloproteinase-13 increases collagen content of established mouse atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2011;31(11):2464-72.
156. Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res.* 1997;57(5):842-5.
157. Rastogi S, Nijhawan S, Modi M, Kumar A, Aslam N, Latheef F. A large mixed radiolucent-radiopaque lesion in the mandible-a novel diagnostic approach. *Journal of Clinical and Diagnostic Research [serial online]* 2010;4:2300-2307.
158. Razin A. CpG methylation, chromatin structure and gene silencing-a three-way connection. *EMBO J.* 1998;17:4905-4908.
159. Reichart PA, Philipsen HP, Sciubba JJ. The new classification of Head and Neck Tumours (WHO)--any changes? *Oral Oncol.* 2006;42(8):757-8.
160. Ribeiro BF, Iglesias DP, Nascimento GJ, Galvão HC, Medeiros AM, Freitas RA. Immunoexpression of MMPs-1, -2, and -9 in ameloblastoma and odontogenic adenomatoid tumor. *Oral Dis.* 2009;15(7):472-7.
161. Richardson B. Impact of aging on DNA methylation. *Ageing Res Rev.* 2003;2(3):245-61.
162. Riddle RD, Johnson RL, Laufer E, Tabin C. Sonic hedgehog mediates the polarizing activity of the ZPA. *Cell.* 1993;75(7):1401-16.
163. Roach HI, Yamada N, Cheung KS, et al. Association between the abnormal expression of matrix-degrading enzymes by human osteoarthritic chondrocytes and demethylation of specific CpG sites in the promoter regions. *Arthritis Rheum* 2005;52:3110-24.
164. Robert MF, Morin S, Beaulieu N, Gauthier F, Chute IC, Barsalou A, MacLeod AR. DNMT1 is required to maintain CpG methylation and aberrant gene silencing in human cancer cells. *Nat Genet.* 2003;33(1):61-5.

165. Rohatgi R, Milenkovic L, Corcoran RB, Scott MP. Hedgehog signal transduction by Smoothed: pharmacologic evidence for a 2-step activation process. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(9):3196-201.
166. Rohatgi R, Scott MP. Patching the gaps in Hedgehog signalling. *Nat Cell Biol.* 2007;9(9):1005-9.
167. Rowe RG, Weiss SJ. Breaching the basement membrane: who, when and how? *Trends Cell Biol.* 2008;18(11):560-74.
168. Roy S, Khanna S, Hussain SR, Biswas S, Azad A, Rink C, Gnyawali S, Shilo S, Nuovo GJ, Sen CK. MicroRNA expression in response to murine myocardial infarction: miR-21 regulates fibroblast metalloprotease-2 via phosphatase and tensin homologue. *Cardiovasc Res.* 2009;82(1):21-9.
169. Roy S, Samanta K, Chakraborti T, Chowdhury A, Chakraborti S. Role of TGF- $\beta$ 1 and TNF- $\alpha$  in IL-1 $\beta$  mediated activation of proMMP-9 in pulmonary artery smooth muscle cells: involvement of an aprotinin sensitive protease. *Arch Biochem Biophys.* 2011;513(1):61-9.
170. Ruiz-Gómez A, Molnar C, Holguín H, Mayor F, de Celis JF. The cell biology of Smo signalling and its relationships with GPCRs. *Biochim. Biophys. Acta* 2007;1768(4):901-12.
171. Rush LJ, Plass C. Alterations of DNA methylation in hematologic malignancies. *Cancer Letters.* 2002;185:1-12.
172. Sahlberg C, Reponen P, Tryggvason K, Thesleff I. Timp-1, -2 and -3 show coexpression with gelatinases A and B during mouse tooth morphogenesis. *Eur J Oral Sci* 1999;107:121-30.
173. Saku T, Okabe H, Shimokawa H. Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med* 1992; 21:113-9.
174. Sanchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004 ;101(34):12561-6.
175. Sandra F, Hendarmin L, Kukita T, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S. Ameloblastoma induces osteoclastogenesis: a possible role of ameloblastoma in expanding in the bone. *Oral Oncol* 2005; 41: 637-44.
176. Sandra F, Nakamura N, Kanematsu T, Hirata M, Ohishi M. The role of MDM2 in the proliferative activity of ameloblastoma. *Oral Oncol* 2002; 38: 153-7.



177. Sandra F, Nakamura N, Mitsuyasu T, Shiratsuchi Y, Ohishi M. Two relatively distinct patterns of ameloblastoma: an anti-apoptotic proliferating site in the outer layer (periphery) and a pro-apoptotic differentiating site in the inner layer (centre). *Histopathology* 2001; 39: 93–8.
178. Sarkar L, Sharpe PT. Expression of Wnt signaling pathway genes during tooth development. *Mech Dev.* 1999;85:197-200.
179. Sasaki H, Hui C, Nakafuku M, Kondoh H. A binding site for Gli proteins is essential for HNF-3beta floor plate enhancer activity in transgenics and can respond to Shh in vitro. *Development.* 1997;124(7):1313-22.
180. Sauk JJ, Nikitakis NG, Scheper MA. Are we on the brink of nonsurgical treatment for ameloblastoma? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(1):68-78.
181. Schulz WA. L1 retrotransposons in human cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2006;2006(1):83672.
182. Shaw RJ, Hall GL, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Field JK et al. Quantitative methylation analysis of resection margins and lymph nodes in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2007;45(8):617-22.
183. Shibata T, Nakata D, Chiba I, et al. Detection of TP53 mutation in ameloblastoma by the use of a yeast functional assay. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 534–8.
184. Shukeir N, Pakneshan P, Chen G, Szyf M, Rabbani SA. Alteration of the methylation status of tumor-promoting genes decreases prostate cancer cell invasiveness and tumorigenesis in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 2006;66(18):9202-10.
185. Singal R, Ginder GD. DNA methylation. *Blood.* 1999;93(12):4059-4070.
186. Siqueira AS, Carvalho MR, Monteiro AC, Freitas VM, Jaeger RG, Pinheiro JJ. Matrix metalloproteinases, TIMPs and growth factors regulating ameloblastoma behaviour. *Histopathology* 2010;57(1):128-37.
187. Slootweg PJ. Odontogenic tumours-An update. *Curr Diagn Pathol.* 2006;12(1):54-65.
188. Snoek-van Beurden PA, Von den Hoff JW. Zymographic techniques for the analysis of matrix metalloproteinases and their inhibitors. *Biotechniques* 2005;38:73-83.
189. Sorsa T, Tjäderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral

- diseases. *Oral Dis.* 2004;10(6):311-8
190. St Laurent G 3rd, Hammell N, McCaffrey TA. A LINE-1 component to human aging: do LINE elements exact a longevity cost for evolutionary advantage? *Mech Ageing Dev.* 2010;131(5):299-305.
  191. Stecca B, Ruiz I, Altaba A. Context-dependent regulation of the GLI code in cancer by HEDGEHOG and non-HEDGEHOG signals. *J Mol Cell Biol* 2010;2:84-95.
  192. Sternlicht MD, Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17; 463-516.
  193. Stolf DP, Karim AC, Banerjee AG. Genetic aspects of ameloblastoma: a brief review. *Biotechnology and Molecular Biology Review* 2007;2(5):116-122.
  194. Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature.* 1996;384(6605):129-34.
  195. Subbalekha K, Pimkhaokham A, Pavasant P et al. Detection of LINE-1s hypomethylation in oral rinses of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol* 2009;45:184-191.
  196. Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature.* 2002;418(6900):892-7.
  197. Takahashi S, Kawashima N, Sakamoto K, Nakata A, Kameda T, Sugiyama T, Katsube K, Suda H. Differentiation of an ameloblast-lineage cell line (ALC) is induced by Sonic hedgehog signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2007;353(2):405-11.
  198. Tanahashi J, Daa T, Yada N, Kashima K, Kondoh Y, Yokoyama S. Mutational analysis of Wnt signaling molecules in ameloblastoma with aberrant nuclear expression of beta-catenin. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 565-70.
  199. Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature.* 2003;425(6960):851-6.
  200. Tian H, Huang ML, Liu KY, Jia ZB, Sun L, Jiang SL, Liu W, Kinkaid HY, Wu J, Li RK. Inhibiting matrix metalloproteinase by cell-based TIMP-3 gene transfer effectively treats acute and chronic ischemic cardiomyopathy. *Cell Transplant.* 2011 (*in press*).

201. Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Han PP, Gunduz M, Siar CH, Oida S, Nagai N. Analysis of amelogenin gene (AMGX, AMGY) expression in ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2005;41(8):843-50.
202. Uchida K, Oga A, Nakao M, Mano T, Mihara M, Kawauchi S, Furuya T, Ueyama Y, Sasaki K. Loss of 3p26.3 is an independent prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 2011;26(2):463-9.
203. Undén AB, Zaphiropoulos PG, Bruce K, Toftgård R, Ståhle-Bäckdahl M. Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1997;57(12):2336-40.
204. Van Dam SD, Unni KK, Keller EE. Metastasizing (malignant) ameloblastoma: review of a unique histopathologic entity and report of Mayo Clinic experience. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(12):2962-74
205. Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA, Snow GB, Brakenhoff RH. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res.* 2000;6(10):3803-16.
206. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(14):5578-82.
207. Varjosalo M, Taipale J. Hedgehog: functions and mechanisms. *Genes Dev.* 2008;22(18):2454-72.
208. Varnat F, Duquet A, Malerba M, Zbinden M, Mas C, Gervaz P, Ruiz i Altaba A. Human colon cancer epithelial cells harbour active HEDGEHOG-GLI signalling that is essential for tumour growth, recurrence, metastasis and stem cell survival and expansion. *EMBO Mol Med.* 2009;1(6-7):338-51.
209. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med* 2009;38:597-604.
210. Vertino PM, Issa JP, Pereira-Smith OM, Baylin SB. Stabilization of DNA methyltransferase levels and CpG island hypermethylation precede SV40-induced immortalization of human fibroblasts. *Cell Growth Differ.* 1994;5(12):1395-402.
211. Visse R, Nagase H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases. *Circ. Res.* 2003; 92; 827-839.

212. Vorechovský I, Tingby O, Hartman M, et al. Somatic mutations in the human homologue of *Drosophila* patched in primitive neuroectodermal tumours. *Oncogene* 1997;15:361-6.
213. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(4):275-83.
214. Wang A, Zhang B, Huang H, Zhang L, Zeng D, Tao Q, Wang J, Pan C. Suppression of local invasion of ameloblastoma by inhibition of matrix metalloproteinase-2 in vitro. *BMC cancer.* 2008;8:182.
215. Wang B, Fallon JF, Beachy PA. Hedgehog-regulated processing of Gli3 produces an anterior/posterior repressor gradient in the developing vertebrate limb. *Cell.* 2000;100(4):423-34.
216. Wang Y, Xu HT, Ueda Y, Shimasaki M, Wang EH: Activation ratio of MMP-2 and expression of MT1-MMP are correlated in thymic epithelial tumours. *Pathology* 2007, 39:486-490.
217. Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003;422(6929):313-7.
218. Weissbach A. A chronicle of DNA methylation (1948-1975). *EXS.* 1993;64:1.
219. Wetmore C, Eberhart DE, Curran T. The normal patched allele is expressed in medulloblastomas from mice with heterozygous germ-line mutation of patched. *Cancer Res* 2000;60:239-46.
220. Xia H, Qi Y, Ng SS, Chen X, Li D, Chen S, Ge R, Jiang S, Li G, Chen Y, He ML, Kung HF, Lai L, Lin MC. microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Res.* 2009;1269:158-65.
221. Xiao Y, Word B, Starlard-Davenport A, Haefele A, Lyn-Cook BD, Hammons G. Age and gender affect DNMT3a and DNMT3b expression in human liver. *Cell Biol Toxicol.* 2008;24(3):265-72.
222. Xing EP, Yang GY, Wang LD, Shi ST, Yang CS. Loss of heterozygosity of the Rb gene correlates with pRb protein expression and associates with p53 alteration in human esophageal cancer. *Clin Cancer Res.* 1999;5(5):1231-40.
223. Yan C, Boyd DD. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol.* 2007;211(1):19-26.
224. Yan W, Zhang W, Sun L, Liu Y, You G, Wang Y, Kang C, You Y, Jiang T. Identification of MMP-9 specific microRNA expression profile as potential

- targets of anti-invasion therapy in glioblastoma multiforme. *Brain Res.* 2011;1411:108-15.
225. Yauch RL, Gould SE, Scales SJ, Tang T, Tian H, Ahn CP, Marshall D, Fu L, Januario T, Kallop D, Nannini-Pepe M, Kotkow K, Marsters JC, Rubin LL, de Sauvage FJ. A paracrine requirement for hedgehog signalling in cancer. *Nature.* 2008;455(7211):406-10.
  226. Zhang B, Pan X, Cobb, GP, Anderson TA. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology,* 2007; 302(1):1-12.
  227. Zhang B, Zhang J, Huang HZ, Chen WL, Tao Q, Zeng DL, Zhang LT, Xu JH. Inhibition of ameloblastoma invasion in vitro and in vivo by inhibitor of metalloproteinase-2 activity. *J Oral Pathol Med.* 2009a;38:731-736.
  228. Zhang B, Zhang J, Huang HZ, Xu ZY, Xie HL. Expression and role of metalloproteinase-2 and endogenous tissue regulator in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 2010b;39(3):219-22
  229. Zhang B, Zhang J, Xu ZY, Xie HL. Expression of RECK and matrix metalloproteinase-2 in ameloblastoma. *BMC Cancer.* 2009b;9:427.
  230. Zhang L, Chen XM, Sun ZJ, Bian Z, Fan MW, Chen Z. Epithelial expression of SHH signaling pathway in odontogenic tumors. *Oral.Oncol.* 2006;42: 398-408.
  231. Zhang L, Zeng D, Huang H, Wang J, Tao Q, Pan C, Xu J, Zhang B, Wang A. Tissue inhibitor of metalloproteinase-2 inhibits ameloblastoma growth in a new mouse xenograft disease model. *J Oral Pathol Med.* 2010a;39(1):94-102.
  232. Zhou CX, Gao Y, Johnson NW, Gao J. Expression of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in the metastasis of squamous cell carcinoma of the human tongue. *Aust Dent J.* 2010;55(4):385-9.
  233. Zikan M, Bohm J, Pavlista D, Cibula D. Comparative analysis of loss of heterozygosity and expression profile in normal tissue, DCIS and invasive breast cancer. *Clin Transl Oncol.* 2011;13(9):652-5.
  234. Zurawel RH, Allen C, Wechsler-Reya R, Scott MP, Raffel C. Evidence that haploinsufficiency of Ptch leads to medulloblastoma in mice. *Genes Chromosomes Cancer* 2000;28:77-81.

**ANEXOS****ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG**

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

**Projeto: CAAE – 0266.0.203.000-11**

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

**DECISÃO**

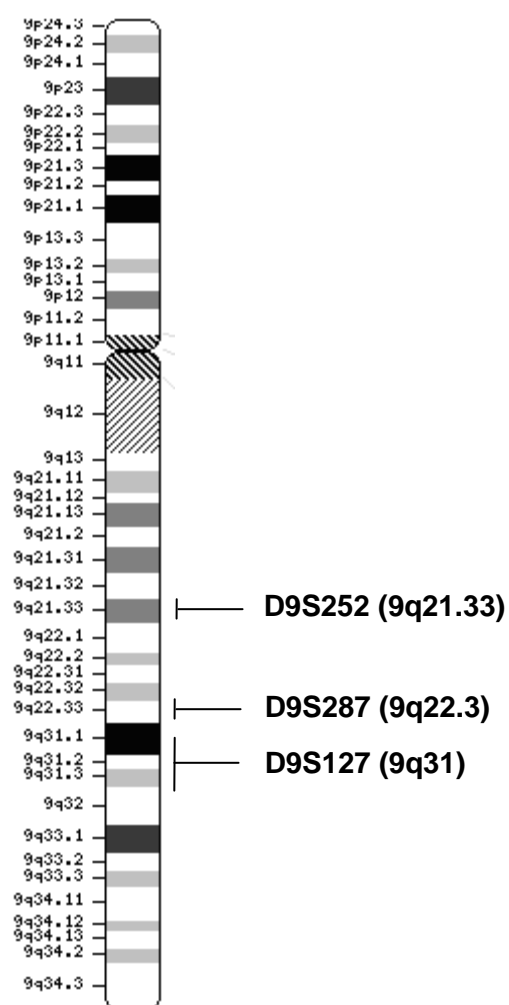
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 19 de agosto de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo da perda de heterozigosidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinases da matriz em ameloblastoma"** bem 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.



**Prof. Maria Teresa Marques Amaral  
Coordenadora do COEP-UFMG**

**ANEXO II - Ilustração representativa da localização dos marcadores microssatélites no braço longo do cromossomo 9**



\* Disponível em [www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mapview)

## ANEXO III - Normas de publicação do periódico “Tumor Biology - ISSN: 1010-4283”

### Tumor Biology

---

Tumor Markers, Tumor Targeting and Translational Cancer Research

ISSN: 1010-4283 (print version)

 2010 Impact Factor

2.026

## Instructions for authors

### Types of papers

Research Articles, Review Articles, Research commentaries, Workshop Reports and Clinical Guidelines.

### Manuscript submission

Submission of a manuscript implies: that the work described has not been published before; that it is not under consideration for publication anywhere else; that its publication has been approved by all co-authors, if any, as well as by the responsible authorities – tacitly or explicitly – at the institute where the work has been carried out. The publisher will not be held legally responsible should there be any claims for compensation.

### Permissions

Authors wishing to include figures, tables, or text passages that have already been published elsewhere are required to obtain permission from the copyright owner(s) for both the print and online format and to include evidence that such permission has been granted when submitting their papers. Any material received without such evidence will be assumed to originate from the authors.

### Online Submission

Authors should submit their manuscripts online. Electronic submission substantially reduces the editorial processing and reviewing times and shortens overall publication times. Please follow the hyperlink “Submit online” on the right and upload all of your manuscript files following the instructions given on the screen.

### Title Page

The title page should include:

- The name(s) of the author(s)
- A concise and informative title
- The affiliation(s) and address(es) of the author(s)
- The e-mail address, telephone and fax numbers of the corresponding author



## Abstract

Please provide an abstract of 150 to 250 words. The abstract should not contain any undefined abbreviations or unspecified references.

## Keywords

Please provide 4 to 6 keywords which can be used for indexing purposes.

## Text Formatting

Manuscripts should be submitted in Word.

- Use a normal, plain font (e.g., 10-point Times Roman) for text.
- Use italics for emphasis.
- Use the automatic page numbering function to number the pages.
- Do not use field functions.
- Use tab stops or other commands for indents, not the space bar.
- Use the table function, not spreadsheets, to make tables.
- Use the equation editor or MathType for equations.
- Save your file in docx format (Word 2007 or higher) or doc format (older Word versions).
- Word template (zip, 154 kB)

Manuscripts with mathematical content can also be submitted in LaTeX.

- LaTeX macro package (zip, 182 kB)

## Headings

Please use no more than three levels of displayed headings.

## Abbreviations

Abbreviations should be defined at first mention and used consistently thereafter.

## Footnotes

Footnotes can be used to give additional information, which may include the citation of a reference included in the reference list. They should not consist solely of a reference citation, and they should never include the bibliographic details of a reference. They should also not contain any figures or tables.

Footnotes to the text are numbered consecutively; those to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data). Footnotes to the title or the authors of the article are not given reference symbols.

Always use footnotes instead of endnotes.

## Acknowledgments

Acknowledgments of people, grants, funds, etc. should be placed in a separate section before the reference list. The names of funding organizations should be written in full.

## References

### Citation

Reference citations in the text should be identified by numbers in square brackets. Some examples:

1. Negotiation research spans many disciplines [3].
2. This result was later contradicted by Becker and Seligman [5].
3. This effect has been widely studied [1-3, 7].

### Reference list

The list of references should only include works that are cited in the text and that have been published or accepted for publication. Personal communications and unpublished works should only be mentioned in the text. Do not use footnotes or endnotes as a substitute for a reference list.

The entries in the list should be numbered consecutively.

- Journal article

Gamelin FX, Baquet G, Berthoin S, Thevenet D, Nourry C, Nottin S, Bosquet L (2009) Effect of high intensity intermittent training on heart rate variability in prepubescent children. *Eur J Appl Physiol* 105:731-738. doi: 10.1007/s00421-008-0955-8

Ideally, the names of all authors should be provided, but the usage of “et al” in long author lists will also be accepted:

Smith J, Jones M Jr, Houghton L et al (1999) Future of health insurance. *N Engl J Med* 341:325–329

- Article by DOI

Slifka MK, Whitton JL (2000) Clinical implications of dysregulated cytokine production. *J Mol Med*. doi:10.1007/s001090000086

- Book

South J, Blass B (2001) *The future of modern genomics*. Blackwell, London

- Book chapter

Brown B, Aaron M (2001) The politics of nature. In: Smith J (ed) *The rise of modern genomics*, 3rd edn. Wiley, New York, pp 230-257

- Online document

Cartwright J (2007) Big stars have weather too. *IOP Publishing PhysicsWeb*. <http://physicsweb.org/articles/news/11/6/16/1>. Accessed 26 June 2007

- Dissertation

Trent JW (1975) *Experimental acute renal failure*. Dissertation, University of California

Always use the standard abbreviation of a journal’s name according to the ISSN List of Title Word Abbreviations, see

- [www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php](http://www.issn.org/2-22661-LTWA-online.php)

For authors using EndNote, Springer provides an output style that supports the formatting of in-text citations and reference list.

- EndNote style (zip, 2 kB)

Authors preparing their manuscript in LaTeX can use the bibtex file `sbasic.bst` which is included in Springer’s LaTeX macro package.

## Tables

- All tables are to be numbered using Arabic numerals.
- Tables should always be cited in text in consecutive numerical order.

- For each table, please supply a table caption (title) explaining the components of the table.
- Identify any previously published material by giving the original source in the form of a reference at the end of the table caption.
- Footnotes to tables should be indicated by superscript lower-case letters (or asterisks for significance values and other statistical data) and included beneath the table body.

### **Conflict of interest**

Authors must indicate whether or not they have a financial relationship with the organization that sponsored the research. This note should be added in a separate section before the reference list.

If no conflict exists, authors should state: The authors declare that they have no conflict of interest.

## ANEXO IV - Normas de publicação do periódico “Human Pathology Journal - ISSN 0046-8177”



### Facts & Figures

Impact Factor: 2.998  
 5-Year Impact Factor: 3.149  
 Issues per year: 12

### Submission of Manuscripts

**Original articles** are considered for publication in Human Pathology providing that they have never been published and are not under simultaneous review by another journal. Original articles should be submitted as follows.

All **original contributions** (including case studies) should be submitted electronically, if possible, to <http://ees.elsevier.com/yhupa>. Authors are requested to submit the text, tables, and artwork in electronic form to this address. In an accompanying letter, authors should state that the manuscript, or parts of it, have not been and will not be submitted elsewhere for publication. **Authors are highly encouraged to include a list of three or more potential reviewers for their manuscript, with complete contact information including e-mail address.** Submission items include a cover letter, the manuscript (including title page, abstract, manuscript text, references, and table/figure legends), tables, and figures. In addition, a letter of submission signed by all of the authors acknowledging responsibility for the work and identifying any potential conflicts of interest must be included. Where digital or scanned signatures cannot be provided, authors may send a duplicate signed copy to the Editorial Office by fax or courier. Revised manuscripts should also be accompanied by a unique file (separate from the covering letter) with responses to reviewers' comments. The preferred order of files is as follows: cover letter, response to reviews (revised manuscripts only), manuscript file(s), table(s), figure(s). Files should be labeled with appropriate and descriptive file names (e.g., SmithText.doc, Fig1.eps, Table3.doc). Upload text, tables and graphics as separate files. Do not import figures or tables into the text document. Complete instructions for electronic artwork submission can be found on the Author Gateway, accessible through the journal home page.

Authors with circumstances that prevent online submission (except for those from the UK and Western Europe) should send their manuscripts to Chris Reyes, *Human Pathology* Editorial Office, Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Wisconsin, 600 Highland Ave., Madison, WI 53792; Tel: 608-262-1868; Fax: 608-265-4393; E-mail: [cmreyes@wisc.edu](mailto:cmreyes@wisc.edu)

Manuscript submissions from the UK and Western Europe can be sent to Vincenzo Eusebi, MD, Università Bologna, Servizio Anatomia Patologica, Ospedale Bellaria, Via Altura 3, Bologna, Italy 40139; Tel: +39 051 6225750; E-mail: [Vincenzo.Eusebi@ausl.bo.it](mailto:Vincenzo.Eusebi@ausl.bo.it).

Unless otherwise dictated, the requirements of this journal are in accordance with the International Committee of Medical Journal Editors' Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals (Ann Intern Med 108:258-265, 1988).

**Editorials, Current Topics, Pathology Education, Progress in Pathology, and Perspectives in Pathology** are published by invitation only.

### **Original Contributions**

**Original Contributions** should not exceed 30 double-spaced typewritten pages, including tables, figures and references. Space limitations preclude the publication of excessive figures. A maximum of eight plates will ordinarily be sufficient to illustrate key points. References should be limited to 35. Manuscripts submitted as **Original Contributions** that exceed these limits at the discretion of the editorial board will be returned without review.

### **Case Studies**

**Case Studies** must provide new information. Clinically significant observations based on new or developing technology will receive special consideration. Imaginative applications of established methods are also encouraged. Brevity is required: **Case Studies** must not be more than 10 double-spaced typewritten pages, including tables, figures and references. The number of references should be 15 or less, and the number of figures should be 3 or less. Manuscripts submitted as **Case Studies** that do not conform to these requirements will be returned without review.

### **Letters to the Editor**

HUMAN PATHOLOGY encourages letters to the editor, which will be published at the discretion of the editor as space permits and are subject to editing and abridgment for length, and on the understanding that submitting the letter to us constitutes your permission for its publication in any current or subsequent issue or edition of the Journal, in any form or media, now known or hereafter developed, and your affirmation that the letter has not been submitted or published elsewhere. They should be submitted electronically, typewritten, and double spaced. They must be limited to approximately 500 words and to no more than five references.

### **Standard Manuscript Form**

For all submissions, standard manuscript form is requested. The manuscript, including references and legends, should be typed doublespaced, using at least 12 point font for all text except superscripts or subscripts, and with 1 inch (2.5 cm) margins throughout. Authors' names, institutional and/or corporate affiliations, 3 to 5 keywords, and the mailing address, telephone, fax and (if available) electronic mail address of the corresponding author should be provided on the title page. Please refrain from using EndNotes as references or automatic list numbering because these features are lost in conversion: simply type the reference number in parentheses in the text and type the reference list. Formatting, such as Greek letters, italics, super- and subscripts, may be used: the coding scheme for such elements must be consistent throughout. Figures may be submitted in electronic format. Images should be provided in EPS or TIF format. Graphics software such as Photoshop and Illustrator, not presentation software such as PowerPoint, CorelDraw, or Harvard Graphics, should be used to create the art. Color images must be CMYK, at least 300 DPI. Gray scale images should be at least 300 DPI. Combinations of gray scale and line art should be at least 1200 DPI. Line art (black and white or color) should be at least 1200 DPI. Figures, graphics, and photos should not be embedded in the manuscript text file. The total size of all figure files should not exceed 20MB. For each figure/table, please include the appropriate figure/table number in the description field, so that the figure/ table in the PDF can be readily identified. Authors are expected to disclose any commercial associations that might pose a conflict of interest in connection with the submitted manuscript. All funding sources supporting the work should be routinely acknowledged in a footnote on the title page. Separate pages should be used for the title, abstract, text, acknowledgments, references, tables and figure legends.

All contributions except **Letters to the Editor** should contain a brief abstract. For full length manuscripts, the abstract should not exceed 250 words. For **Case Studies**, abstracts should not exceed 150 words.

Authors may use standard abbreviations without explanation. Please refer to Proc Natl Acad Sci U S A,92:viii-x (1995) for guidance as to which abbreviations are considered standard. Nonstandard

abbreviations should be spelled out the first time they are used in the text, and then abbreviated thereafter. A list of such nonstandard abbreviations should be provided on a separate page following the abstract. Overuse of abbreviations is discouraged. All manuscripts should be in grammatically correct, colloquial English. Manuscripts that do not meet this requirement may be returned to the authors for editing. Foreign authors are encouraged to consult native English speakers prior to submitting manuscripts, to ensure that submissions conform to this requirement. In some cases, manuscripts accepted for publication may have to be edited at the authors' expense to comply with proper English usage.

**Borrowed material**-illustrations, tables, and lengthy verbatim quotations-must be fully identified as to original author and source, and written permission must be obtained from both the author and the publisher. Authors are responsible for applying for permission for both print and electronic rights for all borrowed materials and are responsible for paying any fees related to the applications of these permissions. Letters granting such permission should be forwarded with the manuscript.

**References** should be arranged in order of citation and numbered consecutively. References to journals should include the following information in this order: the authors' names with initials, article title and subtitle, journal name as abbreviated in *Index Medicus*, year, volume number, and inclusive page numbers. Kolonel LN, Nomura AMY, Hirohata T, Hankin JH, Hinds MW. Association of diet and place of birth with stomach cancer incidence in Hawaii Japanese and Caucasians. *Am J Clin Nutr* 1981; 34:2478-85. "Personal communications" and "unpublished observations" should be indicated within the text but excluded from the reference list. Information from manuscripts submitted but not yet accepted should be cited in the text as "unpublished observations." In book citations, include, when appropriate, the chapter authors' names and the chapter title along with the book editors' names, the title and edition, the place of publication, publisher, year, and inclusive page numbers. Kolonel LN, Hinds MW, Hankin JH. Cancer patterns among migrant and native born Japanese in Hawaii in relation to smoking, drinking, and dietary habits. In: Gelboin HV, *et al*, editors. *Genetic and environmental factors in experimental and human cancer*. Tokyo, Japan: Science Society Press; 1980. p. 327-40.

**Announcements** of meetings, conferences, and the like that are of interest to the readership of the Journal should be sent to the Editor at least 3 months before the first day of the month of issue in which their appearance is desired.

*Updated April 2011*

## APÊNDICES

### APÊNDICE I.A - Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos portadores de ameloblastoma

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

#### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “Estudo da perda de heterozigosidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinases da matriz em ameloblastoma”.

O ameloblastoma é um tumor que se origina dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. As causas que levam ao desenvolvimento desta alteração não são conhecidas.

Para esse estudo, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que este seja utilizado no estudo das alterações que ocorrem dentro das células relacionadas ao seu desenvolvimento. Este pedaço que será incluído não comprometerá o diagnóstico do tumor e será realizado durante a cirurgia. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento do ameloblastoma e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença.

\_\_\_\_\_  
Ricardo Santiago Gomez (coordenador)

\_\_\_\_\_  
Lucyana Conceição Farias (pesquisador)

#### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Lucyana Conceição Farias. Telefone: (31) 34092477  
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005.  
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

## **APÊNDICE I.B - Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos que possuem dente incluso para coleta de folículo pericoronário**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “Estudo da perda de heterozigidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinases da matriz em ameloblastoma”.

O ameloblastoma é um tumor que se origina dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. As causas que levam ao desenvolvimento desta alteração não são conhecidas.

Para esse estudo, será necessária a coleta de um pedaço do tecido que recobre o dente incluso que será removido durante a cirurgia. Estes pedaços de tecido serão utilizados para comparar com os resultados obtidos nos pacientes com o tumor odontogênico chamada de ameloblastoma. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento do ameloblastoma e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença.

\_\_\_\_\_  
Ricardo Santiago Gomez (coordenador)

\_\_\_\_\_  
Lucyana Conceição Farias (pesquisador)

### **TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Lucyana Conceição Farias. Telefone: (31) 34092477  
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005.  
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.



## **APÊNDICE I.C - Termo de consentimento destinado a adolescentes (13 a 18 anos)**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

### **CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA**

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa “Estudo da perda de heterozigosidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinases da matriz em ameloblastoma”.

O ameloblastoma é um tumor que se origina dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. As causas que levam ao desenvolvimento desta alteração não são conhecidas.

Para esse estudo, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que este seja utilizado no estudo das alterações que ocorrem dentro das células relacionadas ao seu desenvolvimento. Este pedaço que será incluído não comprometerá o diagnóstico do tumor e será realizado durante a cirurgia. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante a realização da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu tratamento.

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento do ameloblastoma e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença.

\_\_\_\_\_  
Ricardo Santiago Gomez (coordenador)

\_\_\_\_\_  
Lucyana Conceição Farias (pesquisador)

### **TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO**

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Lucyana Conceição Farias. Telefone: (31) 34092477  
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005.  
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

## APÊNDICE I.D - Termo de consentimento destinado a responsável por adolescentes (13 a 18 anos)

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

O seu filho(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "Estudo da perda de heterozigidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinasas da matriz em ameloblastoma".

O ameloblastoma é um tumor que se origina dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. As causas que levam ao desenvolvimento desta alteração não são conhecidas.

Para esse estudo, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que este seja utilizado no estudo das alterações que ocorrem dentro das células relacionadas ao seu desenvolvimento. Este pedaço que será incluído não comprometerá o diagnóstico do tumor e será realizado durante a cirurgia. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao tratamento do seu filho(a).

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento do ameloblastoma e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença.

\_\_\_\_\_  
Ricardo Santiago Gomez (coordenador)

\_\_\_\_\_  
Lucyana Conceição Farias (pesquisador)

### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Lucyana Conceição Farias. Telefone: (31) 34092477  
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005.  
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

## APÊNDICE I.E - Termo de consentimento destinado a responsável por crianças com idade inferior a 6 anos

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

O seu filho(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado(a) a participar do projeto de pesquisa "Estudo da perda de heterozigiosidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinases da matriz em ameloblastoma".

O ameloblastoma é um tumor que se origina dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. As causas que levam ao desenvolvimento desta alteração não são conhecidas.

Para esse estudo, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que este seja utilizado no estudo das alterações que ocorrem dentro das células relacionadas ao seu desenvolvimento. Este pedaço que será incluído não comprometerá o diagnóstico do tumor e será realizado durante a cirurgia. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao tratamento do seu filho(a).

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento do ameloblastoma e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença.

\_\_\_\_\_  
Ricardo Santiago Gomez (coordenador)

\_\_\_\_\_  
Lucyana Conceição Farias (pesquisador)

### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Lucyana Conceição Farias. Telefone: (31) 34092477  
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005.  
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

## APÊNDICE I.F - Termo de consentimento destinado a menores de idade (7 a 12 anos)

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPAÇÃO EM PESQUISA

O seu filho(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado(a) a participar de uma pesquisa chamada "Estudo da perda de heterozigiosidade do gene PTCH, metilação e transcrição gênica de metaloproteinases da matriz em ameloblastoma".

O ameloblastoma é um tumor que pode acontecer em pessoas de diferentes idades e afeta principalmente os ossos do rosto, podendo levar à grande perda de osso. No entanto, as causas que levam a formar o tumor não são muito conhecidas.

Para essa pesquisa, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor que já será retirado durante a cirurgia. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa.

Estamos a sua disposição para responder suas dúvidas sobre a pesquisa. A qualquer momento, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu tratamento.

Garantimos que todas as informações são confidenciais. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Não terá custos ou ressarcimentos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento do ameloblastoma e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença.

\_\_\_\_\_  
Ricardo Santiago Gomez (coordenador)

\_\_\_\_\_  
Lucyana Conceição Farias (pesquisador)

### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

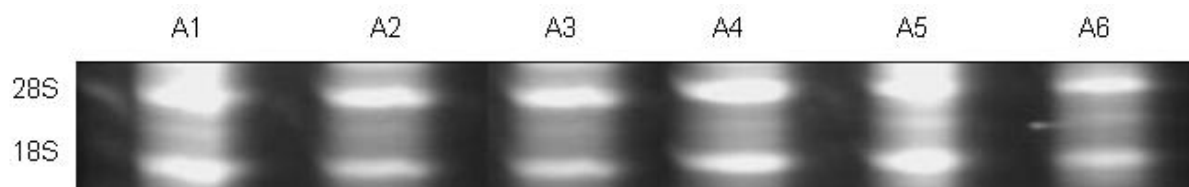
\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº: \_\_\_\_\_

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Lucyana Conceição Farias. Telefone: (31) 34092477  
Comitê de Ética em Pesquisa/UFMG. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005.  
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

**APÊNDICE II - Gel de agarose para verificação da integridade do RNA em amostras de ameloblastoma**



As colunas nomeadas de A1 a A6 representam amostras de RNA de ameloblastoma. As bandas 18S e 28S correspondem às subunidades do RNA ribossomal.

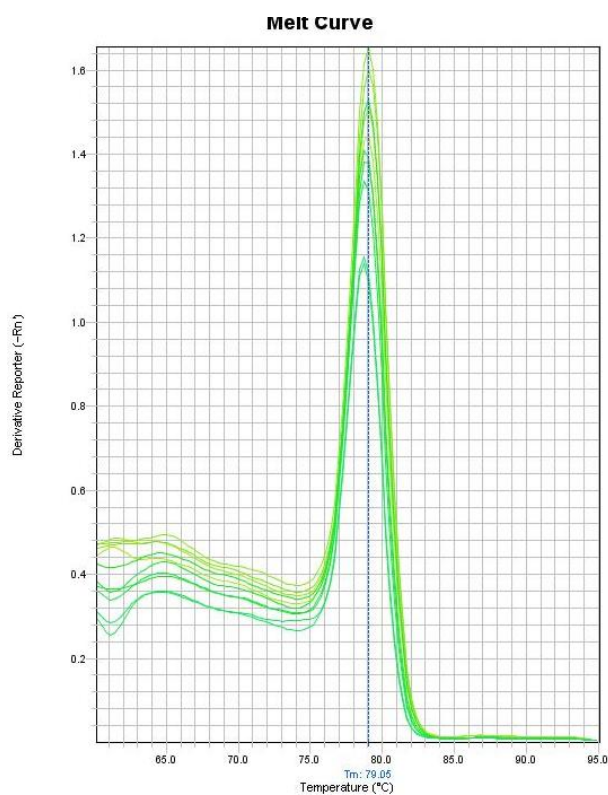
## APÊNDICE III

### Condições térmicas de amplificação e sequências de primers utilizados no estudo

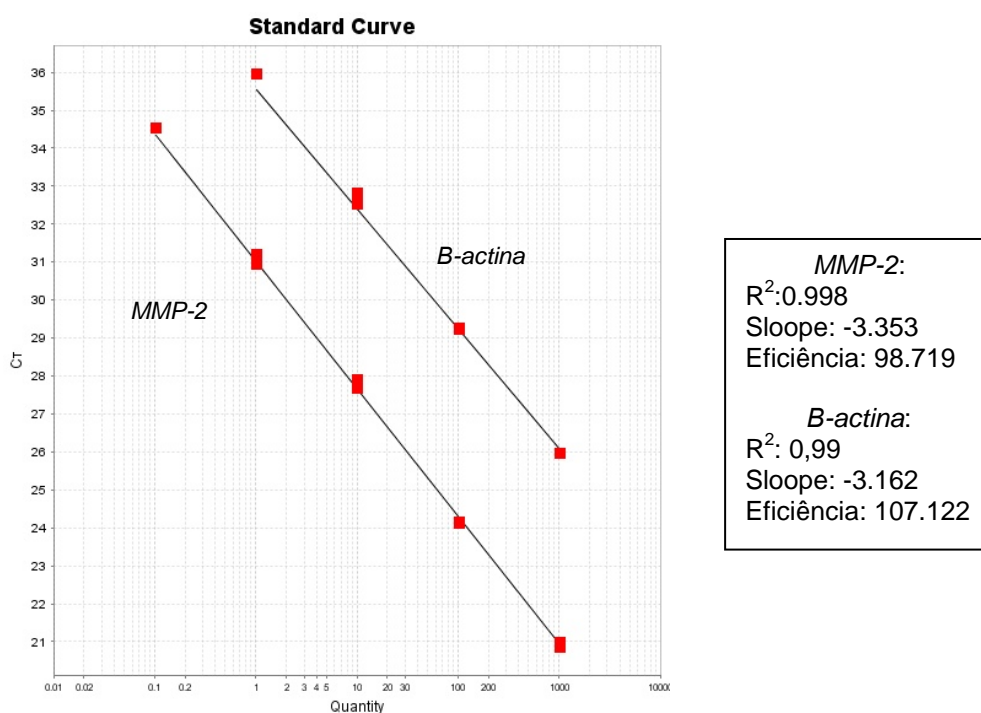
	Sequência de primers	PCR - condições térmicas
<b>Marcadores microssatélites/Locus<sup>1</sup></b>		
D9S127 / 9q31 (157 pb)	F: 5' CCCTCAAATTGCTGTCTAT 3' R: 5' AGATTGATTGATACAAGGATTTG 3'	1 x 95°C-10' 45 x 96°C-10" 57°C-30" 70°C-2' 1 x 70°C-30'
D9S287 / 9q22.3 (105 pb)	F: 5' GCTATGACTTGTCTGTGACAA 3' 5' CACTACATTGTTCAAGGGTCA 3'	1 x 95°C-10' 45 x 96°C-10" 57°C-30" 70°C-2' 1 x 70°C-30'
D9S252 / 9q21.23 (212 pb)	F: 5' ACCATGATTTGTCAACTCCTA 3' R: 5' ACAATGAACATCCATATACCC 3'	1 x 95°C-10' 45 x 96°C-10" 58°C-30" 70°C-2' 1 x 70°C-30'
<b>Marcadores polimórficos - SNPs</b>		
rs112794371/exon 5 (603 pb)	F: 5' CTGCTCGTTTTGACAGATGC 3' R: 5' TGAAATTTAATGACGCCT 3'	1 x 95°C-10' 45 x 96°C-10" 60°C-30" 70°C-2' 1 x 70°C-30'
rs111446700/exon 17 (678 pb)	F: 5' GCCATGTGCAGAACTGTGTT 3' R: 5' ACGTGAGAGCAACGCCTAAT 3'	1 x 95°C-10' 45 x 96°C-10" 60°C-30" 70°C-2' 1 x 70°C-30'
rs357564/exon 23 (400 pb)	F: 5' AACCCAAGGAGGGAAGTGTG 3' R: 5' AAGCCGTCACAGTGGGTGATG 3'	1 x 95°C-10' 45 x 96°C-10" 60°C-30" 70°C-2' 1 x 70°C-30'
<b>Metilação - MSP/MMP-2</b>		
MMP-2 metilado (205 pb)	F: 5' GCGGTTATACGTATCGAGTTAGC 3' R: 5' ACTCTTTATCCGTTTTAAAAACGAC 3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-1' 53°C-20" 72°C-20" 1 x 70°C-10'
MMP-2 não-metilado (206 pb)	F: 5' GGTGGTTATATGTTAGTGA 3' R: 5' ACTCTTTATCCATTTAAAAACAAC 3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-10" 53°C-20" 72°C-20" 1 x 72°C-10'
<b>Análise de metilação por enzima de restrição - MMP-9</b>		
MMP-9 (369 pb)	F: 5' GCTTCATCCCCCTCCCTCC 3' R: 5' AGCACCAGGACCAGGGGC 3'	1 x 95°C-10' 35 x 95°C-30" 67°C-30" 72°C-30" 1 x 72°C-10'
<b>qRT-PCR/ SYBR-green</b>		
GLI-1 (200 pb)	F: 5' GCCGTGCTAAAGCTCCAGTGAACACA3' R: 5' TCCCACTTTGAGAGGCCCATAGCAAG3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-15" 56°C-1'
GLI-2 (81 pb)	F: 5' AACGAGAAACCCTACATCTGCAA3' R: 5' TTTACATGCTTCCGGAGAGA 3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-15" 56°C-1'
MMP-2 (101 pb)	F: 5' AGCTCCCGAAAAGATTGATG 3' R: 5' CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT 3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-15" 60°C-1'
MMP-9 (200 pb)	F: 5' GAGGTTGACGCTGAAGGCGCAGATG 3' R: 5' CATAGGTACGCTAGCCCACTTGGTC 3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-15" 60°C-1'
B-actina (76 pb)	F: 5' TGCCGACAGGATGCAGAAG 3' R: 5' CTCAGGAGGCAATGATCTTGA 3'	1 x 95°C-10' 40 x 95°C-15" 56-60°C-1'

<sup>1</sup> Diniz *et al.*, 2011

## APÊNDICE IV - Padronização do primer *MMP-2* para análise de expressão gênica

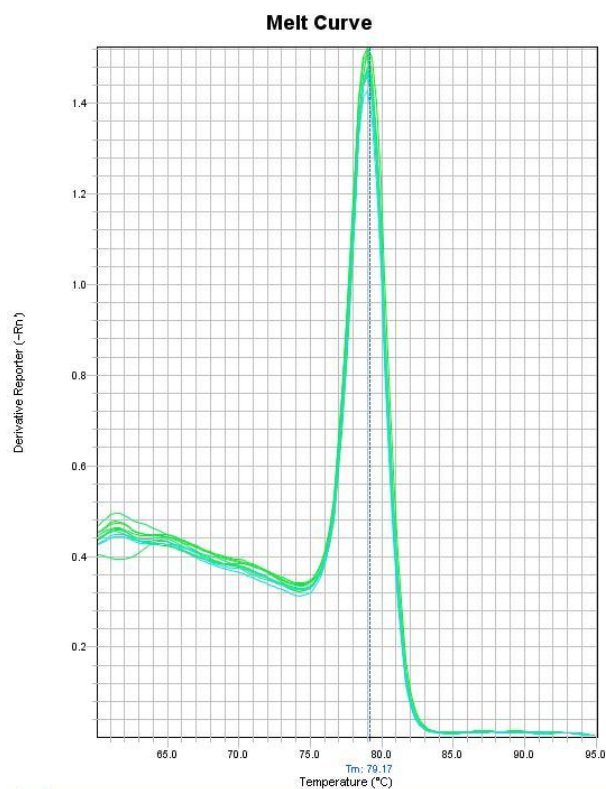


Curva de Mett do teste de eficiência para os genes *MMP-2* e  $\beta$ -actina

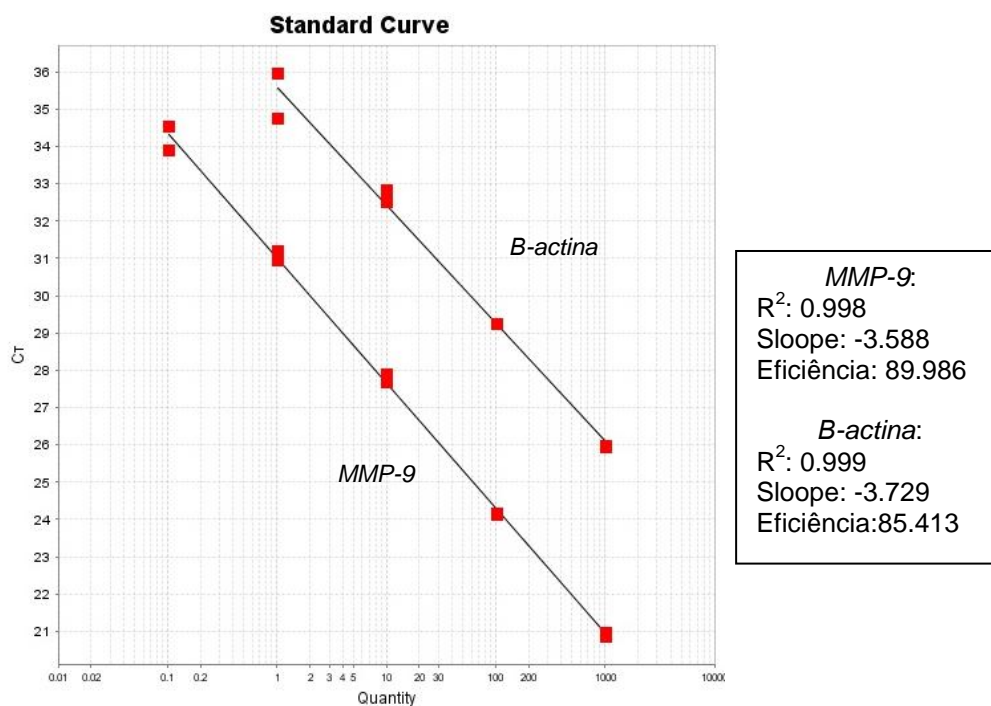


Curva padrão do teste de eficiência para os genes *MMP-2* e  $\beta$ -actina

## APÊNDICE V - Padronização do primer MMP-9 para análise de expressão gênica



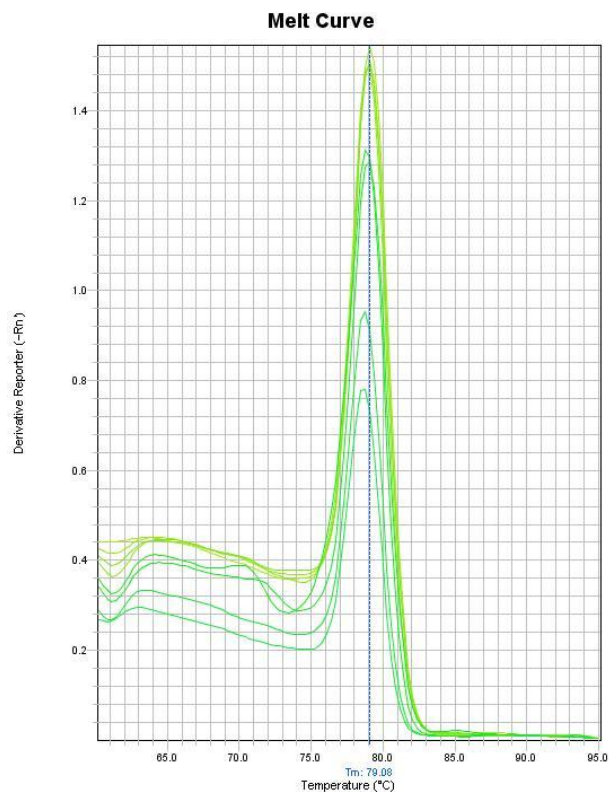
Curva de Melt do teste de eficiência para os genes *MMP-9* e  $\beta$ -actina



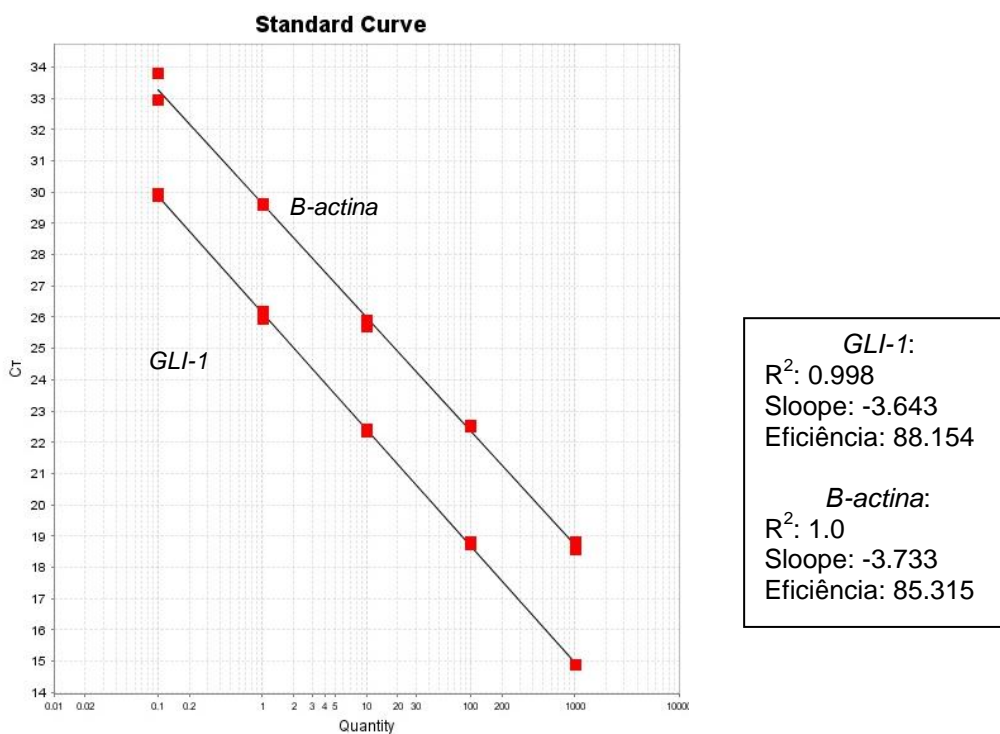
Curva padrão do teste de eficiência para os genes *MMP-9* e  $\beta$ -actina



## APÊNDICE VI - Padronização do primer *GLI-1* para análise de expressão gênica

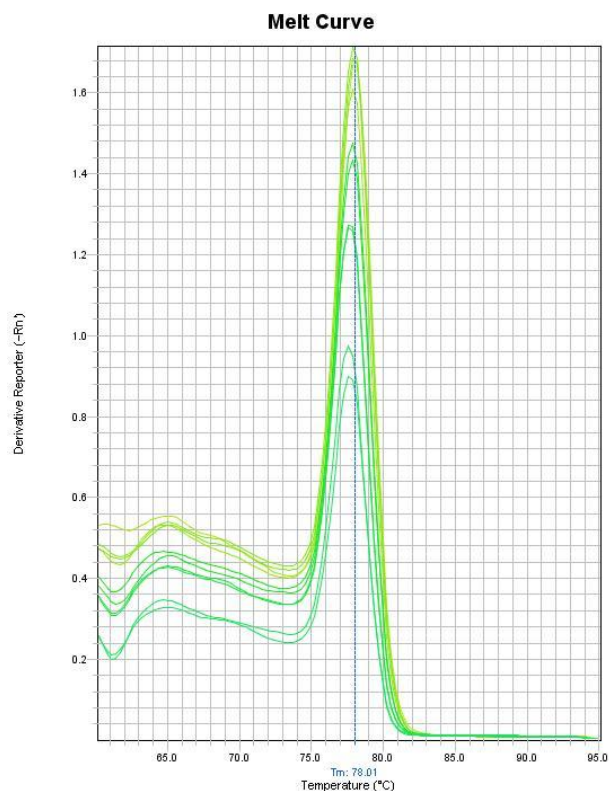


Curva de Mett do teste de eficiência para os genes *GLI-1* e  $\beta$ -actina

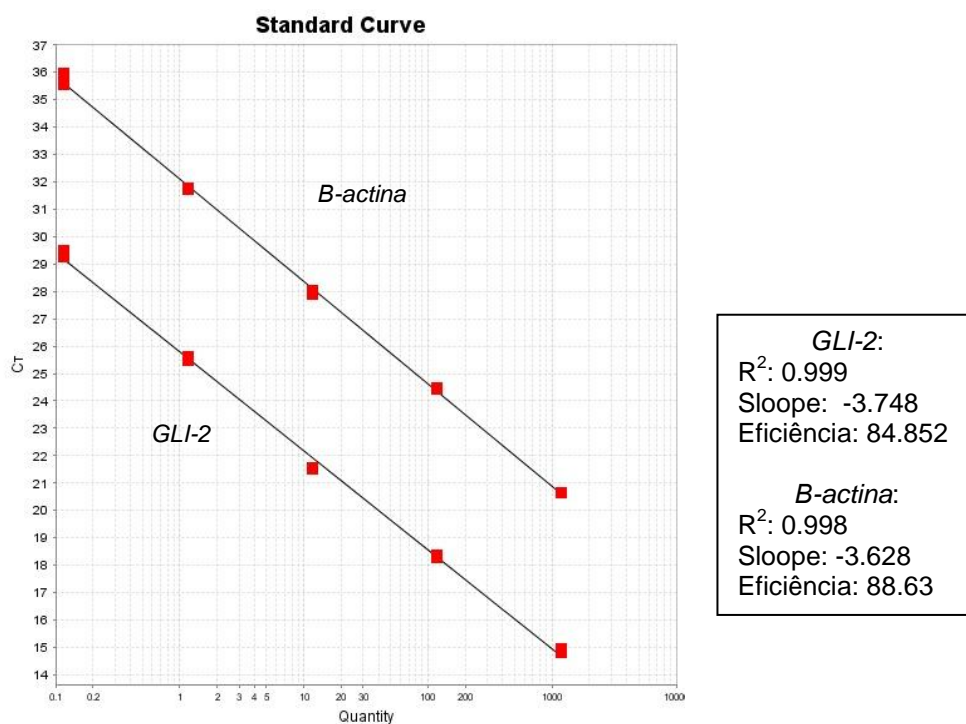


Curva padrão do teste de eficiência para os genes *GLI-1* e  $\beta$ -actina

## APÊNDICE VII - Padronização do primer *GLI-2* para análise de expressão gênica

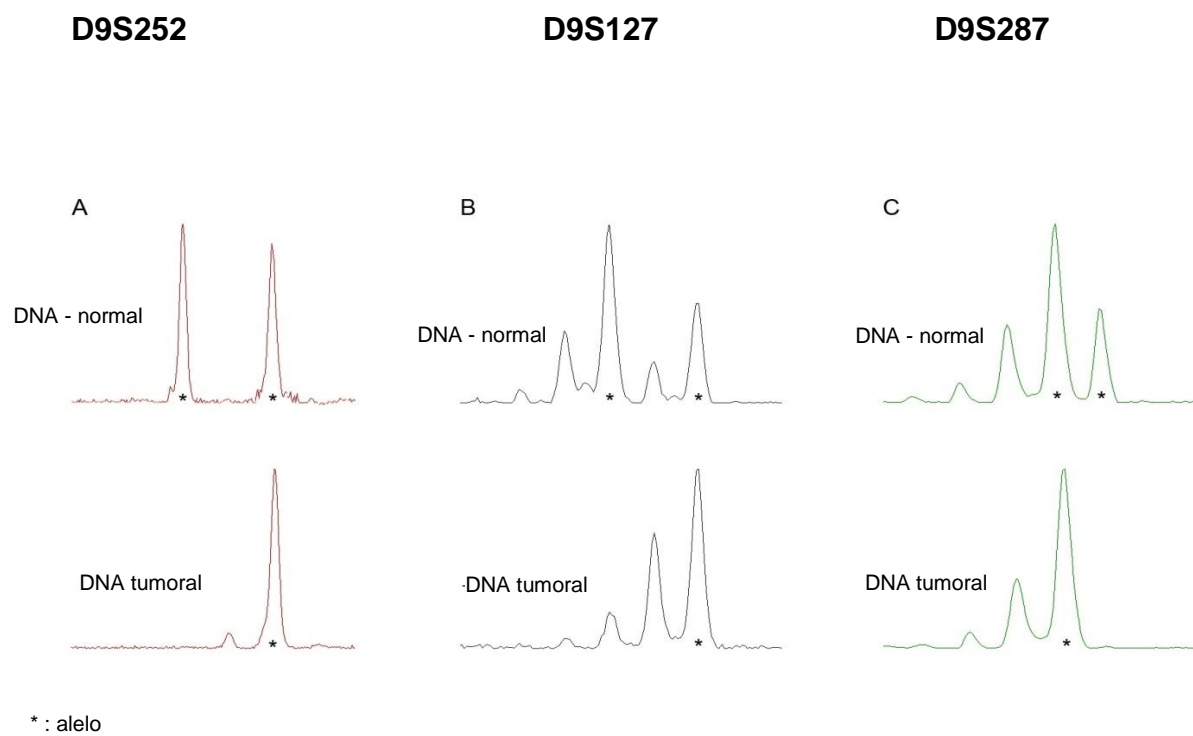


Curva de Mett do teste de eficiência para os genes *GLI-2* e  $\beta$ -actina



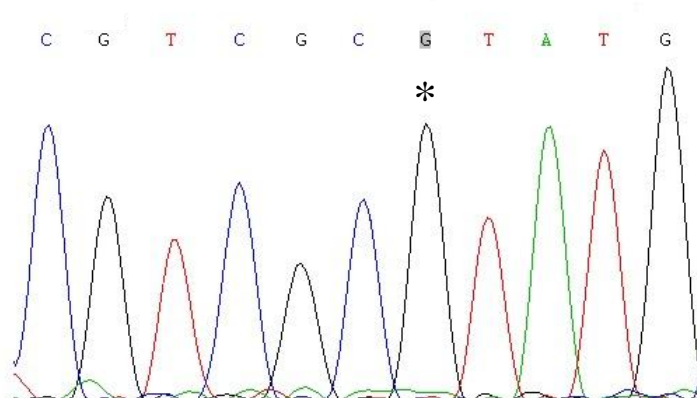
Curva padrão do teste de eficiência para os genes *GLI-2* e  $\beta$ -actina

**APÊNDICE VIII - Eletroforese capilar de marcadores microssatélites na região cromossômica 9q21.33-9q.31 em uma amostra de ameloblastoma (DNA normal e tumoral)**

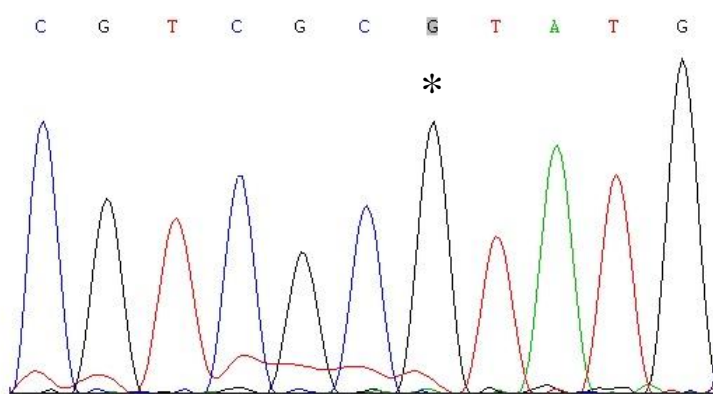


**APÊNDICE IX - Sequenciamento de uma região no exon 17 contendo o sítio do polimorfismo C/T em uma amostra ameloblastoma (DNA normal e tumoral)**

**DNA - normal**



**DNA - tumoral**

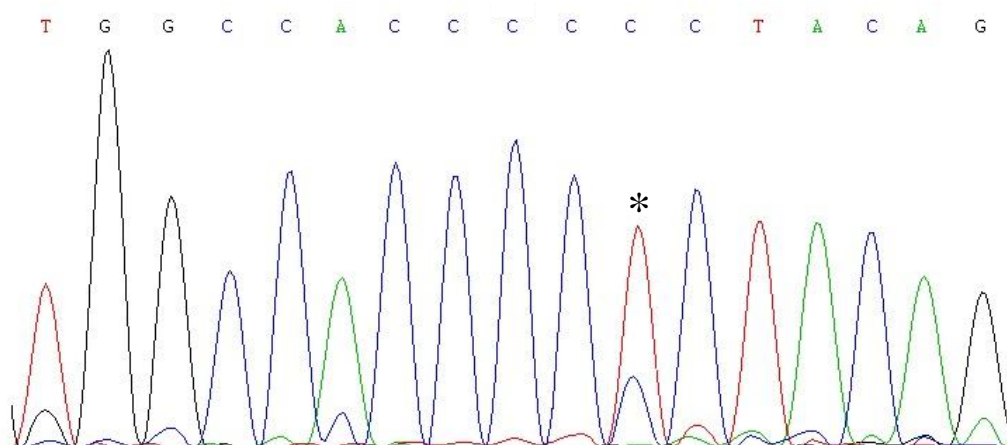


\* : representação do sítio de polimorfismo C/T, onde pode ser observada manutenção de um perfil homocigoto, pela comparação do sequenciamento da amostra de DNA normal com o DNA do epitélio tumoral.

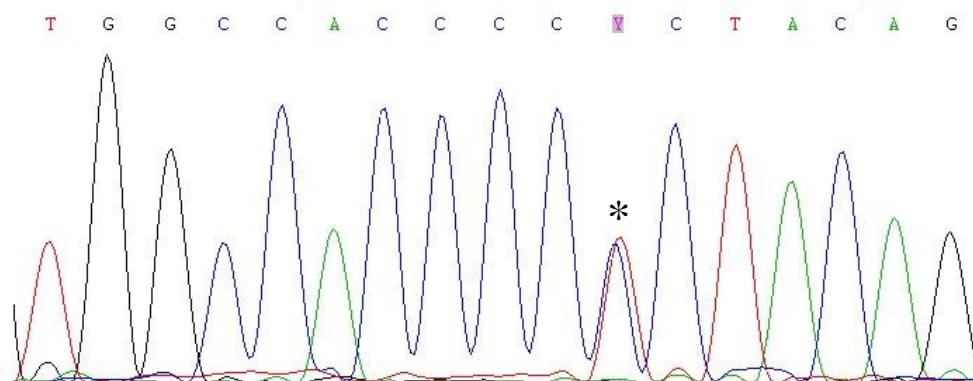
A leitura da fita de DNA foi realizada em sentido reverso

**APÊNDICE X - Sequenciamento de uma região no exon 23 contendo o sítio do polimorfismo A/G em uma amostra ameloblastoma (DNA normal e tumoral)**

**DNA - normal**



**DNA - tumoral**



\* : representação do sítio de polimorfismo A/G, onde pode ser observada manutenção de um perfil heterozigoto, pela comparação do sequenciamento da amostra de DNA normal com o DNA do epitélio tumoral.

A leitura da fita de DNA foi realizada em sentido reverso.