

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

SARA FERREIRA DOS SANTOS COSTA

**PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À APOPTOSE
EM AMELOBLASTOMAS**

BELO HORIZONTE

2016

SARA FERREIRA DOS SANTOS COSTA

**PERFIL DE METILAÇÃO DE GENES RELACIONADOS À APOPTOSE
EM AMELOBLASTOMAS**

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

Área de concentração: Patologia Bucal

Linha de pesquisa: Lesões inflamatórias, císticas e neoplásicas da cavidade bucal

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Coorientadora: Dra. Núbia Braga Pereira

BELO HORIZONTE

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

C837p
2016
T

Costa, Sara Ferreira dos Santos

Perfil de metilação de genes relacionados à apoptose em ameloblastoma / Sara Ferreira dos Santos Costa. – 2016. 65 f.: il.

Orientador (a): Ricardo Santiago Gomes

Coorientador (a): Núbia Braga Pereira

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

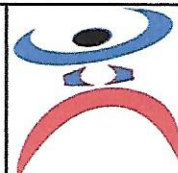
1. Ameloblastoma. 2. Apoptose. 3. Metilação de DNA. 4. Família de Proteínas BCL-2. I. Gomes, Ricardo Santiago. II. Pereira, Núbia Braga. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Perfil de metilação de genes relacionados a apoptose em ameloblastoma

SARA FERREIRA DOS SANTOS COSTA

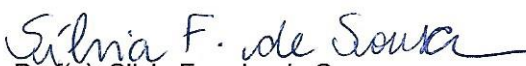
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA BUCAL.

Aprovada em 11 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

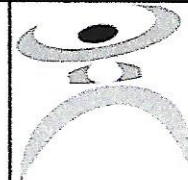

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Nubia Braga Pereira Lourenco
UFMG


Prof(a). Karuza Maria Alves Pereira
Universidade Federal do Ceará


Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa
ICB/UFMG - Depto. Patologia Geral

Belo Horizonte, 11 de julho de 2016.



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DA ALUNA SARA FERREIRA DOS SANTOS COSTA

Aos 11 dias de julho de 2016, às 08:30 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Ricardo Santiago Gomez (Orientador) – FO/UFMG, Núbia Braga Pereira Lourenço – UFMG, Karuza Maria Alves Pereira – Universidade Federal do Ceará e Sílvia Ferreira de Sousa – ICB/UFMG, para julgamento da dissertação intitulada: **Perfil de metilação de genes relacionados a apoptose em ameloblastoma**. A Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pela aluna e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou a candidata:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 11 de julho de 2016.

Prof(a). Ricardo Santiago Gomez

Prof(a). Núbia Braga Pereira Lourenço

Prof(a). Karuza Maria Alves Pereira

Prof(a). Sílvia Ferreira de Sousa

Aos meus pais, João e Margarida, por serem meus maiores incentivadores.

Ao meu marido, Gilson, por ser um companheiro e amigo sempre presente.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, pela oportunidade, pelos ensinamentos e pelo exemplo de profissional ético, dedicado e competente.

À amiga e Dra. Núbia Braga Pereira, por toda atenção dedicada, pelos grandes gestos de generosidade e por ser corresponsável pela realização deste trabalho.

À Profa. e amiga Dra. Karuza Maria Alves Pereira, por todos os valiosos conselhos, pelo apoio e por ser uma admirável profissional perseverante e capacitada.

Às Dras. Kelma Campos e Marina Gonçalves Diniz, pela colaboração atenciosa e indispensável.

À comissão examinadora da dissertação, Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira, Profa. Dra. Sílvia Ferreira de Souza, Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes e Prof. Dr. Fabrício Tinôco Alvim de Souza, por aceitar o convite para contribuir com o trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, das áreas de Estomatologia e Patologia Bucal, Prof. Dr. Ricardo Alves Mesquita, Profa. Dra. Maria Auxiliadora Vieira da Silva, Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira Aguiar, Profa. Dra. Tarcília Aparecida da Silva e Profa. Dra. Patrícia Carlos Caldeiras pelos ensinamentos em sala de aula, na clínica e no laboratório.

Às professoras do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular e Patologia Geral, Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes e Profa. Dra. Vanessa de Fátima Bernardes por sempre ajudarem quando necessário.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Molecular, em especial Ana Carolina Melo, Bruna Cora, Grazielli Menezes, Josiane França e Thaís dos Santos, agradeço a amizade, o incentivo e os bons momentos compartilhados.

Aos pacientes e familiares que gentilmente colaboraram para realização do estudo.

Ao apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) no desenvolvimento da pesquisa.

RESUMO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial benigno e seus dois subtipos mais comuns são: multicístico/sólido e unicístico. Várias vias moleculares podem estar alteradas no ameloblastoma incluindo a apoptose que é um processo fundamental na cinética das células tumorais. As mudanças epigenéticas, como a metilação do DNA, podem atuar na regulação de genes relacionados a esse tipo de morte celular. Entretanto, não há dados na literatura sobre o perfil de metilação de genes envolvidos nas vias apoptóticas em ameloblastoma. O presente estudo objetivou identificar o perfil de metilação de genes relacionados a apoptose no ameloblastoma. Para isso foram utilizadas as técnicas de digestão enzimática de restrição e *real-time PCR array* em 22 genes associados a apoptose utilizando amostras teciduais frescas (14 ameloblastomas e 08 folículos pericoronários). Os genes que apresentaram uma alteração no perfil de metilação (*TNFRSF25* e *BCL2L11*) foram validados através da análise da expressão dos seus mRNAs. A análise da expressão foi realizada utilizando GraphPad Prism 6.0 e o valor de $p \leq 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo. O *TNFRSF25* mostrou menores níveis de metilação nos ameloblastomas em comparação com o folículo pericoronário. A expressão desse gene foi maior nos ameloblastomas que nos tecidos normais. O *BCL2L11* apresentou maior nível de metilação nos grupos de ameloblastoma unicístico e folículo pericoronário quando comparados ao ameloblastoma multicístico. Os níveis de expressão desse gene também foram maiores nos tumores que nos controles. *BCL2L11*, comumente denominado Bim, é um membro pró-apoptótico da família de proteínas Bcl-2. Por outro lado, o *TNFRSF25* ou receptor de morte 3 (DR3) primariamente leva a ativação de NF- κ B e de vias das MAPKs e apenas em alguns casos resulta na apoptose. No presente estudo, a expressão elevada de *BCL2L11/Bim* e de *TNFRSF25/DR3* nos ameloblastomas quando comparados aos tecidos normais pode estar relacionada tanto a apoptose quanto a proliferação das células tumorais do ameloblastoma.

Palavras-chave: ameloblastoma, apoptose, metilação do DNA, família de proteínas BCL-2, superfamília de receptores TNF.

DNA METHYLATION PROFILE OF APOPTOSIS-RELATED GENES IN AMELOBLASTOMA

ABSTRACT

Ameloblastoma is a benign epithelial odontogenic tumour. Unicystic and multicystic/solid types are more common. Apoptosis is a fundamental process in the tumour kinetics. The DNA methylation is an epigenetic modification that can regulate apoptosis-related genes. However, there is not data about methylation profile of apoptosis-related genes in ameloblastoma. The aim of the present study was to identify the methylation profile of apoptosis-related genes in the ameloblastoma and to investigate its possible role in the ameloblastoma pathogenesis. We used the restriction enzymatic digestion and real-time PCR array in 22 genes related to apoptosis. The genes showed differential methylation profile (*TNFRSF25* and *BCL2L11*) were validated by genic expression. *TNFRSF25* showed the lower levels of DNA methylation in ameloblastoma than dental follicle and its genic expression was higher in the ameloblastoma than normal tissues. *BCL2L11* showed higher DNA methylation levels in unicystic ameloblastoma and dental follicle than multicystic ameloblastoma. The expression levels this gene also was higher in the tumours than controls. *BCL2L11* or Bim is a proapoptotic Bcl-2 family member, but it was related to survival cellular in tumours. In other hand, *TNFRSF25* or death receptor 3 (DR3) primarily to activates NF- κ B and MAPKs pathways. In few cases, it can result in apoptosis. In this study, the *BCL2L11/Bim* and *TNFRSF25/DR3* high expressions can be related both apoptosis and cellular proliferation in ameloblastoma.

Key-words: Ameloblastoma, apoptosis, DNA methylation, BCL-2 protein family, TNF receptor superfamily.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1: Fotomicrografia de ameloblastoma multicístico, variante folicular.....	18
FIGURA 2: Fotomicrografia de ameloblastoma unicístico.....	20
FIGURA 3: Características morfológicas da apoptose.....	26
FIGURA 4: Principais vias moleculares da apoptose.....	28
FIGURA 5: <i>Heatmap</i> mostrando o perfil de metilação dos genes relacionados a apoptose nos grupos estudados.....	46
GRÁFICO 1: Perfil de metilação (%) dos genes relacionados a apoptose analisados nos grupos estudados.....	45
GRÁFICO 2: Expressão gênica de <i>TNFRSF25</i>	47
GRÁFICO 3: Expressão gênica de <i>BCL2L11</i>	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: Composição do painel de genes humanos analisados relacionados à apoptose.....	40
TABELA 2: Iniciadores (<i>primers</i>) utilizados na qRT-PCR.....	42
TABELA 3: Características clínicas das amostras de ameloblastoma incluídas no estudo.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIF – Fator indutor de apoptose

APAF-1 – Fator ativador de protease apoptótica-1

ATP – Trifosfato de adenosina

BCL2L11 – *BCL2 like 11*

BH – *Bcl2 homology*

C – citosina

mC – citosina metilada

hmC – citosina hidroximetilada

fC – formilcitosina

caC – carboxilcitosina

CG – Dinucleotídeo de citosina e guanina

CGI – Ilhas de dinucleotídeos de citosina e guanina

DD – Domínio de morte

DISC – Complexo de sinalização indutor de morte

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DNase – Desoxirribonuclease

cDNA – Ácido desoxirribonucleico complementar

DNMT – DNA metiltransferase

DR3 – Receptor de morte 3

FADD – Domínio de morte associado a Fas

IAP – Proteína inibidora da apoptose

MAPK – *Mitogen-activated protein kinase* (proteína quinase ativada por mitógeno)

MBP – Proteína de ligação a CG metilado

NaOH – Hidróxido de sódio

NF-κB – *Nuclear factor-kappa B*

OMS – Organização Mundial de Saúde

OPG – Osteoprotegerina

PCR – Reação em cadeia da polimerase

qPCR – PCR quantitativo

RT-qPCR – PCR quantitativo com transcrição reversa

PTCH1 – *Pachet 1*

RANK – Receptor ativador de NF-κB

RANKL – Ligante do receptor ativador de NF-κB

RIP – Proteína de interação com receptor

RNA – Ácido ribonucleico

mRNA – Ácido ribonucleico mensageiro

SHH – *Sonic Hedgehog*

SMO – *Smoothened*

TBE – Tris-Borato-EDTA

TEMED – *tetramethylenediamine*

TET – *ten-eleven translocation protein*

TDG – Glicosilase de timina do DNA

TL1A – *TNF-like molecule 1A*

TNF – Fator de necrose tumoral

TNFR – Receptor do fator de necrose tumoral

TNFRSF25 – Membro 25 da subfamília de receptores TNF

TNFS15 – Membro 15 da superfamília TNF

TRADD – Proteína com domínio de morte associada ao TNFR

TRAIL – Ligante indutor de apoptose relacionado ao TNF

TRAIL-R – Receptor de TRAIL

TRAF – Fator associado ao TNFR

VEG1 – *vascular endothelial growth inhibitor-1*

5-aza – Azacitidina

µg – Micrograma

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
	2.1 AMELOBLASTOMA.....	17
	2.2 APOPTOSE.....	25
	2.3 METILAÇÃO DO DNA.....	31
3	OBJETIVOS.....	35
	3.1 OBJETIVO GERAL.....	36
	3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	36
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	37
	4.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	38
	4.2 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS.....	38
	4.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO DNA.....	38
	4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA.....	39
	4.4.1 Digestão enzimática de restrição.....	39
	4.4.2 Real-time PCR.....	40
	4.4.3 Análise de dados.....	41
	4.5 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO RNA.....	41
	4.6 TRATAMENTO COM DNase E SÍNTESE DE cDNA.....	41
	4.7 DESENHO E ANÁLISE DOS PRIMERS.....	42
	4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	42
	4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
5	RESULTADOS.....	43
	5.1 CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS.....	44

5.2	ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA.....	44
5.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA.....	46
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÃO.....	55
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXOS.....	65
	ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.....	66
	ANEXO B – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	67

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial benigno que é classificado multicístico/sólido, unicístico, periférico e desmoplásico, de acordo com as características clínicas e histológicas com implicações no tratamento (OMS, 2005). O ameloblastoma multicístico ou sólido é o subtipo mais comum e é caracterizado por um comportamento infiltrativo agressivo nos tecidos adjacentes com maior propensão para recidivas. Os ameloblastomas do tipo unicístico são tipicamente bem delimitados por uma cápsula fibrosa, ou seja, são considerados tumores encapsulados apresentando comportamento menos agressivo (REICHART et al., 1995; OMS, 2005). O tratamento de escolha é cirúrgico variando de enucleação a ressecção que frequentemente resulta em significativa morbidade (MENDENHALL et al., 2007).

A patogênese do ameloblastoma ainda não foi completamente elucidada, mas diversos estudos têm identificado alterações moleculares associadas com diferentes vias como a via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) e a via Sonic Hedgehog (SHH) (DINIZ et al., 2015; KURPPA et al., 2014; SWEENEY et al., 2014). Adicionalmente, vários estudos têm mostrado a expressão de fatores relacionados a apoptose e seus receptores em ameloblastoma sugerindo que a apoptose tem um papel importante na oncogênese, citodiferenciação e transformação maligna do epitélio odontogênico (RIZZARDI et al., 2009; KUMAMOTO e OOYA, 2005a; KUMAMOTO e OOYA, 2005b; KUMAMOTO et al., 2001).

A apoptose é um processo fundamental na biologia das células tumorais, pois o crescimento tumoral resulta do desequilíbrio no balanço entre a taxa de proliferação celular e a taxa de morte celular (KERR et al., 1972). A inibição da apoptose, que contribui para o desenvolvimento e progressão das células tumorais, pode ocorrer por meio de diferentes mecanismos moleculares como a metilação do DNA que é uma modificação epigenética associada com a reativação ou repressão gênica e instabilidade cromossômica (GOPISETTY et al., 2006).

Dados sobre o perfil de metilação em tumores odontogênicos são escassos na literatura. Portanto, o objetivo do presente estudo é investigar o perfil de metilação de genes relacionados à apoptose em ameloblastomas.

2.1 AMELOBLASTOMA

Os tumores odontogênicos são lesões derivadas de elementos que constituem parte dos tecidos que formam os dentes. Eles são encontrados quase que exclusivamente nos ossos maxilares e nos tecidos moles sobrejacentes (gengiva e mucosa alveolar) e compreendem um grupo heterogêneo de lesões que variam de malformações de desenvolvimento a neoplasias benignas e malignas (WRIGHT et al., 2014; OMS, 2005). Com base na origem histológica, essas neoplasias são divididas em três grupos: tumores epiteliais, tumores epiteliais com ectomesênquima e tumores ectomesenquimais com ou sem epitélio (OMS, 2005).

A etiologia desses tumores ainda é desconhecida, entretanto acredita-se que possam ocorrer como crescimentos que se originam de remanescentes do epitélio odontogênico e, também, que possam se originar como resultado de alterações neoplásicas no revestimento de cistos odontogênicos (MENDENHALL et al., 2007).

O ameloblastoma compreende 1% de todos os tumores orais e sua ocorrência varia de 11 a 45,2% dos tumores odontogênicos (AMARAL et al., 2012). Ele faz parte do grupo de tumores benignos que se originam do epitélio odontogênico sem a participação do ectomesênquima sendo o representante mais comum desse grupo (OMS, 2005). É caracterizado pelo crescimento lento, mas localmente agressivo devido à capacidade de infiltração óssea medular (DHANUTHAI et al., 2012).

A ocorrência do ameloblastoma é mais comum entre a terceira e a quinta década de vida, com uma média de idade de 35 anos no diagnóstico (REICHART et al., 1995). A neoplasia apresenta marcante predileção pelas regiões posteriores da mandíbula e a prevalência entre homens e mulheres é semelhante (REICHART et al., 1995). Frequentemente, o ameloblastoma é assintomático e descoberto como um achado ocasional de um exame radiográfico de rotina ou pode se manifestar como um aumento de volume de crescimento lento e indolor (MENDENHALL et al., 2007). O tumor também pode levar ao deslocamento e a perda de dentes, parestesia, dor e expansão das corticais (MENDENHALL et al., 2007).

Radiograficamente, o tumor se apresenta como uma lesão radiolúcida multilocular ou unilocular circundada por uma borda esclerótica podendo apresentar áreas festonadas (DHANUTHAI et al., 2012). Um dente não erupcionado pode estar associado ao defeito radiolúcido. Com menor frequência, também pode ser observada

uma lesão com padrão misto, ou seja, radiolúcido com focos radiopacos (DHANUTHAI et al., 2012).

De acordo com a última Classificação dos Tumores Odontogênicos da Organização Mundial de Saúde (OMS), os ameloblastomas podem ser divididos em quatro subtipos: multicístico/sólido, unicístico, periférico e desmoplásico (OMS, 2005).

O ameloblastoma multicístico ou sólido é o subtipo mais comum representando 92% de todos os casos (REICHART et al., 1995). Ele apresenta degenerações císticas tanto macroscopicamente quanto microscopicamente e pode ser dividido em diferentes padrões histológicos tais como folicular, plexiforme, acantomatoso, de células granulares e de células basais. Geralmente, o tumor mostra um ou outro padrão, no entanto mais de um padrão pode estar presente em um mesmo tumor (HERTOG et al., 2012).

O padrão folicular é o subtipo mais comum e se caracteriza pela presença de ilhas ou ninhos de epitélio odontogênico exibindo uma única camada de células colunares com disposição em paliçada e núcleo com polaridade inversa na periferia. Na região central são encontradas células poliédricas ou angulares frouxamente arranjadas, lembrando o retículo estrelado do órgão do esmalte, e degenerações císticas comumente estão presentes. O estroma é composto de tecido conjuntivo fibroso maduro (HERTOG et al., 2012) (Figura 1).

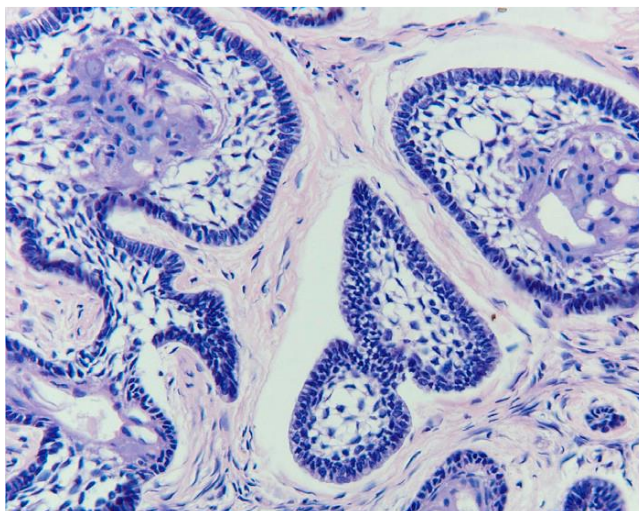


Figura 1: Fotomicrografia de ameloblastoma multicístico, variante folicular, mostrando células colunares altas em paliçada na periferia e área central semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte com presença de degenerações císticas (H.E.; x200). FONTE: HERTOG et al., 2012.

O padrão plexiforme, o segundo subtipo mais comum, consiste de cordões anastomosados e contínuos de epitélio delimitado por uma camada de células periféricas colunares e uma discreta região central de células frouxamente ligadas. Nesse padrão, o estroma usualmente apresenta degeneração cística (HERTOG et al., 2012).

O padrão acantomatoso mostra metaplasia escamosa das células epiteliais centrais podendo estar associada com a formação focal de queratina. O padrão de células granulares exhibe células que contém grânulos eosinofílicos na região central das ilhas ou dos ninhos epiteliais (JHAMB e KRAMER, 2014). A variante de células basais, por sua vez, é extremamente rara e mostra notável semelhança com o carcinoma de células basais ou basocelular. O padrão exhibe ninhos de células basaloides que tendem a ser colunares baixas e frequentemente não mostram polaridade nuclear reversa, mas o hiper cromatismo nuclear e a disposição em paliçada são mantidos, apesar dessa última ser pouco evidente. As células na porção central podem ser poliédricas a escamosas, mas áreas semelhantes ao retículo estrelado do órgão do esmalte são ausentes (SRIDHAR et al., 2015).

O ameloblastoma do tipo unicístico acomete cerca de 6% dos casos e afeta indivíduos mais jovens, geralmente na terceira década de vida (REICHART et al., 1995). O termo unicístico é derivado da aparência macro e microscópica, pois a lesão é uma cavidade monocística bem delimitada com revestimento composto de epitélio odontogênico, geralmente focal. Ele pode ser classificado em dois subtipos: luminal e mural (Figura 2) (OMS, 2005; ROBINSON e MARTINEZ, 1977).

O subtipo luminal mostra uma cavidade cística e o tumor encontra-se confinado à superfície luminal do cisto. Essa lesão consiste de uma parede cística fibrosa com revestimento composto total ou parcialmente por epitélio ameloblástico que exhibe uma camada de células colunares ou cuboides com núcleo hiper cromático e com polaridade invertida. As células epiteliais sobrejacentes a camada basal mostram-se frouxamente unidas (OMS, 2005; LI et al., 2000). Em adição, a superfície da cavidade cística pode mostrar um ou mais massas exofíticas, pedunculadas, papilomatosa ou polipoide que em raros casos pode preencher quase completamente o lúmen. Este subtipo é denominado ameloblastoma intraluminal. Essas extensões usualmente exibem um padrão epitelial plexiforme (REICHART e PHILIPSEN, 2004).

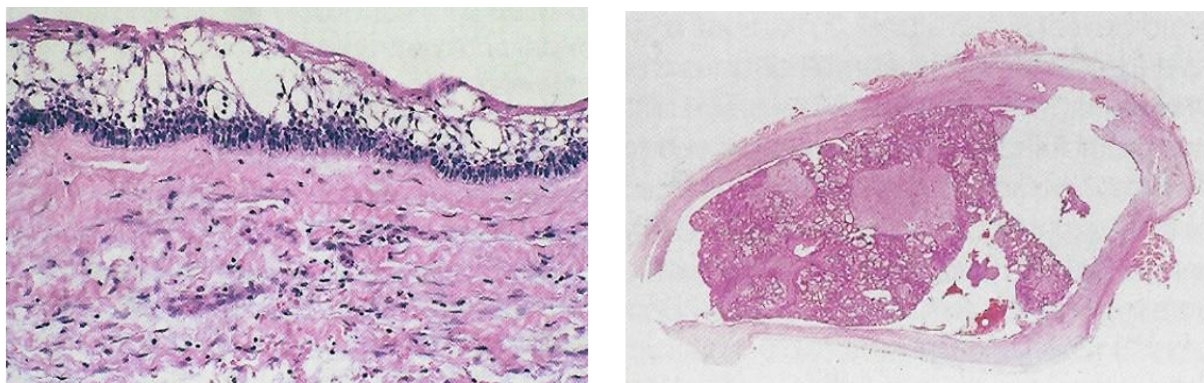


Figura 2: Fotomicrografia de ameloblastoma unicístico mostrando a) variante luminal do ameloblastoma unicístico com células basais colunares hiper Cromáticas e em paliçada; b) lesão bem encapsulada com projeção epitelial preenchendo parcialmente o lúmen. FONTE: REICHART e PHILIPSEN, 2004.

A cápsula cística pode conter um ou várias ilhas invasoras ou infiltrativas tumorais com esse subtipo sendo conhecido como ameloblastoma unicístico mural. Portanto, o ameloblastoma mural pode ser entendido como uma infiltração do revestimento cístico ou como ilhas tumorais livres na parede fibrosa do cisto. A extensão e a profundidade da infiltração podem variar consideravelmente (OMS, 2005; LI et al., 2000).

Os ameloblastomas unicísticos são delimitados por uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso, enquanto os ameloblastomas do tipo sólido ou multicístico não possuem cápsula sendo caracterizados por uma capacidade de infiltração nos tecidos adjacentes. Os ameloblastomas multicísticos são, assim, mais propensos à recidiva e tem pior prognóstico quando comparados aos unicísticos (NAKAMURA et al., 2002). A presença da cápsula é uma característica relevante no que diz respeito aos tumores, pois lesões encapsuladas favorecem um comportamento clínico mais indolente, não invasivo e de melhor prognóstico. Com isso, a variante unicística do ameloblastoma apresenta-se com curso menos agressivo que a variante multicística devido à encapsulação da lesão (HENRIQUES et al., 2009).

O ameloblastoma periférico é uma lesão de tecido mole que ocorre geralmente na gengiva, sem envolvimento do osso subjacente, e corresponde a apenas 2% de todos os tipos de ameloblastoma (REICHART et al., 1995). A sua origem parece estar associada ao epitélio de superfície da mucosa oral ou remanescentes extraósseos da lâmina dentária (PHILIPSEN et al., 2001). A lesão se apresenta como um crescimento

exofítico, firme, séssil ou pediculado, com superfície lisa e indolor (PHILIPSEN et al., 2001). A coloração da lesão varia entre normal (semelhante a mucosa), rosada e avermelhada. O diagnóstico clínico inicial é geralmente de outras lesões que não o ameloblastoma periférico, dependendo da morfologia, textura e coloração, como por exemplo: epúlide, granuloma piogênico, lesão de células gigantes e fibroma. Portanto, o correto diagnóstico requer a análise histopatológica. Histologicamente apresenta as diversas características do ameloblastoma intraósseo com padrões e tipos celulares semelhantes (PHILIPSEN et al., 2001).

O ameloblastoma desmoplásico é o menos comum sendo caracterizado por uma histomorfologia não usual, incluindo extensa colagenização do estroma ou desmoplasia (SAVITHRI et al., 2013). A aparência radiográfica dessa variante é diferenciada, pois apresenta um padrão radiográfico misto, ou seja, radiolucência e radiopacidade, com margens difusas, o que sugere uma lesão fibro-óssea. Além disso, ele tem predileção pelas regiões anteriores dos ossos maxilares (SAVITHRI et al., 2013; HERTOG et al., 2012). Esse subtipo consiste de pequenas ilhas ou cordões epiteliais delgados irregulares de variados tamanhos em um estroma fibroso densamente colagenizado. As células na periferia são cuboidais e ocasionalmente mostram hiper cromatismo nuclear. Células colunares demonstrando polaridade reversa raramente são evidentes. A extensa desmoplasia é um achado marcante com uma tendência a comprimir o epitélio odontogênico (SAVITHRI et al., 2013; NEVILLE et al., 2005). O mecanismo de desmoplasia ainda não está completamente esclarecido.

Raramente o ameloblastoma pode exibir comportamento maligno com duas variantes reconhecidas: o ameloblastoma metastatizante e o carcinoma ameloblástico (OMS, 2005). O primeiro possui aparência histológica benigna sem características específicas que o diferencie do ameloblastoma, mas tem a capacidade de metastatizar. Como as características histológicas do ameloblastoma metastatizante são semelhantes ao do tumor primário, o diagnóstico é feito com base no comportamento clínico, após a ocorrência de metástase (OMS, 2005). Apesar da recorrência local ser frequente, as metástases de ameloblastoma são extremamente raras sendo o pulmão o sítio mais comum (LAI e WANG, 2011).

O carcinoma ameloblástico é uma neoplasia maligna rara que combina características histológicas do ameloblastoma com citologia atípica como pleomorfismo, atividade mitótica, necrose focal, invasão perineural e hiperchromatismo nuclear. Ele apresenta agressividade local, além de propensão para rápido crescimento e metástase, portanto um pior prognóstico quando comparado ao ameloblastoma metastatizante (OMS, 2005). O carcinoma ameloblástico pode se originar *de novo* ou de um ameloblastoma de longo tempo (OMS, 2005). Atualmente há três tipos de carcinoma ameloblástico reconhecidos: tipo primário, tipo secundário intraósseo e tipo secundário periférico (OMS, 2005).

As evidências sugerem que apesar do ameloblastoma usualmente apresentar um crescimento lento, na maioria dos casos, o seu comportamento é considerado localmente invasivo e se não tratado corretamente pode causar morbidade significativa e, ocasionalmente, morte (MENDENHALL et al., 2007). As opções de tratamento do ameloblastoma incluem abordagens consideradas conservadoras, como enucleação e curetagem, e aquelas denominadas radicais, como ressecção marginal e ressecção segmentar. A enucleação e/ou curetagem são sugeridas por alguns autores para a variante unicística e a ressecção, com margem de 1,0 a 2,0 cm além dos limites radiográficos observados, é o tratamento sugerido para os tumores multicísticos. O tratamento conservador pode ser combinado com marsupialização, crioterapia e utilização de solução de Carnoy (CARLSON e MARX, 2006). Enquanto as abordagens conservadoras estão associadas a altas taxas de recorrência, a ressecção está associada a deformidade facial significativa, dificuldade de reabilitação e alta morbidade (CARLSON e MARX, 2006).

Para os ameloblastomas multicísticos observou-se uma alta taxa de recorrência de 60 a 80% quando do tratamento por enucleação ou curetagem (GHANDI et al., 2006). A recorrência pode ocorrer até 20 anos após o tratamento cirúrgico inicial, mas normalmente ocorre após 02 a 05 anos (PORGEL e MONTES, 2009; GARDNER e PECAK, 1980). Portanto, é crítico que ocorra um acompanhamento de longo período. Os ameloblastomas maxilares tendem a ter uma maior taxa de recorrência local após a cirurgia devido à fina espessura da cortical óssea como uma barreira menos efetiva para a invasão tumoral quando comparado ao osso da mandíbula (MENDENHALL et al., 2007). O tipo periférico parece responder bem a excisão local e sugere-se que o

ameloblastoma desmoplásico seja tratado como o tipo multicístico (POGREL e MONTES, 2009).

Na literatura há numerosos estudos que tentam explicar a tumorigênese do ameloblastoma e que identificam potenciais marcadores de prognóstico e alvos para o tratamento do tumor. Os estudos detalham a expressão de moléculas envolvidas na sinalização celular de diferentes vias que medeiam processos cruciais do crescimento tumoral, especialmente proliferação e diferenciação celulares.

O receptor ativador do fator de transcrição nuclear NF- κ B (RANK) e seu ligante (RANKL) assim como a osteoprotegerina (OPG), moléculas que medeiam a remodelação óssea, têm sido associados ao crescimento e à progressão do ameloblastoma, pois os autores acreditam que o balanço na via de sinalização RANK-RANKL e os níveis de OPG podem estar relacionadas à destruição óssea característica da neoplasia (MATOS et al., 2013; SILVA et al., 2008).

Até o momento, existem poucos estudos que tentam esclarecer sobre mutações em ameloblastoma. Evidências recentes mostram que a ativação da via de sinalização de proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) tem um papel importante na patogênese desse tumor. A via MAPK é ativada extracelularmente e coordena uma variedade de processos celulares como crescimento, proliferação, diferenciação, migração e apoptose através de cascatas de reações de fosforilação. Estudos recentes reportaram a mutação oncogênica *BRAF* V600E com uma alta prevalência em ameloblastomas (BROWN et al. 2014; KURPPA et al., 2014; SWEENEY et al., 2014). A frequência dessa mutação variou de 46 a 82% (DINIZ et al., 2015; BROWN et al. 2014; KURPPA et al., 2014; SWEENEY et al., 2014). A mutação resulta em ativação constitutiva da proteína BRAF e da sinalização MEK e ERK, com consequente aumento de proliferação celular, sobrevivência e transformação neoplásica. Outro estudo recente indicou que ameloblastomas multicístico, unicístico e desmoplásico compartilham essa alteração molecular que ocorre tanto em tumores de mandíbula quanto de maxila (DINIZ et al., 2015). Assim, os achados indicam que ameloblastomas infiltrativos (multicísticos), encapsulados (unicísticos) e desmoplásicos compartilham essa mesma alteração molecular.

Outras mutações consideradas frequentes também foram identificadas em ameloblastoma, como as que ocorrem na proteína Smoothed (SMO). Essas

mutações ocorreram em 16%-39% dos casos de ameloblastomas nos estudos analisados. SMO é um receptor ligado a uma proteína G que medeia a via de sinalização Sonic Hedgehog (SHH). O gene Sonic Hedgehog (SHH) codifica uma proteína que ativa um complexo de receptor de membrana formado por Patchet 1 (PTCH1) e Smoothened (SMO). Na ausência da proteína SHH, PTCH1 inibe SMO. Quando SHH se liga a PTCH1, a inibição de SMO fica suspensa e então ocorre a ativação da proteína GLI que medeia os sinais de SHH do citoplasma para o núcleo (BROWN e BETZ, 2015).

Sweeney et al. (2014) sugerem que as mutações em MAPK e SHH representam dois distintos subtipos moleculares de ameloblastoma. De acordo com esses autores, a mutação de SMO seria um sinal de ameloblastoma de maxila, enquanto mutação de BRAF seria um evento proeminente nos tumores de mandíbula. Por outro lado, Brown et al. (2014) acreditam que as mutações em SMO funcionam como um evento secundário com as mutações da via MAPK sendo o principal evento na patogênese do ameloblastoma tendo em vista que apenas um caso apresentou mutação de SMO isoladamente, enquanto todos os outros mostraram mutação de SMO e BRAF simultaneamente. E os estudos de Diniz et al. (2015) mostraram que as mutações de SMO não foram observadas em qualquer dos ameloblastomas, incluindo os localizados em maxila, o que concorda com a visão de que mutação de BRAF é a principal mutação para ambos os tumores maxilares e mandibulares com a mutação SMO sendo provavelmente um evento genético secundário na patogênese do ameloblastoma.

Os processos envolvidos na apoptose também foram analisados em diferentes estudos que examinaram a expressão de diferentes moléculas relacionadas a apoptose, como bcl-2, bcl-x, bax, bak, TRAIL (*TNF-related apoptosis-inducing ligand*), APAF1 (*apoptotic protease activating factor 1*), IAP (*inhibitors of apoptosis proteins*) e seus receptores, como DR4, DR5, DcR1 e DcR2, sugerindo que a apoptose tem um papel importante na tumorigênese, citodiferenciação e transformação maligna nesses tumores (FLORESCU et al., 2012; RIZZARDI et al., 2009; KUMAMOTO e OOYA, 2005a; KUMAMOTO e OOYA, 2005b; KUMAMOTO et al., 2001; SANDRA et al., 2001).

2.2 APOPTOSE

O termo apoptose foi primeiramente utilizado em um clássico artigo de Kerr, Wyllie e Currie em 1972 para descrever um tipo de morte celular com características morfológicas distintas da necrose. Os autores consideraram esse tipo de morte celular como um fenômeno biológico ativo que atua como um mecanismo de deleção celular controlada com ação complementar, porém oposta, à mitose na regulação da população celular. Por se tratar de um processo ativo, a morte celular programada requer reservas de ATP (trifosfato de adenosina) ao contrário da necrose que se instala quando há depleção total do ATP (KERR et al., 1972).

A morte celular por apoptose normalmente é caracterizada por uma série de alterações morfológicas e bioquímicas. Inicialmente ocorre a condensação da cromatina, a redução do tamanho do núcleo e a fragmentação nuclear. A compactação de organelas citoplasmáticas e a dilatação do retículo citoplasmático também são observadas (WYLLIE et al, 1984; ARENDS et al., 1990; COHEN, et al., 1997). Após tais alterações ocorre a separação do núcleo e do citoplasma em fragmentos celulares conhecidos como corpos apoptóticos. A formação de corpos apoptóticos envolve a separação de protuberâncias que se formam na superfície da célula para formar múltiplos fragmentos celulares apresentando citoplasma com organelas celulares compactadas, contendo ou não fragmento nuclear, e circundados por membrana plasmática íntegra (KERR et al., 1972; ELMORE, 2007).

Os corpos apoptóticos são rapidamente fagocitados por outras células, como macrófagos, devido a expressão de marcadores na superfície das células apoptóticas, como a fosfatidilserina. Ocorre a externalização de fosfatidilserina através do movimento dessa molécula da camada interna para a camada externa na bicamada lipídica da membrana plasmática (BRATTON et al., 1997). Após a ingestão, os corpos apoptóticos são degradados dentro de fagolisossomos (Figura 3). Não há reação inflamatória associada ao processo de apoptose, pois as células apoptóticas não liberam seus constituintes nos tecidos circundantes, além disso elas são rapidamente fagocitadas pelas células vizinhas (ELMORE, 2007).

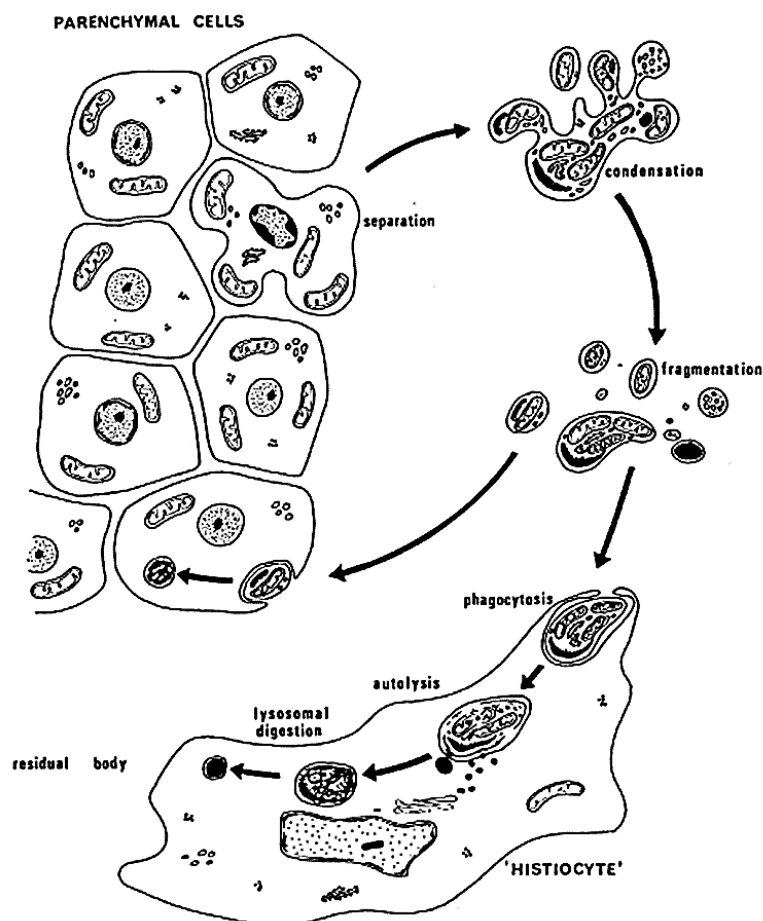


Figura 3: Características morfológicas da apoptose. Diagrama que ilustra a apoptose: separação da célula em apoptose das suas vizinhas, condensação celular, fragmentação com formação dos corpos apoptóticos e a rápida fagocitose (KERR et al., 1972).

Histologicamente, células únicas ou pequenos agrupamentos de células se apresentam com formato arredondado ou oval com citoplasma eosinofílico denso devido a compactação celular e fragmentos de cromatina nuclear densamente basofílicos. As células condensadas se separam das células vizinhas (ELMORE, 2007).

A apoptose caracteriza-se como um processo coordenado que envolve a ativação de caspases, proteínas com atividade de cisteína proteases, e uma complexa cascata de eventos (ELMORE, 2007). As caspases são proteínas com atividade proteolítica capazes de clivar proteínas a resíduos de ácido aspártico. Elas são expressas como proenzimas, denominadas procaspases, uma forma inativa. Uma vez ativadas, as procaspases podem ativar outras procaspases iniciando uma cascata

proteolítica que amplifica a via de sinalização da apoptose e leva a rápida morte celular (COHEN, 1997).

Até o presente momento são conhecidos na literatura doze tipos de caspases, sendo que nem todas estão envolvidas no processo de apoptose. As caspases que frequentemente estão envolvidas no processo de morte celular programada são classificadas em ativadoras ou iniciadoras (caspases 8, 9 e 10) e efetoras (caspases 3, 6 e 7). As caspases iniciadoras fazem a proteólise das caspases efetoras que, por sua vez, atuam ativando outras proteases que degradam diferentes substratos da célula (CHANG e YANG, 2000). Existem algumas proteínas do citosol que trabalham inibindo as caspases ou às vezes regulando a permeabilidade das mitocôndrias. Tal regulação ocorre devido a família de proteínas Bcl-2 (descoberta em linfoma de células de B) que inclui vinte e três proteínas inibidoras (antiapoptóticas) ou ativadoras (pró-apoptóticas) da morte celular. Existem algumas proteínas antiapoptóticas que localizam-se na membrana mitocondrial e normalmente fazem parte da constituição ou regulação das proteínas formadoras de poros de permeabilidade transicional que são importantes na permeabilidade mitocondrial. As proteínas pró-apoptóticas da família Bcl-2 são caracterizadas por apresentar um domínio de dimerização que permite ligá-las às proteínas anti-apoptóticas, inibindo-as (CHANG e YANG, 2000).

Além das proteínas citadas acima, a morte celular programada é também regulada pela proteína p53 que, após se ligar as áreas de dano do DNA, ativa as proteínas que mantem a célula na fase G1 do ciclo celular para que ocorra o reparo do DNA (MATHEVET et al., 2000). Se a lesão do DNA não for reparada, a p53 ativa os mecanismos de morte diminuindo a expressão de proteínas antiapoptóticas Bcl-2 e aumentando a transcrição dos genes pró-apoptóticos Bax e Bak, ativando algumas helicases de DNA ou enzimas que provocam a translocação de muitas proteínas pró-apoptóticas da membrana celular para o citosol (ALBERTS et al., 2002; NAKAMURA et al., 2002).

As duas principais vias apoptóticas são: a via extrínseca e a via intrínseca. A via extrínseca, ou via do receptor de morte, envolve a ligação dos receptores de morte presentes na superfície da célula aos seus ligantes. Os receptores de morte são membros da superfamília de receptores do fator de necrose tumoral (TNF) e são caracterizados pela presença de um domínio extracelular rico em cisteína e uma

sequência citoplasmática intracelular denominada domínio de morte. Eles são ativados por seus receptores naturais, também componentes da família TNF. As vias moleculares dos receptores TNFR1 e Fas são as mais bem caracterizadas (KUMAR et al., 2005). Quando os ligantes se ligam aos seus respectivos receptores de morte (como Fas, TRAIL-R1 ou TRAIL-R2), o domínio de morte atrai proteínas adaptadoras intracelulares (como FADD, proteína de domínio de morte associada a Fas) que, por sua vez, recruta formas inativas de certos membros da família das caspases, como a procaspase-8. A agregação de proteína adaptadora (FADD) com a procaspase é conhecida como complexo de sinalização indutor de morte (DISC). Na DISC, as procaspases são clivadas para formar caspases iniciadoras ativas (KUMAR et al., 2005; IGNEY e KRAMMER, 2002) (Figura 4A).

A via intrínseca também é conhecida como via mitocondrial. Por estimulação da membrana mitocondrial ocorre a liberação do citocromo c e outros fatores apoptogênicos para o espaço intermembranoso da mitocôndria. No citosol, o citocromo c forma um complexo com Apaf-1, ATP e procaspase-9. Por meio da interação desse complexo é formado o apoptossomo. Dentro do apoptossomo a procaspase-9 é ativada a caspase-9 (KUMAR et al., 2005) (Figura 4B). Há evidências de que as duas principais vias são interligadas e que uma tem influência na outra (IGNEY e KRAMMER, 2002).

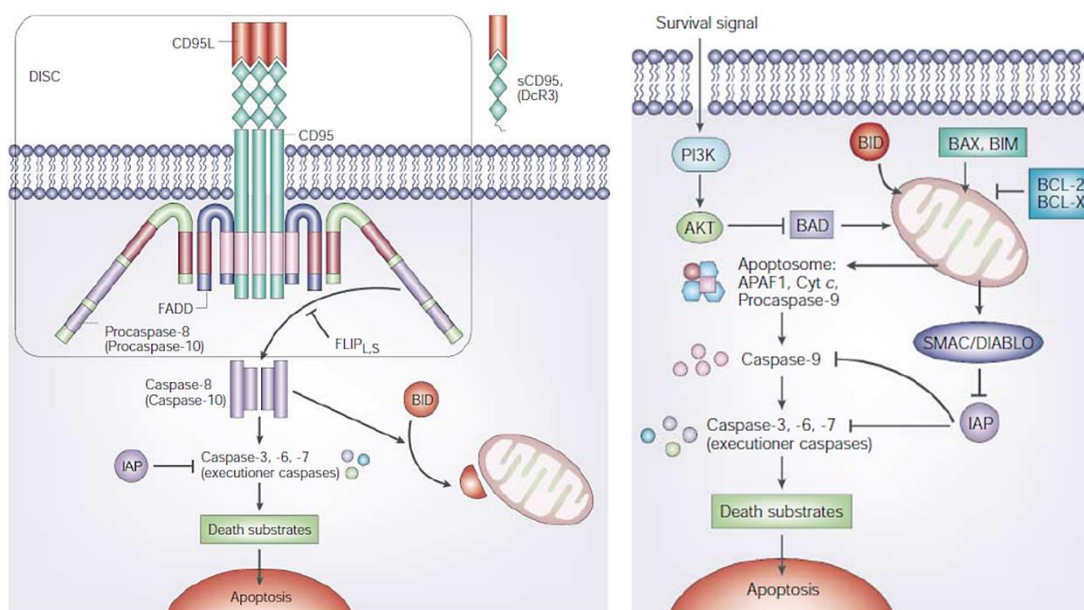


Figura 4: Principais vias moleculares da apoptose. Eventos que ocorrem na (A) via extrínseca, mediada por receptores de morte presentes na superfície da célula, e na (B) via intrínseca, mediada pela mitocôndria, que culminam na ativação de caspases. FONTE: IGNEY e KRAMMER, 2002.

As células T e as células *natural killers* (NK) utilizam uma via alternativa para destruição de células tumorais e eliminação de células infectadas com vírus conhecida como via perforina/granzina. Essas células de defesa exercem seus efeitos citotóxicos através da secreção de moléculas formadoras de poros transmembrana, as perforinas, com a consequente liberação de grânulos citoplasmáticos através do poro para dentro da célula alvo. As serinas proteases denominadas granzimas são os componentes mais importantes dos grânulos (ELMORE, 2007).

Todas as vias citadas convergem para a fase de execução que é iniciada pela clivagem de caspase 3 e resulta em fragmentação de DNA, degradação do citoesqueleto e de proteínas nucleares, formação de corpos apoptóticos, expressão de ligantes para receptores de células fagocíticas e fagocitose (ELMORE, 2007).

A apoptose pode ocorrer tanto em condições fisiológicas quanto patológicas. Em condições fisiológicas ela ocorre durante o processo embrionário, pois é essencial para o sucesso da organogênese. Ocorre também durante a involução de glândulas mamárias após a lactação, como um mecanismo de homeostase para manutenção de populações celulares e como mecanismo de defesa quando células são danificadas por agentes nocivos (ELMORE, 2007). A insuficiência de apoptose pode se manifestar como uma neoplasia ou doença autoimune, enquanto que essa morte celular acelerada é evidente em doenças degenerativas crônicas e agudas, imunodeficiência e infertilidades (DANIAL e KORSMEYER, 2004).

A apoptose também tem um papel importante na regulação da população celular normal, pois o tamanho de uma população celular depende do balanço entre a proliferação e a perda celulares.

A morte celular por apoptose é conhecida por ter um papel importante no desenvolvimento dentário e alguns fatores relacionados a apoptose tem sido identificados em tecidos de germes dentários (KUMAMOTO e OOYA, 2005). Estudos tem detectado células apoptóticas e várias proteínas relacionadas a apoptose também em ameloblastoma (MITSUYASU et al., 1997; RIZZARDI et al., 2009).

As expressões de citocromo c, Apaf-1, caspase-9 e AIF (fator indutor de apoptose), moléculas de sinalização na apoptose mitocondrial, foram detectadas em germes dentários no estágio inicial de mineralização da coroa, sugerindo que a via apoptótica mediada pela mitocôndria possui um papel na morte celular apoptótica

durante o desenvolvimento dentário. Além disso, a expressão de citocromo c, Apaf-1 e caspase-9 foi detectada em ameloblastomas benignos e malignos. Isso sugere que a via apoptótica mitocondrial pode estar associada com a morte celular apoptótica nesses tumores odontogênicos. Adicionalmente, a imunoreatividade de citocromo c em ameloblastomas benignos e malignos foi mais forte que em germes dentários, o que pode ser explicado devido as células apoptóticas serem mais abundantes nos ameloblastomas que nos germes dentários. Assim, a expressão dessas moléculas pode estar envolvida na oncogênese, citodiferenciação e transformação maligna do epitélio odontogênico (KUMAMOTO e OOYA, 2005).

Rizzard et al. (2009) realizaram um estudo para determinar o comportamento de ameloblastomas pela análise de ligantes induzidos por apoptose (TRAIL) e seus receptores (TRAIL-R), e a localização das células apoptóticas. Os autores verificaram imunoreatividade de TRAIL no citoplasma das células epiteliais neoplásicas, enquanto a expressão de TRAIL-R foi detectada tanto na membrana quanto no citoplasma e ambos foram expressos na maioria das amostras com diferentes padrões de reatividade. As células queratinizadas em ameloblastomas acantomatosos mostraram reatividade forte e difusa para TRAIL e TRAIL-R, enquanto as células granulares dos ameloblastomas de células granulares foram fortemente positivas para TRAIL, porém negativas ou fracamente positivas para TRAIL-R. Um pequeno número de células apoptóticas reveladas estava localizada quase exclusivamente no componente central semelhante ao retículo estrelado e os indícios de apoptose foram maiores em ameloblastomas de células granulares. Os resultados indicam que TRAIL e seus receptores podem estar envolvidos na transformação neoplásica do epitélio odontogênico.

Outros estudos também sugerem dois padrões distintos de expressão de proteínas relacionadas a apoptose entre os componentes tumorais do ameloblastoma: as células colunares periféricas apresentam um perfil proliferativo ou antiapoptótico, enquanto as células da região central mostram um perfil pró-apoptótico (FLORESCU et al., 2012; SANDRA et al., 2001). No estudo de Sandra et al. (2001) que investigou o papel das proteínas da família Bcl-2 para avaliar o envolvimento da apoptose em ameloblastoma, os resultados indicam que o ameloblastoma apresenta maior imunexpressão de proteínas que inibem a apoptose do que proteínas que favorecem

a apoptose sugerindo que o ameloblastoma pode ter uma elevada atividade de sobrevivência que pode estar relacionada as altas taxas de recorrência.

As células tumorais têm desenvolvido numerosas estratégias de resistência a morte celular, como mutações em genes codificantes de proteínas pró-apoptóticas, aumento da expressão de proteínas anti-apoptóticas e/ou dos sinais de sobrevivência e, mais recentemente descoberto, o silenciamento de genes pró-apoptóticos mediado pela hipermetilação do DNA (HERVOUET et al., 2013). A hipometilação pode levar a uma ativação anormal de genes, como oncogenes, enquanto a hipermetilação pode silenciar genes, como os supressores de tumor. Assim, a mudança no padrão de metilação do DNA pode levar a formação de tumores (HERVOUET et al., 2013).

2.3 METILAÇÃO DO DNA

A epigenética refere-se a mudanças que ocorrem na expressão gênica e no fenótipo das células sem modificações na sequência de nucleotídeos do DNA (GOLDBERG et al, 2007). A regulação epigenética da expressão gênica ocorre através de modificações nas proteínas histonas ou por meio de alterações químicas no próprio DNA. Tais modificações influenciam a estrutura da cromatina, o complexo de DNA e proteínas intimamente associadas, e são hereditárias (GOLDBERG et al., 2007). Dentre os fenômenos epigenéticos, a metilação do DNA é a mais extensamente estudada e talvez seja a modificação melhor caracterizada (GOLDBERG et al., 2007).

Em eucariontes, a metilação do DNA ocorre pela adição covalente de um grupo metil no quinto carbono, ou posição C5', de um anel de citosina (C). Em vertebrados, todos os elementos do genoma podem ser alvos da metilação de citosina. Em mamíferos, essa modificação ocorre principalmente em dinucleotídeos CG ou CpG que são regiões de citosina e guanina ligadas por um grupo de fosfato (SCHÜBELER, 2015). A frequência de CG no genoma de mamíferos é baixa, em relação aos outros dinucleotídeos, devido à alta taxa de desaminação que ocorre nas citosinas com a consequente formação de uracil e a sua remoção pela glicosilase de uracil do DNA (UDG). Cerca 70 a 85% dos CGs distribuídos no genoma encontram-se metilados (FICZ, 2015). A desaminação de citosina metilada (mC) leva a formação de timina que é uma base própria do DNA, portanto não é removida (FICZ, 2015).

Regiões com alta densidade de CpG são referidas como ilhas CG (CGI) que geralmente se sobrepõem a regiões próximas a terminação 5' de genes com cerca de 60% dos promotores de genes contendo CGIs. A metilação do DNA em regiões promotoras é geralmente associada ao silenciamento gênico. Isso pode ser compreendido como um eficaz sistema de repressão de genes através de hipermetilação de CGI (FICZ, 2015).

A metilação do DNA foi originalmente relacionada à repressão de genes no artigo de Vardimon et al. (1982) em oócitos de *Xenopus*. Taylor e Jones (1979) também foram pioneiros em revelar a relação entre metilação do DNA e expressão gênica. Os autores utilizaram um inibidor de metilação, 5-azacitidina (5-aza), para tratar linhagens celulares embrionárias indiferenciadas de camundongos e obtiveram como resultado a formação de vários fenótipos celulares diferenciados. Posteriormente, o mesmo grupo de pesquisadores observou que as mudanças no fenótipo eram estáveis e hereditárias (JONES, 1985).

Existem diferentes mecanismos propostos para explicar a repressão da expressão de genes pela metilação do DNA. No modelo tradicional, a metilação de CGIs em promotores atua como um sinal de recrutamento para proteínas de ligação aos CpGs metilados (MBPs). Essas proteínas podem competir com os fatores de transcrição por seus sítios de ligação o que evita a ligação de fatores de transcrição resultando na repressão da transcrição. Nesse modelo, CGIs não metiladas permitem a ligação de fatores de transcrição (SCHUBELER, 2015; SPRUIJT e VERMEULEN, 2014).

Novos modelos descrevem a regulação da transcrição pela metilação do DNA. A metilação de um *enhancer* pode bloquear a ligação de um fator de transcrição. Em adição, fatores de transcrição ligam-se a *enhancers* não metilados (SPRUIJT e VERMEULEN, 2014). Acredita-se que o silenciamento de genes mediado por metilação do DNA envolve múltiplos mecanismos que ainda não foram completamente elucidados. Ainda não está claro o limite de metilação além do qual ocorreria a repressão gênica, ou no qual o gene ficaria inativo (FICZ, 2015).

A reação de metilação do DNA é catalisada por enzimas denominadas DNA metiltransferases (DNMTs). Em mamíferos foram identificadas três DNMTs: DNMT1, DNMT3A e DNMT3B. DNMT3A e DNMT3B são consideradas metiltransferases de

novo, pois estabelecem o padrão de metilação durante o desenvolvimento embrionário. A DNMT1 é responsável pela manutenção desse padrão assegurando a transferência fiel do mesmo após a síntese do DNA durante as divisões celulares sendo, assim, considerada uma metiltransferase de manutenção. Após a replicação do DNA, as duas hélices filhas do DNA hemimetilado contém uma fita metilada (*template*) e uma fita não metilada (recente). A DNMT1 metila as fitas recém sintetizadas reestabelecendo o padrão de metilação do DNA. DNMT3A e DNMT3B catalisam a metilação do DNA independentemente da replicação do DNA (SPRUIJT e VERMEULEN, 2014).

Apesar da metilação do DNA ser considerada uma marca epigenética altamente estável, já foi revelado que não é um processo estático, pois existe uma dinâmica de desmetilação do DNA. O grupo metil pode ser perdido devido a manutenções imperfeitas como resultado da inibição de DNMT1 ou sua ausência durante sucessivas replicações do DNA. Esse evento dependente da replicação do DNA é conhecido como desmetilação passiva do DNA (CHEN et al., 2003).

Recentemente foi descoberto que a família de proteínas TET (*ten-eleven translocation*), enzimas membros de uma família de oxigenases, catalisam uma reação de oxidação que converte citosina metilada (mC) a citosina hidroximetilada (hmC) (NABEL e KOHLI, 2011). Além disso, a oxidação mediada por TETs resulta na formação de formilcitosina (fC) e carboxilcitosina (caC) que podem ser removidas pela glicosilase de timina do DNA (TDG) e reparadas pela via de reparo por excisão de base. Em combinação, esses eventos são entendidos como desmetilação ativa do DNA (WU e ZHANG, 2010; TAHILIANI et al., 2009).

Os dinâmicos padrões de metilação do DNA são importantes durante o desenvolvimento embrionário, pois acredita-se que, nas células em diferenciação da linhagem embrionária, os promotores de genes específicos de outras linhagens não transcritos encontram-se metilados. Em contraste, os genes que são essenciais para as células da linhagem embrionário são mantidos não metilados (SPRUIJT e VERMEULEN, 2014). Adicionalmente, a metilação do DNA atua em muitos processos celulares incluindo o silenciamento de sequências repetitivas e inativação do cromossomo X (ROBERTSON e JONES, 2000).

O padrão de metilação nas células tumorais é alterado em relação às células normais com a hipermetilação de CGI em promotores sendo observada com alta frequência em diferentes tumores (HERVOUET et al., 2013; ROBERTSON e JONES, 2000). Além disso, muitos cânceres são caracterizados por uma hipometilação global que está associada com instabilidade cromossomal (HERVOUET et al., 2013).

Na literatura existem poucos estudos sobre o perfil de metilação de genes em tumores odontogênicos. O perfil de metilação de genes supressores de tumor tem sido detectado em tumores odontogênicos epiteliais benignos (MOREIRA et al., 2009). E o padrão de metilação de genes supressores de tumor também foi analisado em mixomas odontogênicos (MOREIRA et al., 2011).

A expressão de DNMT3A e de DNMT1 em cisto radicular, ceratocisto odontogênico, ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatoide também foi investigada por meio de imunohistoquímica. O padrão de imunexpressão de DNMT1 mostrou-se semelhante tanto nos cistos quanto nos tumores odontogênicos. Já a DNMT3A mostrou uma elevada expressão nos cistos e tumores odontogênicos (GOMES et al., 2010).

Abiko et al. (2007) reportaram a hipermetilação do gene *p16* em um caso de carcinoma ex-ameloblastoma. Os autores observaram hipermetilação do gene em áreas malignas, mas não em áreas benignas sugerindo que pode estar associada a desregulação da proliferação celular de ameloblastomas.

Em um estudo mais recente, a presença de metilação de *p16* em carcinoma ameloblástico foi investigada e comparada com ameloblastomas e folículos dentários. A presença de metilação em *p16* foi detectada em todas as amostras de carcinomas ameloblásticos. Nenhuma amostra de folículo dentário e apenas uma amostra de ameloblastoma demonstrou metilação do gene. Os autores, então, sugerem que a alteração epigenética do *p16* pode ter um papel na progressão maligna para carcinoma ameloblástico (KHOJASTEH et al., 2013).

Embora alguns estudos tenham demonstrado alterações epigenéticas nos ameloblastomas, a contribuição do perfil de metilação de genes relacionados com apoptose sobre o comportamento biológico dos ameloblastomas ainda não foi analisada. Este dado é importante para conhecermos os mecanismos biológicos envolvidos no comportamento de alguns desses tumores.

3.1 OBJETIVO GERAL

Identificar o perfil de metilação de genes relacionados a apoptose em ameloblastomas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar e comparar o perfil de metilação de 22 genes antiapoptóticos e pró-apoptóticos entre ameloblastomas unicísticos e multicísticos;
- Verificar a expressão do mRNA dos genes com níveis de metilação mais alterados.

4.1 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais sob protocolo 664.383 (Anexo A). Aos participantes voluntários maiores de 18 anos foi apresentado um termo de consentimento livre e esclarecido e aos participantes menores de 18 anos, assim como ao seu responsável, apresentou-se um termo de assentimento livre e esclarecido, conforme a resolução nº 466 de 2012 do Conselho Nacional de Saúde.

4.2 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para o presente estudo foram selecionadas 13 amostras de ameloblastoma que foram divididas em: 10 ameloblastomas multicísticos e 03 ameloblastomas unicísticos. As amostras tumorais foram obtidas de coletas após biópsia incisional ou biópsia excisional de casos da Clínica de Patologia, Estomatologia e Radiologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Os casos foram revisados e classificados em multicísticos e unicísticos por um patologista oral experiente (R.S.G.) de acordo com os critérios presentes na última classificação de tumores odontogênicos da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005).

Um total de 08 amostras de folículo pericoronário foram utilizadas como controle, as quais foram obtidas de pacientes saudáveis durante extrações de terceiros molares não erupcionados sem processo inflamatório associado.

Cada amostra foi dividida em dois fragmentos dos quais um foi imediatamente incluído em Tissue-Tek® (Sakura, Torrance, CA, USA) e RNAholder® (BioAgency, SP, Brasil) para extração de DNA e RNA, respectivamente. O outro fragmento foi fixado em formalina tamponada a 10% e embebido em parafina para preparação de lâminas histológicas e confirmação do diagnóstico.

4.3 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO DNA

O DNA das amostras foi extraído utilizando o *DNeasy Blood & Tissue Kit* (Qiagen, CA, USA) de acordo com protocolo do fabricante.

A concentração de DNA extraído foi determinada por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). A pureza do DNA foi analisada pelo mesmo método tendo como referência os valores de 1,7-1,9 para a razão de absorbância A260/A280 e de aproximadamente 2,0 para a razão A260/230.

A integridade do DNA foi analisada por eletroforese em gel de acrilamida que foi confeccionado respeitando as seguintes proporções: 1,73 ml de acrilamida 30%, 1,3 ml de TBE (Tris-Borato-EDTA) 10X, 5,15 ml de água destilada, 64 µl de APS e 6,4 µl de TEMED (*tetramethylenediamine*). A coloração da preparação foi pelo método de NaOH.

Conforme a concentração e a qualidade do DNA foram feitos três *pools*: 1) ameloblastoma multicístico, 2) ameloblastoma unicístico e 3) folículo pericoronário. Cada *pool* continha 1 µg de DNA.

4.4 ANÁLISE DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA

A análise do perfil de metilação do DNA foi realizada utilizando o EpiTect Methyl II PCR System (Qiagen, CA, USA) conforme descrição do fabricante. Esse método é baseado na detecção quantitativa de remanescentes de DNA após reação de digestão enzimática com enzimas de restrição sensível e/ou dependente de metilação que digerem o DNA não metilado e metilado, respectivamente.

4.4.1 Digestão enzimática de restrição

Cada amostra de DNA foi dividida em quatro frações iguais que correspondem a quatro diferentes digestões enzimáticas de restrição independentes: 1) digestão sem enzima (Mo), 2) digestão sensível a metilação (Ms), 3) digestão dependente de metilação (Md) e 4) digestão sensível a metilação mais dependente de metilação ou dupla digestão (Msd). Cada reação enzimática requer 1µg de DNA genômico. Portanto, foi utilizado 1µg de cada um dos três *pools* para as diferentes reações.

Em princípio, o tratamento enzimático com enzima sensível a metilação (Ms) seletivamente digere cópias de DNA não metilado e parcialmente metilado.

Conseqüentemente, a quantidade de DNA remanescente dessa reação representa a fração de DNA metilado. Em contraste, a digestão enzimática realizada pela enzima dependente de metilação (Md) digere cópias de DNA metilado e, dessa forma, determina a fração de DNA não metilado.

A quantidade de remanescente de DNA em cada reação enzimática é normalizada pela quantidade total de DNA inicial indicada pela fração de DNA tratado sem enzima (Mo). A dupla digestão (Msd) determina a fração de DNA inicial que não é susceptível a digestão pelas enzimas de restrição.

4.4.2 Real-time PCR

Após completada a fase de digestão enzimática, adicionou-se RT² SYBR Green qPCR Master Mix e o conteúdo foi adicionado a uma placa de PCR Array de 96 poços contendo *primers* pré-aliquotados. A reação de real-time PCR foi realizado no StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, DE, USA) programado de acordo com instruções do fabricante seguindo as condições cíclicas estabelecidas.

As quantidades relativas de DNA metilado e não metilado foram determinadas usando o método do *threshold* comparativo (ΔC_t). Para a análise do perfil de metilação do DNA no estudo foi utilizado um painel de 22 genes relacionados a apoptose (Tabela 1).

Tabela 1. Composição do painel de genes humanos analisados relacionados à apoptose.

Grupos	Genes
Indutores da apoptose	BAD, BAX, BCL2L11, BCLAF1, BID, BIK, BNIP3L, CASP3, CIDEB, CRADD, DAPK1, DFFA, FADD, GADD45A, HRK, LTBR, TNFRSF21, TNFRSF25 (DR3), TP53
Anti-apoptóticos	BAX, BNIP3L, DAPK1, HRK
Reguladores da apoptose	
Reguladores negativos	BIRC2, BNIP3L, CASP3, DAPK1, DFFA, TP53
Reguladores positivos	BAD, BAX, BCL2L11, BCLAF1, BID, BIK, BNIP3L, CIDEB, CRADD, FADD, HRK, TNFRSF25 (DR3), TP53
Caspase e reguladores	APAF1, BAX, CASP3, CASP9, CRADD, TP53

4.4.3 Análise de dados

Os resultados são apresentados em porcentagens de DNA metilado e DNA não metilado a partir dos valores obtidos de C_T que são copiados e transferidos para uma *template* de análise de dados (Microsoft® Excel®) disponível gratuitamente para *download* no *site* do fabricante do método.

4.5 EXTRAÇÃO E ANÁLISE DO RNA

Os genes que apresentaram maior diferença no padrão de expressão no perfil de metilação no ameloblastoma comparado com o folículo pericoronário foram validados através do padrão de expressão gênica do mRNA transcrito. O RNA total foi extraído de 04 amostras de ameloblastoma multicístico, 04 amostras de ameloblastoma unicístico, 04 amostras de folículo pericoronário e 03 amostras de mucosa normal utilizando o reagente TRIzol® (Ambion, CA, USA), de acordo com as especificações do fabricante.

A concentração do RNA total extraído foi determinada por espectrofotometria utilizando o espectrofotômetro Nanodrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, DE, EUA). A pureza do RNA foi analisada pelo mesmo método tendo como referência os valores de 1,7-1,9 para a razão de absorvância A260/A280 e de aproximadamente 2,0 para a razão A260/230. A integridade do RNA foi analisada no Agilent 2100 Bioanalyzer utilizando o kit Agilent RNA 6000 Nano Kit (Waldbronn, Alemanha).

4.6 TRATAMENTO COM DNase e SÍNTESE DE cDNA

O RNA extraído foi submetido a um tratamento com DNase I (Invitrogen, USA) objetivando eliminar uma possível contaminação com o DNA genômico. Posteriormente, o cDNA foi sintetizado via transcrição reversa utilizando SuperScript® VILO™ cDNA System Kit (Invitrogen, USA). Para a síntese do cDNA foi utilizado 1µg do RNA total tratado com DNase, seguindo as recomendações do fabricante. Após a conversão, o cDNA foi testado quanto à sua funcionalidade utilizando como gene alvo o 28S.

4.7 DESENHO E ANÁLISE DOS PRIMERS

As sequências alvos de cDNA para amplificação por qPCR, assim como o tamanho e o sítio dos *amplicons* foram identificados a partir de informações disponibilizadas na ferramenta *Gene* da base de dados PubMed. Os iniciadores para os alvos foram desenhados utilizando o *Primer Express® software* (Thermo Fisher Scientific, DE, USA) seguindo as instruções descritas no *Primer Express® Version 3.0 User Guide*. As sequências dos iniciadores escolhidos são apresentadas na Tabela 2.

Tabela 2: Iniciadores (*primers*) utilizados na qRT-PCR.

Gene	Primer	Sequência 5'- 3'	Tamanho do <i>amplicon</i> (pb)
BCL2L11	BCL2L11F	CAC AAA CCC CAA GTC CTC CTT	60
	BCL2L11R	TGG AAG CCA TTG CAC TGA GA	
TNFRSF25	TNFRSF25F	GCC ACC CTG ACC TAC ACA TAC C	68
	TNFRSF25R	CCA GCT TCA TCT GCA GTA ACC A	

4.8 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Para a análise de expressão gênica foi realizada qRT-PCR utilizou-se os reagentes do Power Up SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystem, DE, USA) de acordo com os volumes e condições térmicas cíclicas recomendadas pelo fabricante com StepOne Plus Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific, DE, USA). O método quantitativo utilizado para a análise dos níveis de expressão gênica foi o C_T comparativo, também conhecido como método $2^{-\Delta\Delta C_T}$. Os valores de C_T dos genes alvos foram determinados com relação ao gene endógeno (28S) e a amostra calibradora foi de mucosa oral normal.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o programa GraphPad Prism versão 6.0. Para determinação da significância dos níveis de expressão gênica foi utilizado o teste de normalidade (Kolmogorov-Smirnov) e o teste t de Student. O valor de p menor ou igual a 0,05 foi considerado estatisticamente significativo para os resultados observados.

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

No grupo de ameloblastoma multicístico, a média de idade foi 33,5 anos (variando de 21 a 50 anos) no momento do diagnóstico e a razão entre homens e mulheres foi igual a 1:2,3. O grupo de ameloblastoma unicístico apresentou indivíduos mais jovens com média de idade de 10,6 anos (variando de 10 a 12 anos) e a razão entre homens e mulheres foi igual a 1:2. Todos os casos de ameloblastoma foram localizados em mandíbula (Tabela 3).

Tabela 3: Características clinicopatológicas das amostras de ameloblastoma incluídas no estudo.

Tipo histológico	Idade		Gênero		Localização	
	Variação	Média	Feminino	Masculino	Mandíbula	Maxila
Multicístico (10)	21-50	33,5	7 (70,0%)	3 (30,0%)	10	0
Unicístico (3)	10-12	10,6	2 (66,6%)	1 (33,4%)	3	0

5.2 ANÁLISE DA METILAÇÃO DO DNA

Analisando o perfil quantitativo dos 22 genes relacionados as vias apoptóticas, 2 genes (*TNFRSF25* e *BCL2L11*) apresentaram as maiores diferenças na frequência de metilação. O *TNFRSF25* foi o que apresentou os maiores níveis de metilação nos três grupos estudados. Para esse gene, os *pools* de folículo pericoronário e de ameloblastoma unicístico mostraram frequências maiores (79,39% e 70,64%, respectivamente) se comparados ao *pool* de ameloblastoma multicístico (47,27%).

O *BCL2L11* também apresentou frequências de metilação maiores nos *pools* de folículo pericoronário e de ameloblastoma unicístico (58,37% e 59,50%, respectivamente) quando comparados ao *pool* de ameloblastoma multicístico (33,29%). Os demais promotores de genes estudados tiveram um perfil similar entre os três grupos, apresentando uma baixa frequência de metilação (Gráfico 1).

No *heatmap* dos resultados é possível ter uma visão geral e hierárquica representativa dos níveis de metilação do painel de genes relacionados a apoptose nos grupos analisados. A maioria dos genes apresentaram níveis de metilação

semelhantes. *TNFRSF25* e *BCL2L11* mostraram alto nível de similaridade entre si (Figura 5).

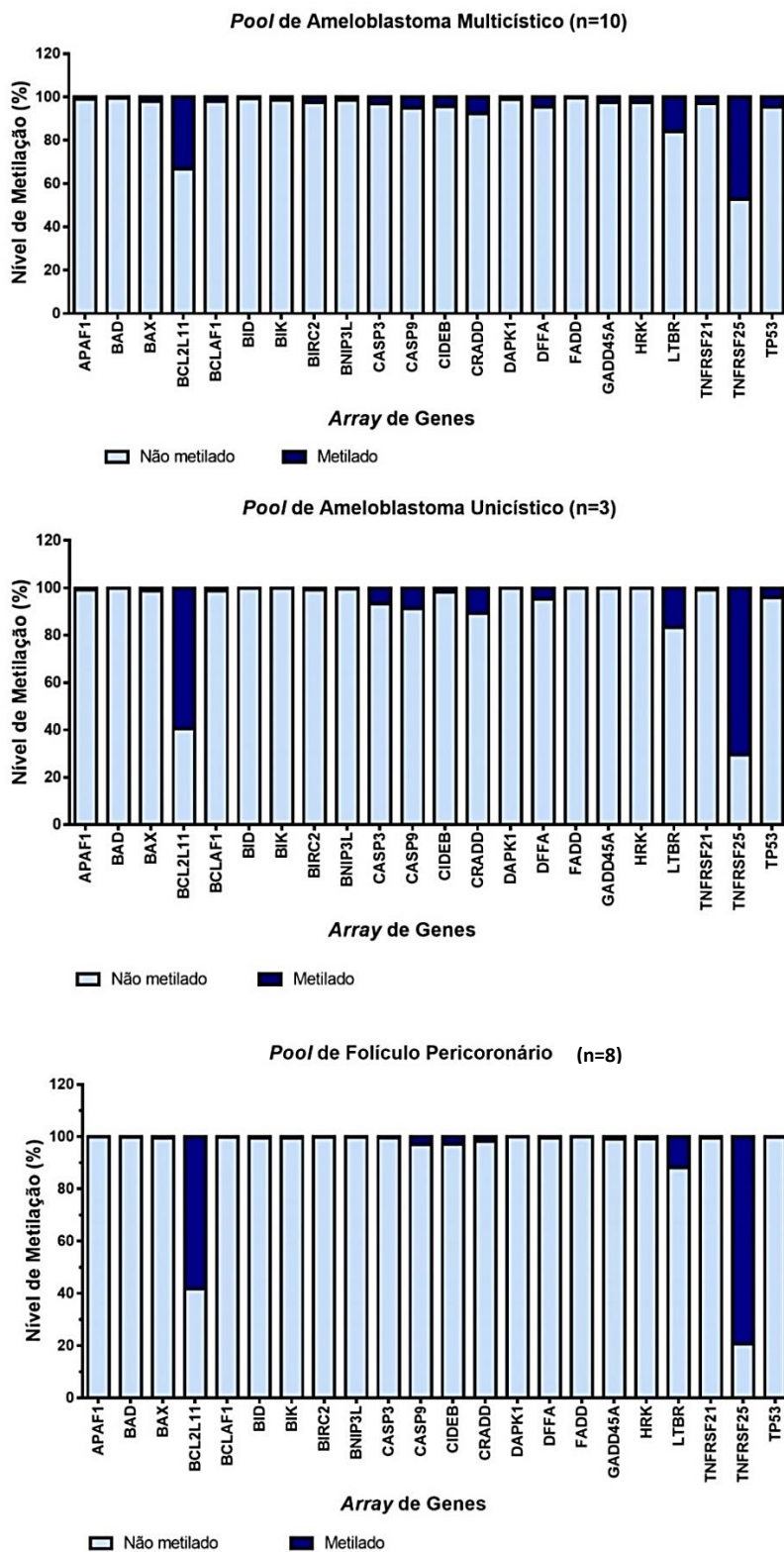


Gráfico 1: Perfil de metilação (%) dos genes relacionados a apoptose analisados nos grupos estudados. *Pool* de ameloblastoma multicístico, *pool* de ameloblastoma unicístico e *pool* de foliculo pericoronário.

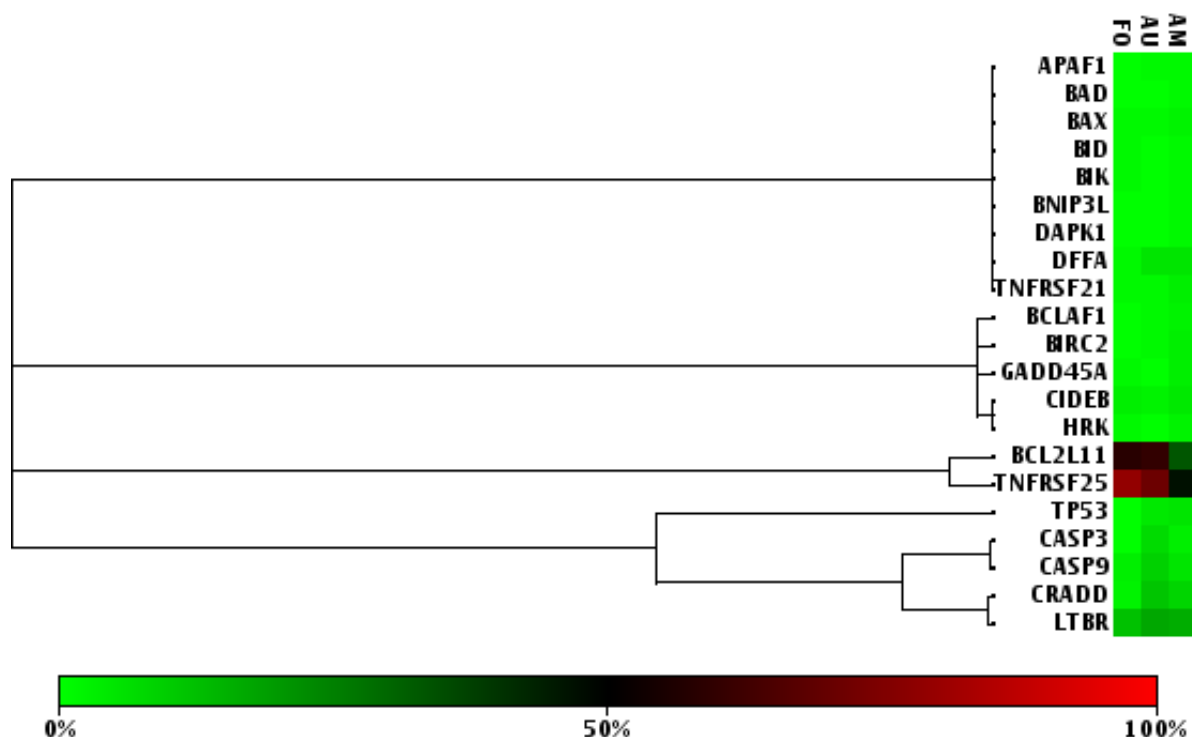


Figura 5: *Heatmap* mostrando o perfil de metilação dos genes relacionados a apoptose nos grupos estudados. Na escala de cor, quanto mais próximo do vermelho, maior o nível de metilação e quanto mais próximo do verde, menor o nível de metilação. No diagrama, as pequenas ramificações indicam maior nível de similaridade e as grandes ramificações representam menor nível de similaridade entre os genes. FO=folículo pericoronário; AU=ameloblastoma unicístico; AM=ameloblastoma multicístico.

5.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

Em relação ao gene *TNFRSF25* também observamos maior expressão nos ameloblastomas que nos tecidos normais. Houve diferença estatisticamente significativa dos ameloblastomas unicísticos em relação aos folículos pericoronários ($p < 0,05$) e as mucosas normais ($p = 0,05$). O ameloblastoma unicístico mostrou expressão maior que o ameloblastoma multicístico (Gráfico 2).

A expressão de *BCL2L11* foi maior nos ameloblastomas em comparação com os tecidos normais com diferença significativa em relação a mucosa normal ($p = 0,05$). Adicionalmente, o grupo de ameloblastoma multicístico mostrou expressão significativamente maior que o grupo de folículo pericoronário ($p = 0,05$). Dentre os ameloblastomas, a variante unicística mostrou maior expressão do gene que a variante multicística (Gráfico 3).

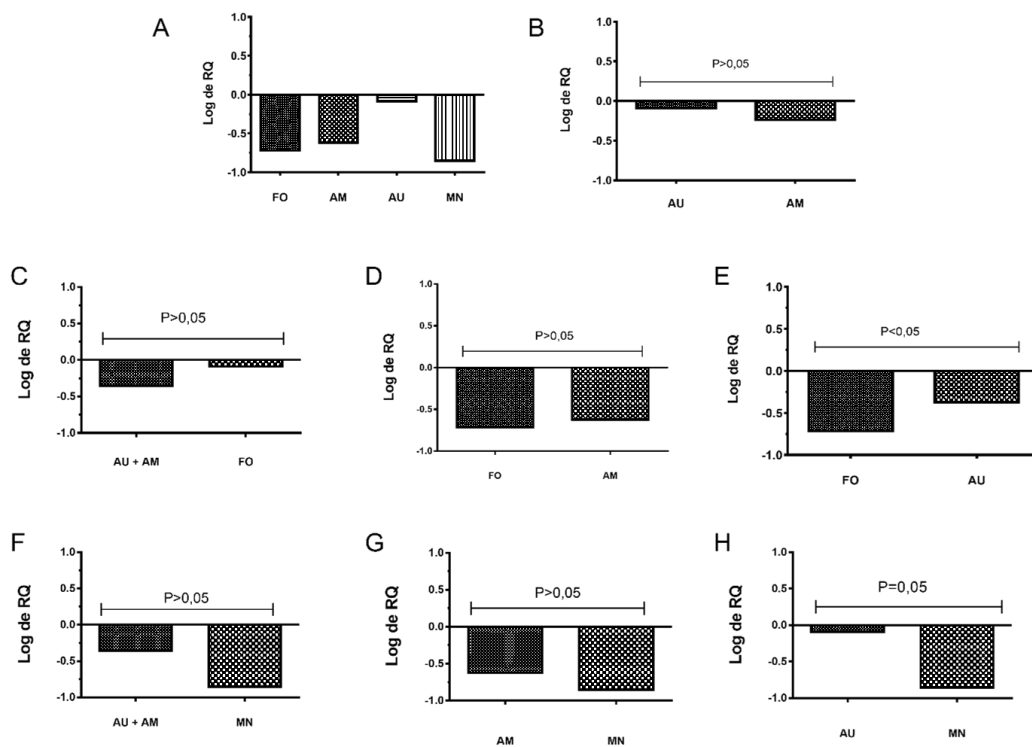


Gráfico 2: Expressão gênica de *TNFRSF25*. FO=folículo pericoronário; MN=mucosa normal; AU=ameloblastoma unicístico; AM=ameloblastoma multicístico.

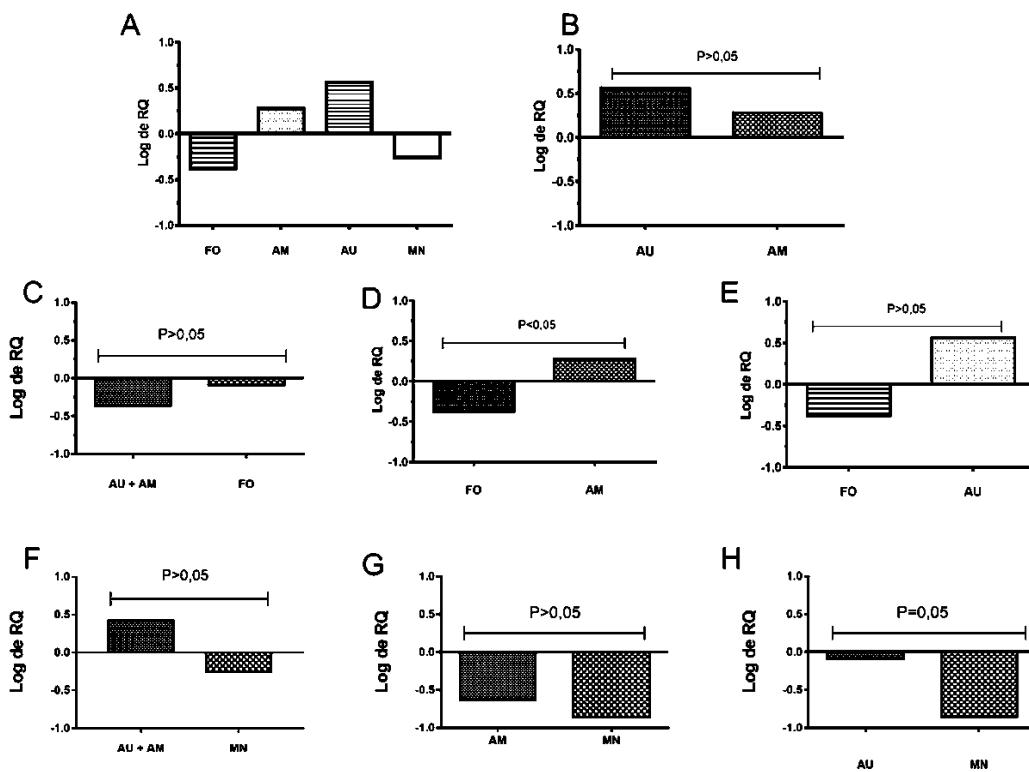


Gráfico 3: Expressão gênica de *BCL2L11*. FO=folículo pericoronário; MN=mucosa normal; AU=ameloblastoma unicístico; AM=ameloblastoma multicístico.

As alterações epigenéticas correspondem a um conjunto de mecanismos que são essenciais no desenvolvimento normal dos tecidos. Modificações no padrão epigenético podem levar a expressão aberrante ou ao silenciamento gênico (SHARMA et al., 2010). A metilação do DNA é a alteração epigenética mais comumente estudada em vários tipos de neoplasias, incluindo os tumores odontogênicos (GOMES et al., 2010; MOREIRA et al., 2011). Em ameloblastoma, um estudo avaliou o perfil de metilação de genes relacionados ao ciclo celular (MOREIRA et al., 2009). Apesar das neoplasias resultarem de um desequilíbrio no balanço entre a proliferação e a morte celular, não há dados na literatura sobre metilação do DNA de genes relacionados a apoptose em ameloblastoma.

Para o *TNFRSF25*, os resultados do nosso estudo mostraram menores níveis de metilação nos ameloblastomas em comparação com o folículo pericoronário. A expressão do gene foi maior nos ameloblastomas que nos tecidos normais. Desta maneira, os dados de expressão gênica confirmam a hipótese levantada pelos ensaios de metilação, onde observamos maiores níveis de metilação no folículo pericoronário. Os resultados nos ameloblastomas mostram que a maior expressão do gene pode estar relacionada com o menor nível de metilação da região promotora do gene *TNFRSF25*.

O *TNFRSF25* é um membro da superfamília de receptores TNF comumente conhecido como DR3 (*death receptor 3*) por ser um integrante da subfamília de receptores de morte caracterizados pela presença de um domínio intracelular, contendo domínio de morte (DD), que se liga a proteínas adaptadoras (WANG et al., 2014). Esse receptor é expresso em algumas células, principalmente linfócitos (XU et al., 2014).

O ligante de DR3 é o *TNFSF15*, outro membro da superfamília TNF, que também é conhecido como VEG1 (*vascular endothelial growth inhibitor-1*) ou TL1A (*TNF-like molecule 1A*). TL1A é expresso em diferentes tipos celulares, como células endoteliais, monócitos, macrófagos, células dendríticas e células T, e sua expressão é induzida por estímulos pró-inflamatórios (CAVALLINI et al., 2015; POBEZINSKAYA et al., 2011).

Após a ligação de TL1A a DR3, o receptor recruta seu adaptador primário TRADD (*TNFR-associated death domain protein*) que leva a formação de um

complexo de sinalização primário contendo TRAF2 (*TNFR-associated factor 2*) e RIP (*receptor interacting protein*). Estas moléculas são responsáveis por ativar o NF- κ B e ativar as vias das MAPKs (WANG et al., 2014; MEYLAN et al., 2011).

A despeito do nome de receptor de morte, DR3 apenas se associa a FADD, e conseqüentemente ativa a caspase-8, por meio de um complexo secundário que resulta na apoptose. Esse é o contraste desse membro em relação a outros receptores de morte que são capazes de se ligar diretamente a FADD em um complexo receptor primário. A apoptose é somente ativada por DR3 quando NF- κ B está inibido. O NF- κ B quando ativado induz proteínas inibidoras da apoptose (IAPs) que atuam como antiapoptóticas. Isso sugere que a ativação de NF- κ B pela interação TL1A-DR3 é responsável pela resistência a apoptose (WEN et al., 2003).

Diferentes estudos mostram expressão elevada de TL1A e DR3 em doenças autoimunes e inflamatórias como artrite reumatoide, psoríase e doença de Crohn (RICHARD et al., 2015; AIBA e NAKAMURA, 2013). Adicionalmente, outros estudos também avaliaram o papel da metilação em vários genes da apoptose, dentre eles o *TNFRSF25*, em câncer de mama, adenocarcinoma do colón, carcinoma gástrico, carcinoma de bexiga e adenocarcinoma de próstata (FRIEDRICH et al., 2004, CARVALHO et al., 2010, POBEZINSKAYA et al., 2011).

Estudos de Friedrich et al. (2004) analisaram o perfil de metilação em genes relacionados a apoptose, incluindo o *TNFRSF25*, em pacientes com carcinoma de bexiga e em cultura de células. O estudo mostrou um significativo aumento dos níveis de metilação em *TNFRSF25* na cultura celular de carcinoma de bexiga quando comparado ao grupo controle. Já os resultados das amostras de carcinoma de bexiga mostraram que o gene *TNFRSF25* foi altamente metilado na maioria dos casos, embora uma alta proporção de tecido normal também tenha apresentado altos níveis de metilação.

Estudos de Carvalho et al. (2010) avaliaram o perfil de metilação de alguns genes da apoptose em adenocarcinoma de próstata, mas com relação ao gene *TNFRSF25* não houve diferença no nível de metilação entre o grupo de tumores e o grupo controle.

Até o presente momento, não foram encontrados estudos sobre a regulação e expressão de DR3 e TL1A em doenças da região de cabeça e pescoço. Como a

sinalização TL1A-DR3 pode induzir tanto a ativação de NF- κ B quanto a apoptose, a expressão elevada de DR3 encontrada nos ameloblastomas também pode estar relacionada tanto à proliferação quanto a morte celular por apoptose.

O promotor do gene *BCL2L11* apresentou maior nível de metilação nos grupos de ameloblastoma unicístico e folículo pericoronário quando comparados ao ameloblastoma multicístico. Os níveis de expressão desse gene foram maiores nos tumores que nos controles. A menor expressão de *BCL2L11* nos folículos pericoronários pode ser associada aos elevados níveis de metilação, assim como os resultados nos ameloblastomas mostram uma tendência da associação entre a expressão do gene e a frequência de metilação na sua região promotora.

O *BCL2L11*, mais conhecido como Bim, é um membro pró-apoptótico da família de proteínas Bcl-2. Os membros da família Bcl-2 estão entre os mais importantes reguladores da apoptose, compartilham de um a quatro domínios BH (*Bcl-2 homology*) e podem ser divididos em três subfamílias: membros antiapoptóticos que possuem todos os quatro domínios BH, membros pró-apoptóticos que possuem três domínios BH e membros pró-apoptóticos somente BH3. Bim pertence ao grupo das proteínas somente BH3 que podem induzir a apoptose pela ligação e neutralização da atividade de membros antiapoptóticos, como Bcl-2, ou pela ativação direta de Bak e Bax (CZABOTAR et al., 2014). A proteína Bim é expressa em diferentes tipos de células incluindo hematopoiéticas, epiteliais e neuronais possivelmente tendo um papel essencial na homeostase de leucócitos e na prevenção de doenças autoimunes através da eliminação de linfócitos autoreativos (O'REILY et al., 2000).

Diferentes membros antiapoptóticos e pró-apoptóticos da família Bcl-2 e outras moléculas relacionadas a apoptose mediada por mitocôndria foram identificadas em germes dentários e ameloblastomas (KUMAMOTO e OOYA; 2005). Um estudo específico sobre as proteínas somente BH3 mostrou imunoreatividade semelhante de Bid, Bim, Bad, Noxa e Puma em ameloblastomas, carcinomas ameloblásticos, ameloblastomas metastatizantes e germes dentários, indicando que essas proteínas podem ter papel importante tanto no desenvolvimento normal quanto no desenvolvimento neoplásico do epitélio odontogênico. O estudo ainda observou um padrão de expressão distinto entre subtipos histológicos do ameloblastoma, sugerindo

que as proteínas somente BH3 também podem estar envolvidas na diferenciação das células tumorais (KUMAMOTO e OOYA, 2008).

Coutinho-Camilo et al. (2010) identificaram uma elevada expressão de Bim em carcinoma de células escamosas oral comparando com mucosa oral normal. Os autores associaram essa maior expressão à infiltração perineural sugerindo que essa proteína, apesar de ser pró-apoptótica, pode ter um papel importante na progressão tumoral. De acordo com os autores, o resultado pode ser explicado por mecanismos regulatórios que tornam Bim incapaz de interagir com outras proteínas da família Bcl-2. Adicionalmente, o estudo mostrou aumento da expressão de BimL, uma isoforma de Bim, associado com tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados e que a taxa de sobrevivência foi maior nos indivíduos com baixa expressão dessa isoforma sugerindo que a expressão de BimL pode ser utilizado como um fator de prognóstico para o carcinoma de células escamosas oral.

Diferentes autores concordam que membros antiapoptóticos da família Bcl-2 estão predominantemente expressos nas células periféricas das ilhas tumorais (KUMAMOTO et al., 2001; SANDRA et al., 2001; LUO et al., 2006). Kumamoto e Ooya (2008) observaram expressão predominante das proteínas somente BH3 na mesma localização sugerindo que a apoptose iniciada por proteínas somente BH3 pode ser inibida pela interação com proteínas antiapoptóticas da família Bcl-2. Além disso, Sandra et al. (2001) mostraram que o ameloblastoma possui mais proteínas da família Bcl-2 inibidoras (bcl-2 e bcl-x) da apoptose que proteínas indutoras da apoptose (bax e bak) propondo que o tumor tem uma alta atividade de sobrevivência.

Diferente do papel bem estabelecido na indução da apoptose, um recente estudo propôs que Bim pode atuar na promoção da sobrevivência celular, a partir da observação do aumento da expressão da proteína e da superregulação do seu gene em diferentes linhagens celulares de câncer de próstata e de mama em comparação com células normais. Além disso, a subregulação induzida de Bim resultou em apoptose. O estudo também observou que o fator de transcrição E2F-1 foi o responsável pela superregulação de Bim sugerindo a existência de múltiplos sítios de ligação para E2F-1 em seu promotor (GOGADA et al., 2012).

O fator de transcrição E2F-1 é normalmente regulado negativamente pela proteína supressora de tumor retinoblastoma (RB) e a expressão tanto de E2F-1

quanto de RB foram encontradas em ameloblastomas também predominantemente nas células periféricas das ilhas tumorais (KUMAMOTO e OOYA, 2006). A expressão de Bim e de seu regulador na mesma localização sugere que a função dessa proteína pode ser afetada por RB.

Nossos resultados mostraram expressão elevada de Bim nos ameloblastomas quando comparados aos tecidos normais. Dessa forma, o aumento da expressão de Bim pode estar relacionado tanto a apoptose quanto a sobrevivência das células tumorais do ameloblastoma.

Em uma análise comparativa em nove organismos vertebrados, Yang et al. (2014) sugerem que mudanças na expressão gênica estão relacionadas com a alteração do conteúdo de CpG normalizado (nCpG) dos promotores. nCpG é definido como a relação entre o número observado e o número esperado de CpG dentro de uma região de 3kb no sítio inicial de transcrição do promotor. Os resultados mostram que, em humanos, os genes com expressão aumentada tendem a ter maior quantidade de nCpG. Como CGIs associadas a promotores podem ser silenciadas através de metilação do DNA, o impacto da metilação do DNA na expressão gênica também dependeria do conteúdo de CpG na região promotora. Os autores observaram ainda uma fraca correlação entre a expressão gênica e a metilação de promotores que foi bem menor que a correlação encontrada entre o conteúdo de nCpG e a expressão gênica em humanos, pois a maioria dos genes altamente metilados foram transcritos com elevados níveis de expressão.

Em concordância com os resultados do estudo citado acima, a literatura mostra que a metilação de CpGs em promotores nem sempre resulta em silenciamento gênico, especialmente quando esses promotores são caracterizados por uma baixa densidade de CpG (SPRUIJT e VERMEULEN, 2014). Adicionalmente, existem fatores de transcrição que interagem com sequências de DNA contendo mCpG. Isso implica que, em certos casos, a metilação do DNA pode induzir a ativação da iniciação da transcrição ao invés de reprimir (SPRUIJT e VERMEULEN, 2014). Dessa forma, a relação entre metilação do DNA e expressão gênica pode ser positiva ou negativa. Como não determinamos a quantidade de CpG dos promotores dos genes analisados, os resultados encontrados de expressão gênica também podem ter relação com o

conteúdo de CpG nos promotores e com o contexto de interação de fatores de transcrição.

Vale ressaltar que os níveis de expressão de Bim e de DR3 na variante multicística foram menores que na variante unicística. Durante a evolução do tumor, o tipo unicístico pode se diferenciar para o tipo multicístico podendo ocorrer diferenças no perfil de metilação. Novos estudos são necessários para confirmar se esses genes estão relacionados com a progressão e evolução do tumor.

Os tumores unicísticos tem maior quantidade de estroma em relação ao parênquima tumoral e não foi possível realizar microdissecções para isolar os tecidos tumorais de interesse nas amostras devido a quantidade limitada de tecido para todos os experimentos. Dessa forma, os resultados podem ter influência da presença do estroma nesses tumores, apesar de Kumamoto e Ooya (2008) mostrarem ausência da expressão de Bim nas células estromais de ameloblastomas e variantes malignas. Outras limitações do presente estudo foram quanto ao pequeno número de amostras devido a raridade dos tumores, a necessidade de coleta e armazenamento de tecido fresco em condições adequadas para a realização dos experimentos e o uso de *pools*.

Com os resultados do estudo pode-se concluir que a expressão dos genes *TNFRF25/DR3* e *BCL2L11/Bim* está relacionada com o perfil de metilação da sua região promotora nos ameloblastomas e folículo pericoronário. Adicionalmente, os ameloblastomas unicísticos e multicísticos apresentam maior expressão desses genes comparados com folículos pericoronários e mucosas normais. Dessa forma, a expressão de *TNFRSF25/DR3* e *BCL2L11/Bim* pode ser relevante para o desenvolvimento do tumor, embora novos estudos, incluindo funcionais, sejam necessários para a confirmação dessa hipótese.

1. Abiko Y, Nagayasu H, Takeshima M, Yamazaki M, Nishimura M, Kusano K et al. Ameloblastic carcinoma ex ameloblastoma: report of a case-possible involvement of CpG island hypermethylation of the p16 gene in malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(1):72-76.
2. Aiba Y, Nakamura M. The role of TL1A and DR3 in autoimmune and inflammatory diseases. *Mediators Inflamm.* 2013;2013.
3. Amaral FR, Mateus GC, Bonisson LA, de Andrade BA, Mesquita RA, Horta MC et al. Cell proliferation and apoptosis in ameloblastomas and keratocystic odontogenic tumors. *Braz Dent J.* 2012;23(2):91-96.
4. Blattler A, Farnham PJ. Cross-talk between site-specific transcription factors and DNA methylation states. *J Biol Chem.* 2013;288(48):34287-34294.
5. Brown NA, Betz BL. Ameloblastoma: A Review of Recent Molecular Pathogenetic Discoveries. *Biomark Cancer.* 2015;7(Suppl 2):19-24.
6. Carlson ER, Marx RE. The Ameloblastoma: Primary, Curative Surgical Management. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64(3):484-494.
7. Carvalho JR, Filipe L, Costa VL, Ribeiro FR, Martins AT, Teixeira MR, Jerónimo C, Henrique R. Detailed analysis of expression and promoter methylation status of apoptosis-related genes in prostate cancer. *Apoptosis.* 2010; 15(8):956-65.
8. Cavallini C, Lovato O, Bertolaso A, Zoratti E, Malpeli G, Mimiola E, et al. Expression and function of the TL1A/DR3 axis in chronic lymphocytic leukemia. *Oncotarget.* 2015; 6(31):32061-74.
9. Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-846.
10. Cohen GM. Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem J.* 1997;326(Pt 1):1-16.
11. Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Expression of Bcl-2 family proteins and association with clinicopathological characteristics of oral squamouscell carcinoma. *Histopathology.* 2010;57(2):304-316.

12. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15(1):49-63.
13. Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;116(2):205-219.
14. Delpu Y, Cordelier P, Cho WC, Torrisani J. DNA methylation and cancer diagnosis. *Int J Mol Sci.* 2013;14(7):15029-58.
15. Dhanuthai K, Chantarangsu S, Rojanawatsirivej S, Phattarataratip E, Darling M, Jackson-Boeters L et al. Ameloblastoma: a multicentric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012;113(6):782-788.
16. Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BVA, Castro WH, Lacerda JCT, Cardoso SV et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015;36(7):5649-5653.
17. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495–516.
18. Ficz G. New insights into mechanisms that regulate DNA methylation patterning. *J Exp Biol.* 2015;218:14-20.
19. Florescu A, Simionescu C, Ciurea R, Pitru A. P53, Bcl-2 and Ki67 immunoexpression in follicular solid ameloblastomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):105-109.
20. Friedrich MG, Weisenberger DJ, Cheng JC, Chandrasoma S, Siegmund KD, Gonzalgo ML, et al. Detection of Methylated Apoptosis-Associated Genes in Urine Sediments of Bladder Cancer Patients. *Clin Cancer Res.* 2004;10(22):7457-65.
21. Gardner DG, Pecak AM. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. *Cancer.* 1980;46(11):2514-2519.
22. Ghandi D, Ayoub AF, Pogrel MA, MacDonald G, Brocklebank, LM, Moos KF. Ameloblastoma: A Surgeon's Dilemma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2006;64():1010-1014.

23. Gogada R, Yadav N, Liu J, Tang S, Zhang D, Schneider A et al. Bim, a proapoptotic protein, up-regulated via transcription factor E2F1-dependent mechanism, functions as a prosurvival molecule in cancer. *J Biol Chem*. 2013;288(1):368-381.
24. Goldberg AD, Allis CD, Bernstein E. Epigenetics: a landscape takes shape. *Cell*. 2007;128(4):635-638.
25. Gomes CC, Brito JA, Andrade CI, Gomez RS. DNA methyltransferase expression in odontogenic cysts and tumours. *Oncol Lett*. 2010; 1(1):143-146.
26. Gopisetty G, Ramachandran K, Singal R. DNA methylation and apoptosis. *Mol Immunol*. 2006;43(11):1729-40.
27. Henriques A, Cazal C, Fonsêca D, Bello D, Araújo N, Castro J. Considerações sobre a classificação e o comportamento biológico dos tumores odontogênicos epiteliais: revisão da literatura. *Rev Bras Cancerol*. 2009;55(2):175-184.
28. 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 institutionexperience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(1):e76-82.
29. Hervouet E, Cheray M, Vallette FM, Cartron PF. DNA Methylation and Apoptosis Resistance in Cancer Cells. *Cells*. 2013;2(3):545-73.
30. Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-288.
31. Jhamb T, Kramer JM. Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: Implications for therapeutics. *Exp Mol Pathol*. 2014;97(3):345-353.
32. Jones PA. Effects of 5-azacytidine and its 2'-deoxyderivative on cell differentiation and DNA methylation. *Pharmacol Ther*. 1985;28(1):17-27.
33. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

34. Khojasteh A, Khodayari A, Rahimi F, Ghaderian MH, Jafarian M, Nayebi A et al. Hypermethylation of p16 tumor-suppressor gene in ameloblastic carcinoma, ameloblastoma, and dental follicles. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(1):62-65.
35. Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors (Fas, Fas ligand, caspase-3 and single-strandedDNA) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2001;30(10):596-602.
36. Kumamoto H, Ooya K. Expression of tumor necrosis factor alpha, TNF-related apoptosis-inducing ligand, and their associated molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(5):287-94.
37. Kumamoto H, Ooya K. Detection of mitochondria-mediated apoptosis signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(9):565-72.
38. Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, Ristimäki A, Ruhin B, Kellokoski J et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol.* 2014;232(5):492-498.
39. Lai H, Wang J. Benign metastasizing ameloblastoma or malignant ameloblastoma? *J Craniofac Surg.* 2011;22(3):995-997.
40. Li TJ, Wu YT, Yu SF, Yu GY. Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(10):1385-1392.
41. 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.
42. Matos FR, de Moraes M, das Neves Silva EB, Galvão HC, de Almeida Freitas R. Immunohistochemical detection of receptor activator nuclear κ B ligand and osteoprotegerin in odontogenic cysts and tumors. *J Oral Maxillofac Surg.* 2013;71(11):1886-1892.
43. Mendenhall WM, Werning JW, Fernandes R, Malyapa RS, Mendenhall NP. Ameloblastoma. *Am J Clin Oncol.* 2007;30:645–648.

44. Meylan F, Richard AC, Siegel RM. TL1A and DR3, a TNF family ligand-receptor pair that promotes lymphocyte costimulation, mucosal hyperplasia, and autoimmune inflammation. *Immunol Rev.* 2011;244(1):188-96.
45. Mitsuyasu T, Harada H, Higuchi Y, Kimura K, Nakamura N, Katsuki T et al. Immunohistochemical demonstration of bcl-2 protein in ameloblastoma. *J Oral Pathol Med.* 1997;26(8):345-348.
46. 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.* 2009;38(1):99-103.
47. Nakamura N, Higuchi Y, Mitsuyasu T, Sandra F, Ohishi M. Comparison of long-term results between different approaches to ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002;93(1):13-20.
48. Organização Mundial de Saúde, Pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
49. Philipsen HP, Reichart PA. Unicystic ameloblastoma. A review of 193 cases from the literature. *Oral Oncol.* 1998; 34:317-325.
50. Philipsen HP, Reichart PA, Nikai H, Takata T, Kudo Y. Peripheral ameloblastoma: biological profile based on 160 cases from the literature. *Oral Oncol.* 2001;37(1):17-27.
51. Pobezinskaya YL, Choksi S, Morgan MJ, Liu ZG. The Adaptor Protein TRADD is Essential for TL1A/DR3 Signaling. *J Immunol.* 2011;186(9):5212–5216.
52. Pogrel MA, Montes DM. Is there a role for enucleation in the management of ameloblastoma? *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2009; 38: 807–812.
53. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: Biological Profile of 3677 Cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31B(2):86-99.
54. Rizzardi C, Leocata P, Ventura L, Zweyer M, Brollo A, Schneider M et al. Apoptosis-related factors (TRAIL, DR4, DR5, DcR1, DcR2, apoptotic cells) and proliferative activity in ameloblastomas. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1137-42.

55. Robertson KD, Jones PA. DNA methylation: past, present and future directions. *Carcinogenesis*. 2000; 21(3):461-7.
56. Robinson L, Martinez MG. Unicystic ameloblastoma: a prognostically distinct entity. *Cancer*. 1977;40(5):2278-2285.
57. 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(1):93-98.
58. Sandra F, Hendarmin L, Nakamura S. Osteoprotegerin (OPG) binds with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL): suppression of TRAIL-induced apoptosis in ameloblastomas. *Oral Oncol*. 2006;42(4):415-20.
59. Savithri V, Janardhanan M, Suresh R, Kumar RV. Desmoplastic ameloblastoma with osteoplasia: Review of literature with a case report. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013;17(2):298-301.
60. Schübeler D. Function and information content of DNA methylation. *Nature*. 2015 Jan 15; 517(7534):321-6.
61. Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*. 2010; 31(1): 27–36.
62. da Silva TA, Batista AC, Mendonça EF, Leles CR, Fukada S, Cunha FQ. Comparative expression of RANK, RANKL, and OPG in keratocystic odontogenic tumors, ameloblastomas, and dentigerous cysts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008;105(3):333-341.
63. Spruijt CG, Vermeulen M. DNA methylation: old dog, new tricks?. *Nat Struct Mol Biol*. 2014; 21(11):949-54.
64. Sridhar M, Bhaskar Reddy LR, Kharat S, Mahesh BS, Gandhi L, Mahendra A et al. Basal cell ameloblastoma: a rare histological variant of an uncommon tumor. *Niger J Surg*. 2015;21(1):66-69.
65. Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet*. 2014;46(7):722–725.

66. Tahiliani M, Koh KP, Shen Y, Pastor WA, Bandukwala H, Brudno Y et al. Conversion of 5-methylcytosine to 5-hydroxymethylcytosine in mammalian DNA by MLL partner TET1. *Science*. 2009;324(5929):930-935.
67. Vardimon L, Günthert U, Doerfler W. In vitro methylation of the BsuRI (5'-GGCC-3') sites in the E2a region of adenovirus type 2 DNA does not affect expression in *Xenopus laevis* oocytes. *Mol Cell Biol*. 1982 Dec;2(12):1574-1580.
68. Wang J, Al-Lamki RS, Zhu X, Liu H, Pober JS, Bradley JR. TL1-A can engage death receptor-3 and activate NF-kappa B in endothelial cells. *BMC Nephrol*. 2014 Nov 16;15:178.
69. Wen L, Zhuang L, Luo X, Wei P. TL1A-induced NF-kappaB activation and c-IAP2 production prevent DR3-mediated apoptosis in TF-1 cells. *J Biol Chem*. 2003;278(40):39251-39258.
70. Wright JM, Odell EW, Speight PM, Takata T. Odontogenic tumors, WHO 2005: Where do we go from here? *Head Neck Pathol*. 2014;8(4):373-82.
- Wyllie AH. Death in normal and neoplastic cells. *J Clin Pathol Suppl*. 1974;7:35-42.
71. Yang H, Li D, Cheng C. Relating gene expression evolution with CpG content changes. *BMC Genomics*. 2014;15:693.
72. Xu LX, Grimaldo S, Qi JW, Yang GL, Qin TT, Xiao HY et al. Death receptor 3 mediates TNFSF15- and TNF α -induced endothelial cell apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2014;55:109-118.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia
Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
Belo Horizonte – MG – 31.270-901 – Brasil
Tel. (31) 3409-2470 Fax: (31) 3409-2472
Site: www.odonto.ufmg.br – posgrad@odonto.ufmg.br



Ref. Projeto de Pesquisa-aprovação final

Em 10 de abril de 2015.

Prezado(a) Professor(a),

Vimos por meio desta, informar a V. Sa. que o projeto de pesquisa intitulado “**Análise do perfil de metilação de genes proapoptóticos e antiapoptóticos em ameloblastomas**”, apresentado pelo(a) aluno(a) **Sara Ferreira dos Santos Costa** do Curso de **Mestrado**, área de concentração em **Patologia Bucal**, sob sua orientação, foi apreciado e aprovado pelo CPGO em **08 de abril de 2015**.

Atenciosamente,

Prof. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Coordenadora do Colegiado do Programa
de Pós-Graduação em Odontologia-FO/UFMG
SIAPE: 6320580-0

Ao Professor
Ricardo Santiago Gomez
FOUFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa "Análise do perfil de metilação de genes proapoptóticos e antiapoptóticos em ameloblastomas". Para esse estudo, preciso coletar um pedaço de mucosa proveniente da cirurgia de extração do seu dente. O material coletado será utilizado como controle do estudo do perfil de metilação em tumores odontogênicos. Esse procedimento não irá interferir em nada na sua recuperação e na condução do caso. Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde e nem terá custos para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas destas doenças.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte da lesão que foi removida através de biópsia para conclusão do diagnóstico, neste projeto de pesquisa. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino. Será respeitado o meu direito de não ser identificado. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento.

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / ____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____

No. _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Sara Ferreira dos Santos Costa.

Telefone: (31) 34992477 / 97421947.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP). Em caso de dúvida, você pode ligar para o COEP através do número (31) 3499-4592. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901.