

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular

Bruna Viana Antonini Guimarães

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DO CICLO CELULAR E DE REPARO DO  
DNA EM AMELOBLASTOMA MULTICÍSTICO E UNICÍSTICO**

Belo Horizonte  
2016

Bruna Viana Antonini Guimarães

**PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DO CICLO CELULAR E DEREPARO DO  
DNA EM AMELOBLASTOMA MULTICÍSTICO E UNICÍSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-graduação em Medicina Molecular da  
Faculdade de Medicina da Universidade Federal  
de Minas Gerais, como requisito parcial para  
obtenção do título de Mestra em  
Medicina Molecular.

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Dra. Marina Gonçalves Diniz

Belo Horizonte  
2016

G963p Guimarães, Bruna Viana Antonini.  
Perfil de expressão de genes do ciclo celular e de reparo do DNA em Ameloblastoma Multicístico e Unicístico [recurso eletrônico]. / Bruna Viana Antonini Guimarães. -- Belo Horizonte: 2016.

80f.: il.

Formato: PDF.

Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.

Coorientador (a): Marina Gonçalves Diniz.

Área de concentração: Medicina Molecular.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ameloblastoma. 2. Tumor Odontogênico Escamoso. 3. Ciclo Celular. 4. Dano ao DNA. 5. Reparo do DNA. 6. Dissertação Acadêmica. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. sobrenome, nome(coorientador). III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WU 280



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA BRUNA VIANA ANTONINI GUIMARÃES

Realizou-se, no dia 22 de julho de 2016, às 09:00 horas, 3410- 2º andar da Faculdade de Odontologia - Campus Pampulha, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *PERFIL DE EXPRESSÃO DE GENES DO CICLO CELULAR E DE RESPOSTA AO DANO AO DNA EM AMELOBLASTOMA MULTICÍSTICO E UNICÍSTICO*, apresentada por BRUNA VIANA ANTONINI GUIMARÃES, número de registro 2014722387, graduada no curso de CIENCIAS BIOLÓGICAS/NOTURNO, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador (UFMG), Prof(a). Marina Gonçalves Diniz – Coorientador (UFMG), Prof(a). Jeane de Fatima Correia Silva (Newton Paiva), Prof(a). Sílvia Ferreira de Sousa (ICB/UFMG - Depto. Patologia Geral).

A Comissão considerou a dissertação:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, foi lavrada a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 22 de julho de 2016.

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes ( Doutora )

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz ( Doutora )

Prof(a). Jeane de Fatima Correia Silva ( Doutora )

Prof(a). Sílvia Ferreira de Sousa ( Doutora )

Aos meus pais, Zélia e Sidney.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço esta conquista aos meus pais, meus irmãos e à minha avó Berta, que sempre me apoiaram de forma incondicional, acreditaram e investiram em mim para que eu concluísse esta jornada.

À Marina que me guiou desde a iniciação científica até o final do mestrado de forma ética, responsável e didática e que foi imprescindível para a conclusão deste trabalho. À Professora Carolina e Professor Ricardo, que me acolheram no laboratório e me auxiliaram da melhor forma possível no processo de se formar um Mestre.

Às amigadas que conquistei no laboratório que me ensinaram tanto nesses anos de convivência, que acrescentaram e acrescentam tanto no meu dia a dia: Flávia, Fabrício, Gefer, Aline, Alessandra, Josiane, Elisa, Leonardo, Thaís, Sílvia. Agradeço também às colegas de iniciação, principalmente Jéssica e Grazielle pelas colaborações ao longo do meu projeto. Aos demais colegas de laboratório, agradeço a paciência e a companhia.

Aos meus amigos de graduação, principalmente Gustavo, Dominique e Luíza, que se tornaram amigos para a vida toda e se fizeram presentes em todo o processo do Mestrado e também aos meus amigos de infância, que até hoje perduram ao meu lado.

Agradeço também à UFMG, à Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico que foram responsáveis pelo auxílio financeiro concedido a mim desde a Iniciação Científica até o Mestrado. Finalmente, agradeço aos pacientes portadores de ameloblastoma, que aceitaram participar desta pesquisa.

“Conhecimento é informação, sabedoria é  
entendimento; O conhecimento é coletado de fora, a sabedoria é  
um crescimento interior; O conhecimento é tomado de  
empréstimo, a sabedoria é sua,  
autenticamente sua;  
O conhecimento é aprendido, a sabedoria não é aprendida de ninguém.”

OSHO

## RESUMO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial benigno que apresenta comportamento agressivo e elevadas taxas de recorrência. As duas principais variantes de ameloblastoma apresentam diferenças relevantes no comportamento biológico, sendo a multicística mais agressiva e invasiva que a unicística. A desregulação na expressão de genes do ciclo celular e de genes de reparo do DNA está envolvida com diferentes características de células neoplásicas, como invasão e migração e também pode estar relacionada à progressão de tumores e lesões pré-malignas. Levando isso em consideração, o objetivo do presente estudo foi avaliar diferenças no perfil de expressão de genes do ciclo celular e de reparo do DNA em ameloblastoma multicístico e unicístico. No ensaio para avaliação de genes do ciclo celular foram investigados 84 genes e incluídas 3 amostras de cada variante, enquanto no ensaio de genes de reparo do DNA foram investigados 48 genes em 4 amostras de cada variante. Os resultados apontaram catorze genes com expressão diferenciada no ensaio de ciclo celular, sendo que dez estão mais expressos em multicístico: *CCND1*, *CCNG2*, *CCNT1*, *CDK5RAP1*, *CDK6*, *HUS1*, *MAD2L1*, *MCM5*, *SKP2*, *TP53* e quatro apresentaram menor expressão em multicístico comparado ao unicístico: *BCCIP*, *CCNC*, *CDK1* e *MAD2L2*. No ensaio de genes de reparo do DNA, os genes *CHEK2* e *NTHL1* apresentaram maior expressão em multicístico, se comparado ao unicístico. Nas amostras avaliadas, a atividade transcricional dos genes nas amostras da variante multicística se mostrou mais elevada do que na unicística, em ambos os ensaios. Concluímos que genes relacionados ao controle do ciclo celular e ao reparo do DNA são diferencialmente expressos nas variantes de ameloblastoma e podem estar relacionados à diferença no comportamento biológico. A investigação dos genes diferencialmente expressos em um maior número de amostras e estudos funcionais podem ajudar a elucidar possíveis mecanismos por trás da patogênese e evolução dos ameloblastomas.

**Palavras-chave:** ameloblastoma; ameloblastoma multicístico; ameloblastoma unicístico; tumor odontogênico; ciclo celular; dano ao dna; reparo do dna; qpcr array; expressão gênica.

## ABSTRACT

Ameloblastoma is a benign epithelial odontogenic tumor with aggressive behavior and high recurrence rates. The two major variants of ameloblastoma present distinct biological behavior, while multicystic are more aggressive and infiltrative, the unicystic is encapsulate and more indolent. Desregulation in cell cycle gene expression and DNA repair genes are associated with different neoplastic cell characteristics, such as invasion and migration and also can be related to progression of tumors and precancerous lesions. The present study aimed to evaluate and to compare the gene expression profile of multicystic and unicystic ameloblastoma by using quantitative real time PCR array (qPCR array). Cell cycle qPCR array included 84 genes and three samples of each variant were investigated. DNA repair genes qPCR included 48 genes and four samples of each variant were investigated. The results showed fourteen genes differentially expressed in the cell cycle assay, of which ten were upregulated in multicystic compared to unicystic: *CCND1*, *CCNG2*, *CCNT1*, *CDK5RAP1*, *CDK6*, *HUS1*, *MAD2L1*, *MCM5*, *SKP2*, *TP53* and four genes showed lower expression in multicystic compared the unicystic: *BCCIP*, *CCNC*, *CDK1* and *MAD2L2*. In the DNA repair genes experiment, *NTHL1* and *CHEK2* showed higher expression in multicystic compared to unicystic. In the evaluated samples, gene transcriptional activity in samples of multicystic variant were higher than unicystic, in both tests. We conclude that relative expression of cell cycle genes and genes related to DNA damage response are differentially expressed in ameloblastoma variants and may be related to the distinct biological behavior. Further studies on the impact of such genes in the biological behavior of ameloblastoma cells might shed light on the mechanisms underlining pathogenesis and evolution of ameloblastoma tumor.

**Key words:** ameloblastoma; multicystic ameloblastoma; unicystic ameloblastoma; odontogenic tumor; cell cycle genes; dna damage; dna repair genes; qpcr array; gene expression.

## **LISTA DE FIGURAS**

- FIGURA 1** - PEÇA CIRÚRGICA DA VARIANTE MULTICÍSTICA DE AMELOBLASTOMA. **19**
- FIGURA 2** - PEÇA CIRÚRGICA DA VARIANTE UNICÍSTICA DE AMELOBLASTOMA. **21**
- FIGURA 3** - PROGRESSÃO DO CICLO CELULAR CONDUZIDA POR CDKS E CICLINAS. **24**
- FIGURA 4** - DANO AO DNA, MECANISMOS DE REPARO E AS POSSÍVEIS CONSEQUÊNCIAS. **37**
- FIGURA 5** - PLACA DE QPCR ARRAY COM ENSAIO DE 84 GENES DO CICLO CELULAR. **45**
- FIGURA 6** - LAYOUT DA PLACA CUSTOMIZADA DE 96 POÇOS CONTENDO 48 ENSAIOS DE GENES DE REPARO DO DNA. **48**
- FIGURA 7** - GRÁFICO VOLCANO PLOT – GENES DO CICLO CELULAR. **56**
- FIGURA 8** - GRÁFICO VOLCANO PLOT – GENES DE DANO AO DNA. **58**

## **LISTA DE TABELAS**

**TABELA 1:** CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS AMOSTRAS UTILIZADAS NOS EXPERIMENTOS. **42**

**TABELA 2:** LISTA DE GENES DO CICLO CELULAR QUE APRESENTARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA SUA EXPRESSÃO RELATIVA EM AMELOBLASTOMA MULTICÍSTICO COMPARADO AO UNICÍSTICO. **55**

**TABELA 3:** GENES DE REPARO DO DNA QUE APRESENTARAM DIFERENÇA SIGNIFICATIVA NA SUA EXPRESSÃO RELATIVA EM AMELOBLASTOMA MULTICÍSTICO COMPARADO AO UNICÍSTICO. **57**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CDK** - QUINASE DEPENDENTE DE CICLINA

**OMS** - ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE

**MAPK** – “MITOGEN ACTIVATED PROTEIN KINASES”

**EGFR** – “EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR”

**MMR** – “DNA MISMATCH-REPAIR”

**NER** – “NUCLEOTIDE EXCISION REPAIR”

**BER** – “BASE EXCISION REPAIR”

**HRR** – “HOMOLOGOUS RECOMBINATIONAL REPAIR”

**NHEJ** – “NON-HOMOLOGOUS END JOINING”

**ORC** – “ORIGIN RECOGNITION COMPLEX”

**PCNA** - “PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN”

**QPCR** – “QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION”

**CDNA** - DNA COMPLEMENTAR

**H&E** - HEMATOXILINA E EOSINA

**CT** – “CYCLE THRESHOLD”

**RQ** – “RELATIVE QUANTIFICATION”

**COEP**– COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

## SUMÁRIO

- INTRODUÇÃO .....	14
<b>1 - REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
1.1 - Tumores Odontogênicos .....	17
1.2 - Ameloblastoma.....	17
1.3 - Ameloblastoma multicístico/sólido .....	18
1.4 - Ameloblastoma Unicístico.....	20
1.5 - Ameloblastoma multicístico <i>versus</i> ameloblastoma unicístico .....	22
1.6 - Ciclo Celular.....	23
1.7 - Fase G1.....	25
1.8 - Fase S - Síntese de DNA .....	26
1.9 - Fase G2.....	27
1.10 - Fase M - Mitose .....	28
2.11. - Alterações no ciclo celular e neoplasias .....	30
2.12 - Dano ao DNA e Reparo.....	31
2.13 - Neoplasias e o dano ao DNA.....	35
<b>2 - OBJETIVO .....</b>	<b>39</b>
<b>3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
3.1 - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA.....	41
3.2 – RECRUTAMENTO DE PACIENTES E AMOSTRAS .....	41
3.3 - CORTE DAS AMOSTRAS .....	42
3.4 - EXTRAÇÃO DO RNA .....	43
3.5 - TRANSCRIÇÃO REVERSA.....	43
3.6 - AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA .....	43
3.7 - qPCR ARRAY – CICLO CELULAR .....	43
3.8 - qPCR ARRAY –REPARO DO DNA .....	46
3.9 - CÁLCULO DA FOLD-CHANGE.....	48
3.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	48
<b>4 - RESULTADOS.....</b>	<b>50</b>
4.1 - ANÁLISE VISUAL DOS RESULTADOS .....	50
4.2 - ESCOLHA DOS ENDÓGENOS .....	50
4.3 - TESTES DE QUALIDADE .....	51
4.4 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	52
4.5 - qPCR Array – Genes do ciclo celular.....	52
4.6 - qPCR Array – Genes de reparo do DNA.....	55

<b>5 - DISCUSSÃO</b> .....	57
<b>6 - CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	68



## 1 - INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico derivado do epitélio odontogênico e, apesar de ser benigno, possui comportamento invasivo e agressivo, além da grande tendência de recidivar. Este tumor desenvolve-se na mandíbula e na maxila e é classificado em quatro variantes pela Organização Mundial de Saúde (OMS): multicístico, unicístico, desmoplásico e periférico (Barnes, 2008). O presente estudo focou nas duas primeiras variantes, devido à maior taxa de frequência e às diferenças discrepantes no comportamento biológico (HERTOG, 2012; MELROSE, 1999; BARNES, 2005). Dentre as várias alterações moleculares encontradas nos diferentes subtipos de ameloblastoma, a mutação *BRAF V600E* é uma das mais relevantes. Esta mutação leva à ativação constitutiva da via de proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK), que está relacionada à importantes processos celulares como proliferação, diferenciação e migração (DHILLON, 2007). No entanto, a mutação *BRAF V600E* é encontrada em alta frequência tanto em ameloblastoma multicístico quanto unicístico (KURPPA, 2013; BROWN, 2014; BRUNNER, 2015; DINIZ, 2015; SWEENEY, 2015), o que nos leva a questionar se eventos moleculares adicionais seriam responsáveis por maior agressividade do subtipo multicístico.

Alterações na regulação do ciclo celular têm sido associadas com o desenvolvimento de vários tipos de neoplasias, incluindo tumores odontogênicos (KUMAR, 2011). O ciclo celular se divide em quatro fases, G1, S, G2 e M, e é regulado rigidamente por moléculas durante todas as fases de transição. As principais moléculas envolvidas são as ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDK), dado que elas são responsáveis diretas pela progressão do ciclo celular (CORDON-CARDO, 1995; BUNZ, 2008; MASSAGUÉ, 2004). Alterações de expressão de CDKs foram relatadas em melanoma, sarcomas, glioma, entre outros (WOLFEL, 1995). Alterações em ciclinas também foram encontradas em carcinomas de células escamosas no esôfago, bexiga, pulmão e mama (HALL e PETERS, 1996; WOLFEL, 1995). Em estudos imunohistoquímicos em ameloblastoma foi reportada relevante expressão de marcadores proliferativos como ki-67, PCNA e ciclina D1 (BOLOGNA-MOLINA, 2008; SANDRA, 2001). Colocalização da ciclina D1 foi observada com EGFR nuclear, um importante proto-oncogene, nas células neoplásicas de ameloblastoma (PEREIRA, 2015).

Durante a replicação do DNA no ciclo celular e durante o envelhecimento, o DNA sofre constantemente danos à sua estrutura, causados tanto por agentes endógenos quanto exógenos. Danos ao DNA não reparados podem ser responsáveis por gerar instabilidade genômica e, conseqüentemente, deixar as células mais vulneráveis à uma possível tumorigênese. Os principais danos causados ao DNA são quebra de dupla fita do DNA, formação de adutos de DNA, alterações em uma base nitrogenada ou um nucleotídeo e formação de dímeros (ALBERTS, 2006; HILLS and DIFFLEY, 2014). Para cada dano causado, o organismo responde com um sistema de reparo específico, que inclui enzimas de “Mismatch-repair” capazes de reparar um mal pareamento (MMR) e executar uma excisão de nucleotídeo ou base, do inglês “Nucleotide excision repair” (NER) e “Base excision repair” (BER). Também existem enzimas capazes de reparar por recombinação homóloga, ou “Homologous recombinational repair” (HRR) ou por extremidades não-homólogas, “Non-homologous end joining” (NHEJ) (BERNSTEIN, 2002). Alterações em genes de reparo do DNA estão descritas em várias neoplasias, como em câncer de bexiga, pulmão, mama e ovário, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (revisado em OLIVIER, 2010; revisado em TOSS, 2015; MASICA, 2015; DAMINENI, 2014). A ativação da resposta ao dano ao DNA também tem sido associada com a progressão de tumores e lesões pré-neoplásicas (BARTKOVA, 2005; GORGOULIS 2005). Em ameloblastoma, apesar dos avanços dos últimos anos em entender sua patogênese, os mecanismos moleculares responsáveis pela sua progressão e pela variação no fenótipo de agressividade e capacidade infiltrativa ainda é pobremente esclarecido.



## **2 - REVISÃO DA LITERATURA**

### **2.1 - Tumores Odontogênicos**

Os tumores odontogênicos constituem um grupo de lesões derivadas do tecido odontogênico epitelial, mesenquimal, ou de ambos, que variam de neoplasias benignas e malignas, até hamartoma ou outras desordens proliferativas não neoplásicas (BARNES, 2005). Estes tumores podem ser encontrados em tecidos moles, como gengiva, nas áreas que dão suporte aos dentes, sendo que os mais frequentes são intraósseos. Ocorrem predominante na mandíbula e em menor frequência na maxila (BARNES, 2005).

Os tumores odontogênicos são classificados, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em tipo de tecido e benignidade/malignidade, sendo eles: tumor odontogênico epitelial, tumor odontogênico epitélio/ectomesenquimal e tumor odontogênico ectomesenquimal, as lesões benignas. Carcinoma odontogênico e sarcoma odontogênico, as lesões malignas. Dentre os tumores do epitélio odontogênico está o ameloblastoma, classificado pela OMS nos subtipos multicístico/sólido, extra ósseo/periférico, desmoplásico e unicístico (BARNES, 2005).

### **2.2 - Ameloblastoma**

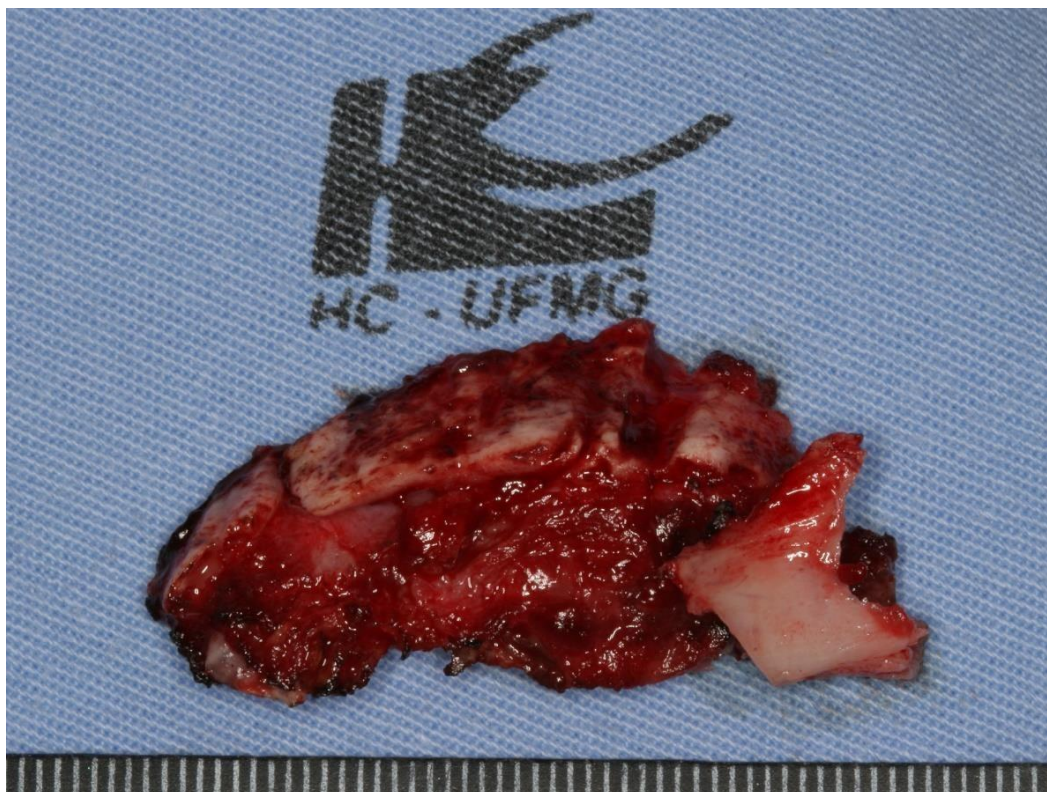
O nome ameloblastoma é derivado da palavra ameloblasto, que etimologicamente vêm da antiga palavra grega “Amel” que significa esmalte, e “Blasto”, germe. (GARNIER E DELAMARE, 1984; PACIORNICK, 1975). Os ameloblastos são as células responsáveis pela produção do esmalte do dente, que passam por fases de desenvolvimento durante a odontogênese que vão desde células indiferenciadas do epitélio interno do órgão do esmalte, passando por pré-ameloblastos, até o ameloblasto propriamente dito. (KATCHBURIAN & ARANA, 2004). O ameloblastoma é um tumor odontogênico que acredita-se ser derivado de células epiteliais do germe dentário, incluindo células da lâmina dentária e do órgão do esmalte (revisado em MELROSE, 1999). O ameloblastoma é benigno, de alta relevância clínica, sendo o segundo mais comum dos tumores odontogênicos, e possui uma forte tendência de recidivar após remoção cirúrgica (HERTOG, 2012).

Apesar da benignidade, o ameloblastoma é localmente invasivo e possui comportamento potencialmente destrutivo (AHMED & EL-AZAB, 2008), devido à

capacidade de infiltrar nos tecidos adjacentes e de possuir um crescimento expansivo. Ocorre na mandíbula e na maxila, sendo que 80% das lesões da mandíbula se encontram na região posterior. As lesões na maxila ocorrem com mais frequência também na região posterior (BARNES, 2005).

### **2.3 - Ameloblastoma multicístico/sólido**

O tipo mais comum de ameloblastoma é classificado como multicístico, representando 10% dos tumores odontogênicos em maxila e mandíbula. Este tipo apresenta crescimento lento, assintomático e é localmente invasivo devido à sua capacidade de infiltrar nas adjacências do tumor, como nos espaços medulares e cortical do osso (BACHMANN & LINFESTY, 2009). Na Figura 1 é possível visualizar a peça cirúrgica da variante multicística, apresentando destruição do tecido ósseo adjacente. De acordo com Neville (2009), existem cinco subtipos histológicos de ameloblastoma multicístico, o folicular, plexiforme, acantomatoso, de células basais e de células granulares. Os dois primeiros subtipos são mais frequentes, sendo que para fins clínicos não há relevância.



**Figura 1** - Peça cirúrgica da variante multicística de ameloblastoma mostrando limites imprecisos e envolvimento do osso mandibular na lesão.

#### **2.4 - Ameloblastoma Unicístico**

A variante unicística corresponde de 5% a 15% de todos os casos de ameloblastomas e mais de 90% dos casos acometem a mandíbula. Esta variante se apresenta como um cisto devido à presença de uma cápsula fibrosa que envolve a lesão, característica associada à tendência de menor agressividade e melhor prognóstico quando comparada à multicística. Todavia, ainda se apresenta como localmente destrutiva devido ao seu crescimento expansivo. (GARDNER, 1996; BARNES, 2005). Após a cirurgia de excisão de uma lesão de ameloblastoma unicístico é possível identificar a presença da cápsula fibrosa envolvendo a lesão (Figura 2). De acordo com Neville (2009) existem três subtipos histopatológicos de ameloblastoma unicístico, luminal, intraluminal/plexiforme ou mural.



**Figura 2** - Peça cirúrgica da variante unicística de ameloblastoma em que é possível observar os limites mais precisos delimitados pela cápsula, bem como o envolvimento da coroa do dente na lesão.

## 2.5 - Ameloblastoma multicístico versus ameloblastoma unicístico

É sabido que as variantes multicística e unicística diferem no quesito invasão e infiltração nos tecidos adjacentes, comportamento que reflete também a presença/ausência de cápsula envolvendo o tumor. A variante multicística é considerada mais agressiva e não possui cápsula fibrosa, ao contrário da variante unicística. Até o momento alguns poucos estudos tiveram como foco tentar elucidar essa diferença de comportamento clínico e biológico entre as variantes de ameloblastoma.

Em uma série de estudos recentes a mutação *BRAF* V600E foi encontrada em alta frequência em ameloblastomas do tipo multicístico e unicístico (KURPPA, 2013; BROWN, 2014; BRUNNER, 2015; DINIZ, 2015; SWEENEY, 2015). Esta mutação resulta na ativação constitutiva da proteína BRAF, levando a desregulação da via MAPK, uma via importante para processos celulares como proliferação, apoptose, motilidade e diferenciação celular (DHILLON, 2007). A presença da mutação *BRAF* V600E em ameloblastoma, independentemente do tipo, aponta semelhança na patogênese das variantes. Ainda não foi estabelecido se diferentes níveis de ativação da via MAPK, ou se outros mecanismos moleculares independentes, estariam por trás da diferença comportamental entre os subtipos de ameloblastoma.

No estudo de Bologna-Molina e colaboradores (2008), foi demonstrada imunoexpressão mais baixa de Syndecan-1 (*SDC1*) em ameloblastoma multicístico, quando comparado com unicístico. *SDC1* codifica uma proteína da superfície celular relacionada a interação entre matriz e célula e sua perda pode estar associada com o comportamento infiltrativo da variante multicística. Em outro estudo, foi reportado alto índice imunorreativo de metaloprotease CD10 em células estromais periféricas de ameloblastoma multicístico, quando comparado com unicístico (IEZZI, 2008). CD10 está presente na membrana celular e está correlacionada com o crescimento de tumores; sua alta expressão sugere uma participação no comportamento mais agressivo dos tumores multicísticos.

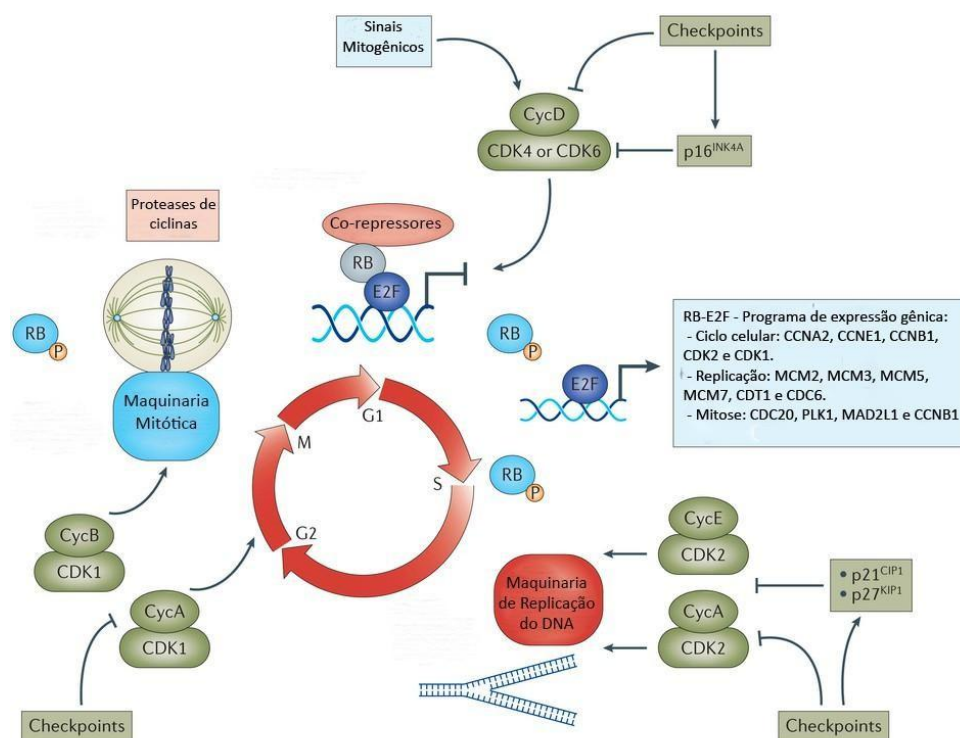
Outras alterações moleculares foram descritas tanto em ameloblastoma multicístico como unicístico, tais como elevada expressão da proteína P53 (SALEHINEJAD, 2011), e *PTCH*, e outros genes supressores de tumor (KUMAMOTO,

2004). Mutação no gene ameloblastina, cuja proteína está envolvida na diferenciação do ep t lio do esmalte, também foi encontrada em ambas variantes (PERDIGÃO, 2004). Outras altera es encontradas em ameloblastoma foram revisadas por Gomes e colaboradores em 2010, entretanto, as diferenças nas vias celulares que regulam a proliferação, bem como os mecanismos moleculares por tr s da formação de cápsula na variante unicística e da diferença de comportamento entre as variantes ainda não são esclarecidos.

## **2.6 - Ciclo Celular**

O ciclo pelo qual as células que estão se dividindo constantemente, ou   base de estímulos, passam durante a replicação é chamado de ciclo celular. O ciclo celular é dividido em várias fases bem compreendidas que recebem o nome de fase G1 (gap 1) de crescimento celular, síntese do DNA, ou fase S, fase G2 (gap 2) onde ocorre a distribuição dos cromossomos duplicados às células-filhas e, por último, divisão celular, chamada de mitose ou fase M (ALBERTS, 2006). Além dessas etapas, deve-se considerar também os importantes mecanismos de regulação de parada, checkpoint, reparo e controle negativo do ciclo. A regulação dessas etapas é fundamental para o desenvolvimento normal das células e altera es nesse processo podem levar à formação de neoplasias (CORDON-CARDO, 1995).

As principais moléculas responsáveis pela ativação de cada fase do ciclo celular são as proteínas chamadas ciclinas. Em cada estágio, uma ciclina específica se liga e ativa uma proteína quinase, chamada de quinase dependente de ciclina, ou CDK. Quando o complexo CDK-ciclina é ativado, ele fosforila substratos característicos a cada fase por meio de transferência de grupo fosfato de ATP para resíduos proteicos (BUNZ, 2008). Existem também as CDKIs, inibidoras de CDK, que podem atuar interrompendo a progressão do ciclo celular, caso haja uma condição desfavorável. Todas estas proteínas atuam de maneira coordenada nas várias etapas do ciclo. (HARTWELL & KASTAN, 1994). Na figura 3 é mostrada a progressão do ciclo celular conduzida por CDKs e ciclinas.



**Figura 3** - Progressão do ciclo celular conduzida por CDKs e ciclinas. Sinis mitóticos promovem a entrada da célula no ciclo celular ao estimular CDK4 e CDK6, enquanto checkpoints anti-proliferativos inibem atividade de CDK4-CDK6 ou induzem atividade do inibidor de CDK4 e CDK6, p16. O complexo ativado CDK4-CDK6 inicia a fosforilação de alguns substratos fundamentais, incluindo a proteína Rb, que ativa e desencadeia o programa de expressão gênica que é coordenado pela família de fatores de transcrição E2F. Com isso inicia-se a transcrição de ciclinas E e A e, conseqüentemente, CDK2 é ativada, o que contribui para a fosforilação de Rb e também para iniciar a replicação de DNA. A inibição de CDK2 pode ocorrer diretamente por checkpoints ou pelos inibidores p21 e p27 (KIP1). Com o fim da replicação de DNA, um complexo formado por CDK1-ciclina A fosforila substratos-alvo na fase G2. Caso não haja dano ao DNA, a célula ativa o complexo CDK1-CycB para progredir para a fase seguinte, mitose. No entanto, existem checkpoints que podem limitar a atividade de CDK1 e deter a progressão mitótica. A degradação da ciclina B por proteases é necessária para a progressão da anáfase e a produção de duas células-filha no final do ciclo. Após a fase M, se a célula continuar no ciclo celular, é necessário desfosforilar Rb para entrar novamente na fase G1 e a célula voltar a ser responsiva aos sinis mitóticos. No quadro, CDKs, ciclinas e outras moléculas que

constituem o programa de expressão gênica de *RB-E2F* durante várias fases do ciclo. (Adaptado de: ASGHAR, 2015)

## 2.7 - Fase G1

Entre a fase M, em que a célula se divide, e a fase S, quando ocorre duplicação do material genético, existe o intervalo G1, ou Gap 1. O mecanismo de entrada em G1 e progressão para a próxima fase é diferente em cada célula, porém o que é comum para todas é a dependência das CDKs. A ativação das CDKs determinará os próximos passos do ciclo celular ao se ligar a ciclinas específicas (MASSAGUÉ, 2004).

Nessa fase, a célula é responsável por corrigir danos ao DNA e erros no mecanismo de replicação (MASSAGUÉ, 2004). Além disso, ocorre também aumento do conteúdo celular, já como preparo para divisão celular posteriormente e, com isso, há um aumento da síntese de proteínas e RNA. A G1 também é a fase em que a célula “decide” se entrará em G0, que é o estado quiescente da célula, ou continuará com o ciclo celular, prosseguindo para a fase S (FOSTER, 2010)

A ciclina D1, codificada pelo gene *CCND1* e as CDKs 4 e 6 são protagonistas na progressão da fase G1 para a fase S, mas além da ação de ciclinas, o avanço do ciclo celular é regulado por outras moléculas que sofrem interação com o complexo ciclina-CDK. Em G1 existem duas moléculas cruciais para o desenvolvimento do ciclo, a RB, que é codificada pelo gene *RB1*. Esse gene funciona como supressor de tumor e, quando mutado, é responsável por neoplasias como retinoblastoma. Outra molécula importante é o fator de transcrição E2F, que modula a atividade de outras proteínas (BUNZ, 2008).

Ainda de acordo com Bunz (2008), na fase G1, a proteína RB e E2F estão ligadas uma na outra, o que impede a proteína E2F de se ligar a promotores de genes e codificá-los. Nessa fase há aumento da transcrição do gene *CCND1* e, conseqüentemente, ocorre aumento da ciclina D1 que ativa as CDKs 4 e 6, responsáveis por fosforilar RB. Com a RB fosforilada, E2F é capaz de regular positivamente a transcrição de genes no núcleo já que ela se libera do complexo formado anteriormente. Um dos genes ativados é o *CCNE1*, responsável por codificar

ciclina E que, ao lado da CDK2, é encarregada de dar prosseguimento à fase S, de síntese de DNA.

O DNA da célula está sujeito a vários tipos de danos, causado por radiação, agentes químicos ou mesmo agentes endógenos como espécies reativas de oxigênio, bioproduto do metabolismo. Se os mecanismos de verificação e correção detectam algum defeito na integridade do DNA, o ciclo celular para em G1 para tentar reparar ou induzir apoptose na célula, porém se esses mecanismos de reparo falham, a célula pode acumular erros que são consistentes com a possível formação de neoplasias. (MASSAGUÉ, 2004)

## **2.8 - Fase S - Síntese de DNA**

O processo de síntese, ou duplicação de DNA, envolve várias moléculas que desenvolvem atividades necessárias à replicação fidedigna, ou seja, que garantam que o genoma passado às células futuras seja mais livre de erros possível.

A replicação do DNA se inicia nas origens de replicação, regiões com sequências específicas de nucleotídeos encarregados de determinar onde a duplicação se iniciará (ALBERTS, 2006). Logo na fase G1, anterior à fase de síntese, existe um complexo pré replicativo formado por proteínas helicases do complexo MCM, uma proteína que funciona como carregadora dessa helicase, a Cdc6, e um complexo de reconhecimento de origem (ORCs). A replicação é ativada por ação de uma proteína quinase, a S-Cdk, que atuará nesse conjunto apenas na fase S, fazendo com que haja controle da atividade normal da duplicação do DNA (ALBERTS, 2004).

As proteínas do complexo MCM, ou complexo de manutenção de minicromossomos, são responsáveis pelos processos de iniciação e extensão do DNA, por meio de interações com a forquilha de replicação (LEE & HURWITZ, 2001). Além disso, elas também são encarregadas de controlar a replicação para que ela não ocorra mais de uma vez por ciclo (revisado em BLOW & DUTTA, 2005).

O complexo MCM já foi associado diversas vezes a variados tipos de neoplasias, por exemplo, em um estudo utilizando tumores de glândulas salivares, a proteína MCM-2 apresentou altos níveis de expressão tanto em lesões benignas, quanto

malignas (VARGAS, 2008) pode também ser considerado um marcador pré-neoplásico (ALISON, 2002).

As ORCs, ou proteínas do complexo de reconhecimento de origem, desempenham papéis fundamentais na replicação do DNA ao auxiliar no complexo pré replicativo, ajudando a reconhecer onde e quando a duplicação terá início. Estas são proteínas heteroméricas que, em conjunto com as outras, cooperam para manter o equilíbrio da maquinaria replicativa. A fita dupla de DNA se abre por ação de proteínas iniciadoras, que quebram as ligações de hidrogênio entre os nucleotídeos e, quando a replicação se inicia, as fitas formam a forquilha de replicação. Em conjunto com as helicases, responsáveis por abrir as fitas de DNA à medida que a forquilha progride, formam a maquinaria encarregada de duplicar o material genético (revisado em MÉCHALI, 2010; ALBERTS, 2004).

A DNA polimerase é a proteína chave dessa maquinaria pois, ao utilizar uma fita simples de DNA como molde, ela executa a duplicação ao polimerizar uma sequência exata complementar à do molde, sempre adicionando nucleotídeos no sentido 5'-trifosfato até 3'-OH terminal. A DNA polimerase se associa ao DNA e se desloca sobre ele por vários ciclos de polimerização e uma das grandes responsabilidades desta enzima, é manter a fidelidade de replicação, ou seja, corrigir os próprios erros de pareamento, evitando acúmulo de falhas nas células (ALBERTS, 2006).

Todo o processo de replicação, desde o complexo pré-replicativo em G1, até a formação de novas fitas, é controlado rigidamente por várias moléculas. Porém, estes eventos celulares são suscetíveis a erros que, se não corrigidos, podem levar a complicações nas células e causar uma instabilidade genômica. A célula só entra na próxima fase, G2, quando está em condições de continuar o ciclo celular, ou seja, quando a célula se encontra livre de erros. Porém, é possível que alguns erros consigam passar pelo sistema de reparo e, com isso, a célula passa a acumular defeitos.

## **2.9 - Fase G2**

A fase G2, é o checkpoint entre a replicação do DNA e a mitose. Essa fase é importante para evitar que a célula entre em mitose, caso ela tenha sofrido danos em

períodos anteriores. Assim como em G1, G2 funciona como um sistema de verificação de erros, caso necessário e preparação para próxima fase (ALBERTS, 2006).

A entrada da célula na fase de mitose é conduzida por uma proteína quinase regulatória, Cdc2/ciclina B, que é regulada por outras moléculas. Em G2, caso ocorra dano ao DNA, várias proteínas são ativadas a fim de parar a célula para que ocorra a correção ou, se preciso, apoptose. Existem, principalmente, duas proteínas quinases que são ativadas nessas ocasiões, ATR e ATM. A ATR quando ativada, fosforila a Chk1 e ATM fosforila Chek2. Ambas bloqueiam a atividade de Cdc25, que por sua vez, irá bloquear a ação de Cdc2/ciclina B, proporcionando a parada estratégica da célula, então a partir daí as proteínas responsáveis por reparo ou apoptose irão atuar (CAMPBELL, 2002). Caso a célula repare os possíveis defeitos, ou não tenha danos a corrigir, ela pode prosseguir para a próxima fase de divisão celular. Entretanto, existem os casos em que algum gene do sistema de reparo sofre mutação e a célula está sob o risco de acumular defeitos.

## **2.10 - Fase M - Mitose**

A fase M é constituída de dois estágios, a mitose e a citocinese. A grande responsabilidade da fase mitótica, é conseguir separar e distribuir com sucesso, os cromossomos duplicados na fase S, de forma ordenada, para que cada célula-filha receba uma cópia idêntica do genoma. Isto somente é possível por meio da ação de diversas proteínas que atuam em conjunto formando uma maquinaria complexa. A mitose é dividida em cinco fases, prófase, prometáfase, metáfase, anáfase e telófase (ALBERTS, 2006).

Na primeira fase da mitose, a prófase, as cromátides irmãs já estão ligadas umas às outras, via ação das coesinas. O complexo da coesina é formado por quatro proteínas, SMC1A, SMC3, RAD21/SCC1 e STAG/SCC3/SA e é fundamental para manter a adesão entre as cromátides, até a fase de metáfase, para que ocorra a segregação fiel dos cromossomos (MANNINI & MUSIO, 2011)

Também ocorre nessa fase a convocação das condensinas e de outras proteínas, pelos cromossomos, para que ocorra o processo de condensação. Este processo é importante para que os cromossomos alcancem estado compacto e não

ocorra enredamento de cromossomos durante a segregação. E por último, também acontece o início da formação do fuso mitótico, o posicionamento dos centríolos nos polos opostos e a polimerização dos microtúbulos a partir dos centrosomos (O'CONNOR, 2008; ALBERTS, 2006).

Na prometáfase, ocorre o rompimento do envelope nuclear, uma etapa importante para a divisão celular, pois só assim o fuso terá acesso aos cromossomos que antes se confinavam dentro do núcleo. Os microtúbulos do fuso se ligam aos cromossomos por uma estrutura chamada cinetócoro e se organizam para que os cromossomos atinjam os polos opostos nas fases seguintes. Nesse processo, ocorreria a quebra de cromátides, se não fosse a presença do complexo das coesinas (O'CONNOR, 2008)

Na próxima fase, a metáfase, é o ponto em que os cromossomos atingem o nível mais alto de compactação, sendo que é possível visualizar em experimentos o alinhamento cromossômico na região equatorial da célula. Na metáfase existe o mecanismo de checagem, conhecido por checkpoint do fuso mitótico, que verifica se o fuso está devidamente agregado e, teoricamente, somente as células em bom funcionamento entram na próxima fase. Dois genes que auxiliam nesse mecanismo, são o *MAD2L2* e *MAD2L1*, que codificam proteínas responsáveis por identificar esses erros (O'CONNOR, 2008; ALBERTS, 2006)

Na próxima etapa, a anáfase, ocorre a reação controlada de degradação da subunidade Scc1 das coesinas pela proteína separase. Consequentemente, o complexo das coesinas é destruído, fazendo com que o fuso puxe as cromátides irmãs em sentidos opostos (UHLMANN, 2003).

Por último, a telófase, período em que os cromossomos atingem os polos opostos da célula, um novo envelope nuclear se forma e os cromossomos começam a se descondensar. O segundo estágio da mitose, conhecido como citocinese, na verdade já é iniciado na anáfase, continuado na telófase, e finalizado quando as duas células-filhas são formadas. O processo se dá por intermédio de anéis contráteis, formados por actina e miosina, que encolhem no plano equatorial da célula, comprimindo a membrana plasmática para o interior e formando o sulco de clivagem. A

contração continua até que existam duas células separadas, cada uma com sua própria membrana plasmática (O'CONNOR, 2008; ALBERTS, 2006).

### **2.11. - Alterações no ciclo celular e neoplasias**

O ciclo celular e seus eventos são amplamente estudados na tentativa de entender a formação de diversas doenças, principalmente neoplasias, uma vez que a proliferação descontrolada é um paradigma da sua formação. Inúmeros estudos têm associado de forma consistente alterações moleculares e bioquímicas no ciclo celular com o fenótipo e/ou desenvolvimento de diferentes tipos de neoplasias. Por exemplo, mudança de expressão de CDKs são descritas em melanoma, sarcoma e glioma (WOLFEL, 1995), e alterações em ciclinas foram encontradas em carcinomas de células escamosas no esôfago, bexiga, pulmão e mama (HALL & PETERS, 1996). Moléculas relacionadas a checkpoint do ciclo celular, como MDM2, também mostraram alterações, por exemplo, em leucemia e linfoma (BUESO-RAMOS, 1995).

Foram reportadas alterações moleculares referentes ao ciclo celular também em variantes de ameloblastoma. Em um estudo de Kumar e colaboradores (2011), foi sugerido um provável envolvimento da expressão de ciclina D1, previamente citada na fase G1, com a proliferação celular. Em outro estudo realizado pelo nosso grupo, foi observada a co-expressão de ciclina D1 com EGFR nuclear, um receptor tirosina quinase envolvido na transdução de sinais mitogênicos. Este estudo sugere que EGFR nuclear poderia agir como ativador da expressão do gene da CCND1 tanto em ameloblastoma multicístico como unicístico (PEREIRA, 2015). A intensa atividade proliferativa dos dois subtipos de ameloblastoma foi demonstrada através da marcação imunohistoquímica de ki-67 em 120 amostras investigadas (BOLOGNA-MOLINA, 2008). Outro marcador proliferativo, a PCNA, que é uma proteína sintetizada durante o ciclo celular, também demonstrou alta marcação nas variantes de ameloblastoma (SANDRA, 2001).

Apesar de haver trabalhos publicados na literatura com o intuito de investigar o papel do ciclo celular e de suas moléculas na patogênese dos ameloblastoma, estes estudos são baseados em sua grande parte em trabalhos imunoistoquímicos e poucos ajudam a elucidar possíveis mecanismos por trás da diferença no comportamento clínico dos seus subtipos.

## 2.12 - Dano ao DNA e Reparo

Alterações genéticas são importantes para estabelecer a diversidade entre os indivíduos, porém existem algumas alterações permanentes tanto em células germinativas, quanto em células somáticas, que precisam ser corrigidas antes que a célula sofra mais agravos (ALBERTS, 2006). Alterações genéticas podem impedir ou alterar o funcionamento de um gene, ou da proteína codificada por ele, desestabilizando genes como os supressores de tumor, proto-oncogenes, genes de reparo ou genes de apoptose, o que aumenta a probabilidade de formação de neoplasias (BERNSTEIN, 2013).

O DNA é formado de nucleotídeos, estrutura formada por um grupamento fosfato, uma pentose, que no caso do DNA é a desoxirribose e no caso do RNA, a ribose e, por último, uma base nitrogenada. As bases são divididas em púricas (adenina e guanina) e pirimídicas (citosina, timina e uracila). A ligação química é feita entre adenina e timina ou entre guanina e citosina. No caso do RNA, a adenina se pareia com uracila. Uma alteração que é usual durante a replicação do DNA, é o pareamento incorreto de bases nitrogenadas (ALBERTS, 2006). Outros danos ao DNA ocorrem depois da sua replicação e podem ter causas endógenas ou exógenas. O sistema de reparo do DNA das células normalmente é eficiente quando se trata de danos endógenos, pois consegue parar a replicação e reparar o erro (BERNSTEIN, 2013).

Os agentes exógenos que mais comumente causam danos ao DNA são os componentes químicos presentes na fumaça do cigarro e as radiações como raio x, gama e raios cósmicos e raios ultravioleta, UVA e UVB. A fumaça do cigarro é constituída por uma mistura de mais de 5.300 substâncias químicas, em que 150 delas possuem propriedades tóxicas e podem ser responsáveis por causar o chamado estresse oxidativo nas células (BERNSTEIN, 2013). O estresse oxidativo pode ser causado também por fontes endógenas, por exemplo subprodutos da respiração em mitocôndrias, da degradação de ácidos graxos em peroxissomos ou provenientes de processos inflamatórios. Em condições normais, há um equilíbrio entre oxidantes e agentes antioxidantes, porém quando o equilíbrio se altera, ocorre o estresse oxidativo que causa lesão no DNA (WU, 2004).

Os agentes oxidantes que causam danos ao DNA são principalmente espécies reativas de oxigênio, como o radical hidroxila ( $\text{OH}^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ou o oxigênio singlete ( $^1\text{O}_2$ ), dentre outros. Danos também podem ser induzidos por espécies reativas de nitrogênio, como o peroxinitrito (KRYSTON, 2011). As lesões no DNA ocorrem por meio de adição do grupamento, por exemplo a hidroxila, à uma determinada posição em uma base nitrogenada, como a guanina. Com isso, gera-se um produto modificado, por exemplo a 8-hidroxi-2'-desoxiguanosina (8-OHdG), que não é letal para a célula, porém pode ser altamente mutagênico. Espécies reativas de oxigênio, além de se ligar a grupamentos, também podem perturbar a síntese de DNA e o reparo de danos, pois tem capacidade de inibir ou inativar proteínas antioxidantes e enzimas de reparo. De fato, altos níveis de marcadores de estresse oxidativo estão associados à alguns tipos de tumores, como por exemplo 8-OHdG em urina de pacientes com câncer colorretal (KRYSTON, 2011).

Outro agente exógeno importante por causar dano ao DNA é a radiação. A radiação ionizante é capaz de alterar as moléculas das células ao promover excitação, causando mudança de nível dos elétrons. O dano mais comum resultante dessa ação é a formação de ligações covalentes entre bases vizinhas de pirimidina, causando uma junção entre elas. Esta lesão se não for reparada possui um alto potencial mutagênico. O exemplo mais comum desse tipo de dano é o dímero de timina (ALBERTS, 2002). O outro tipo de radiação, a não ionizante, como raio X e raio gama, tem como efeito mais comum a quebra de ligações entre moléculas, o que pode resultar em quebra da fita de DNA, seja a fita simples ou fita dupla (CANNAN & PEDERSON, 2015).

A quebra de fita dupla do DNA é um dos danos mais relevantes que a célula e o sistema de reparo enfrentam, já que essa condição pode levar a um desequilíbrio na integridade genômica. (OSBORNE & URBANO, 2010). A quebra de dupla fita ocorre devido a ação de agentes oxidantes, subprodutos metabólicos, algumas substâncias químicas e também por erros de replicação e radiação ionizante (ALBERTS, 2002).

Outro tipo de estresse celular que pode levar à danos ao DNA, como a quebra da fita dupla, é chamado de estresse replicativo. A maquinaria replicativa é responsável por duplicar o material genético de forma acurada através de

mecanismos regulatórios, porém quando esses mecanismos falham, é possível que ocorra estresse replicativo. Este estresse é caracterizado por paradas ou colapsos da forquilha de replicação (HILLS & DIFFLEY, 2014) e pode ter diversas causas, como alteração na expressão das origens de replicação (ORCs), colisão entre complexos replicativos e transcricionais, lesões no DNA e super expressão de oncogenes (MAZOUZI, 2014).

Enquanto os proto-oncogenes estimulam a proliferação celular em um estado saudável da célula, os oncogenes apresentam aumento descontrolado das atividades proliferativas, diminuição da diferenciação celular e inibição de morte celular, caracterizando células neoplásicas (CHIAL, 2008). A super expressão de oncogenes, por exemplo após mutação ativadora de um proto-oncogene, pode resultar em estresse replicativo ao provocar iniciação de replicação não programada e também ativação prematura de ORCs, o que possivelmente gera parada ou bloqueio das forquilhas de replicação (revisado em GAILLARD, 2015) ou quebra de dupla fita de DNA, aumentando o risco de instabilidade genômica. Respostas ao dano ao DNA relacionadas ao estresse replicativo foram encontradas em lesões pré-neoplásicas, indicando um possível papel na tumorigênese, possivelmente por causar instabilidade genômica (GORGOU LIS, 2005).

Para cada tipo de dano ao DNA existe uma via de reparo específica que tentará eliminar ou minimizar erros. Cada via depende também de enzimas específicas. Se a célula detecta um dano, ou até mesmo um acúmulo de danos, a tendência é o reparo. Se o reparo não for eficiente, ocorre a apoptose programada. Caso nenhum desses mecanismos funcione, ou esteja sobrecarregado, a célula pode acumular erros suficientes para causar instabilidade. A figura 4 mostra esquematicamente o dano ao DNA, os mecanismos de reparo e as possíveis consequências.

O mecanismo de reparo de malpareamento de bases (MMR) entra em ação quando a própria DNA polimerase não consegue corrigir sozinha os erros de replicação, como inserção ou substituição de bases. Um conjunto de enzimas atua para tentar reverter o erro, como MLH1, MLHE e MSH2-MSH6, dentre outras, que são responsáveis por retirar a base incorreta e substituir pela correta. Muitas das enzimas

de reparo estão alteradas em tipos específicos de neoplasias (KUNKEL & ERIE, 2005).

Uma das formas de reparo, é chamada de reparo por excisão de nucleotídeo (NER). Essa via é necessária para corrigir erros causados normalmente por radiação UV, como formação de dímeros ou adutos de DNA. O processo é realizado por um conjunto de proteínas que reconhecerão o dano e substituirão por uma longa fila de, em média, 24 a 32 nucleotídeos. Esse conjunto é codificado por genes como *XPD*, *XPB*, *TP53*, *P33*, entre outros (BERNSTEIN, 2002)

Outra forma de reparar o DNA é por meio do reparo por excisão de bases (BER) que é destinado a danos que atingem somente uma base do DNA, seja por agentes oxidantes, metilações ou lesões espontâneas que causam perda das bases púricas (BERNSTEIN, 2002). Esse processo é coordenado por um conjunto de enzimas que são responsáveis por excisionar a base defeituosa, retirar o nucleotídeo, substituí-lo e, por fim, realizar a ligação da região afetada. Todas essas enzimas são codificadas por genes como *PARP* e *TP53*, que, se alterados, são agentes de eventos como, por exemplo, redução da sobrevivência celular e altas taxas de mutação (KIM & WILSON, 2012).

Quando há quebra de fita dupla do DNA, existem duas formas de reparo responsáveis por esse erro, o reparo por recombinação homóloga (HRR) e reparo por união de extremidades não-homólogas (NHEJ). HRR é a forma mais precisa de reparo, já que é utilizado uma sequência homóloga não danificada como molde para recuperar as informações perdidas na quebra da dupla fita (RENKAWITZ, 2014). Existem vários genes envolvidos nessa via de reparo, como *BRCA1*, *BRCA2*, *ATM*, *ATR*, *WRN*, *BLM*, entre outros. O mecanismo de cada gene é específico, mas, no geral, as proteínas codificadas por eles atuam para que o ciclo celular pare alguma fase do ciclo celular, S ou G2, e através da interação com outras moléculas, realizam o reparo. Também podem agir ao ativar várias cascatas de resposta ao dano e, em último caso, ativam vias de apoptose. (BERNSTEIN, 2002).

A segunda forma de reparo das quebras de fita dupla, é o NHEJ. De acordo com Bernstein (2002), NHEJ é menos eficiente que HRR, porém mais utilizada pelas

células de mamíferos. O reparo é feito através da ação de várias moléculas, por exemplo Ku, DNA-PK e DNA ligase IV, que serão responsáveis por alinhar as metades danificadas pela quebra, preencher a falha e ligar as extremidades. A razão de não ser tão eficiente quanto HRR, é que a fração recuperada no DNA não é homóloga à outra fita, porém essa forma de reparo é menos danosa que deixar a fita sem reparo (VOET, 2000).

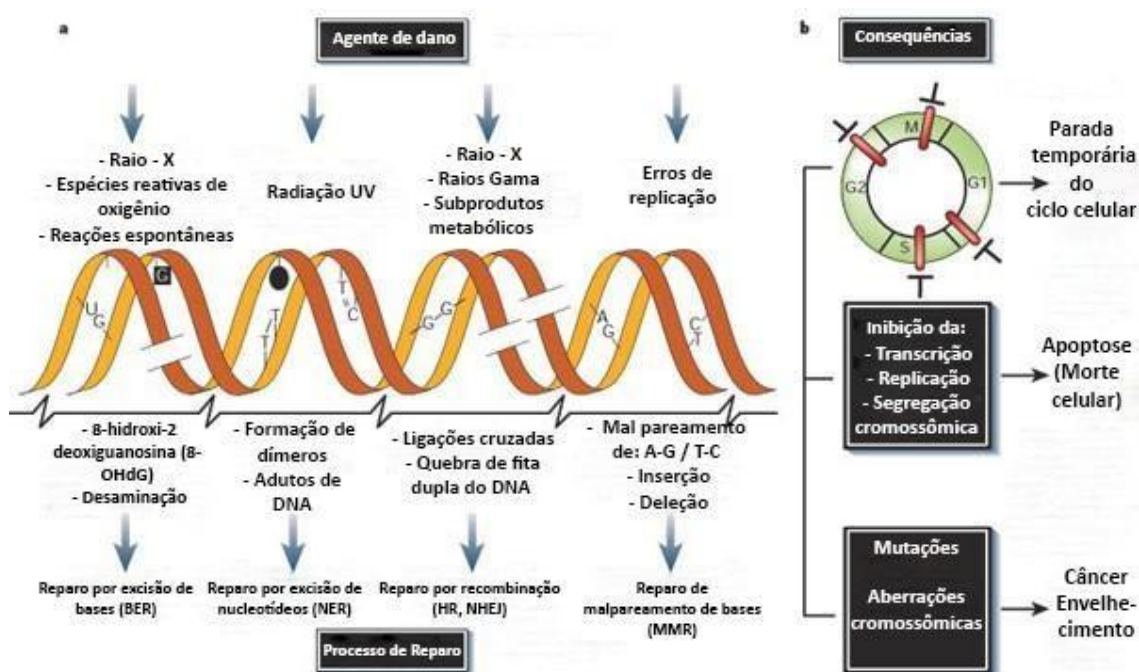
### 2.13 - Neoplasias e o dano ao DNA

O dano ao DNA e as inúmeras possíveis falhas nos sistemas de reparo são grandes responsáveis por diversas patologias, como ataxia-talangectasia relacionada ao gene *ATM*, ou xeroderma pigmentoso, referente ao gene *XPC* e câncer de mama e ovário, relacionados à *BRCA 1* e *2*. Outros exemplos, como o gene *TP53*, supressor de tumor, foi implicado em inúmeras neoplasias, como câncer de bexiga, pulmão, mama e ovário e carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (revisado em OLIVIER, 2010; revisado em TOSS, 2015; MASICA, 2015; DAMINENI, 2014). A proteína codificada por *TP53* tem sido implicada na patogênese de ameloblastomas (NA, 1999).

Alterações nos genes ligados ao reparo do dano ao DNA, e em suas vias, podem funcionar como agentes causadores de instabilidade genômica e podem ser selecionadas durante a progressão tumoral, por conferirem proliferação e sobrevivência da célula (BERNSTEIN, 2002).

A geração contínua de quebras de dupla fita ativa o checkpoint de dano ao DNA, erguendo uma barreira para a tumorigênese. No entanto, a quebra contínua de fitas de DNA também pode conduzir a instabilidade genômica (MACHERET & HALAZONETIS). De fato, achados experimentais recentes sugerem que, em ambas as lesões pré-cancerosas e cânceres, oncogenes ativados induzem estagnação e colapso das forquilhas de replicação do DNA, que por sua vez pode levar à formação de quebras de duplas fita de DNA. Esta formação contínua de quebras de DNA pode contribuir para a instabilidade genômica, característica da grande maioria dos cânceres humanos. Além disso, em lesões pré-cancerosas, estas quebras de DNA podem ativar *TP53* que, através da indução de apoptose ou senescência, levanta uma barreira para a progressão do tumor. Exemplos de oncogenes ativados que induzem quebra de fitas de DNA incluem *RAS*, *MYC*, ciclina E e *E2F1* (HALAZONETIS, 2008;

HALAZONETIS & MACHERET). Se a mutação oncogênica *BRAF* V600E, encontrada em alta frequência em ameloblastoma, poderia levar também ao aumento de quebras de fitas de DNA, estresse replicativo, e instabilidade genômica, ainda é uma especulação.



**Figura 4** -a. Agentes mais comuns que causam danos ao DNA; lesões que são induzidas por esses danos e os mecanismos específicos envolvidos no processo de reparo em cada lesão. b. Possíveis consequências do dano ao DNA no ciclo celular, levando à parada temporária da progressão; apoptose induzida por inibição da transcrição, replicação e segregação cromossômica e, por último, consequências mais graves como mutação ou aberração cromossômica e seus possíveis efeitos biológicos (Adaptado de: Hoeijmakers, 2001).

**OBJETIVO**

### 3 - OBJETIVO

- Comparar o perfil de expressão de genes relacionados ao ciclo celular e aos mecanismos de reparo do DNA em ameloblastoma unicístico e ameloblastoma multicístico por meio da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR array).



## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### Desenho experimental

Para a realização deste estudo, foram selecionadas amostras de ameloblastoma do tipo unicístico e do tipo multicístico. O RNA total de cada amostra foi extraído, convertido em DNA complementar (cDNA) e submetido a reação de arrays de reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) para o estudo de expressão gênica. Foram utilizados dois tipos de arrays, sendo um com ensaios de genes do ciclo celular e outro de genes relacionados ao reparo do DNA. Detalhes dos materiais e métodos estão descritos a seguir.

#### **4.1 - APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número 656.816. A coleta das amostras frescas de ameloblastoma foi realizada após a assinatura pelos pacientes do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido na clínica de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia da UFMG

#### **4.2 – RECRUTAMENTO DE PACIENTES E AMOSTRAS**

Foram levantadas as fichas clínicas dos pacientes atendidos na Faculdade de Odontologia da UFMG (FAO – UFMG) e as lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) dos casos de ameloblastoma multicístico e unicístico enviados e arquivados no Laboratório de Patologia da FAO-UFMG. As lâminas H&E e as fichas de cada caso foram revisadas por um patologista para confirmar o diagnóstico clínico e histopatológico dos casos de ameloblastomas. Oito casos foram selecionados para o estudo, sendo quatro de ameloblastoma multicístico e quatro de ameloblastoma unicístico.

Após a coleta, o material foi imerso em RNA later (Thermofisher, Carlsbad, CA, EUA) por 24 horas a 4 °C e posteriormente armazenado em nitrogênio líquido. A Tabela 1 mostra as informações de cada amostra utilizada nos experimentos.

Tabela 1: Características clínicas dos pacientes utilizadas nos experimentos

<b>Pacientes</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Localização</b>
<b>Multicístico I *</b>	24	F	Mandíbula posterior
<b>Multicístico II *</b>	28	M	Mandíbula posterior
<b>Multicístico III *</b>	39	F	Mandíbula posterior
<b>Multicístico IV**</b>	21	F	Mandíbula posterior
<b>Unicístico I *</b>	10	F	Mandíbula posterior
<b>Unicístico II *</b>	10	F	Mandíbula posterior
<b>Unicístico III *</b>	11	F	Mandíbula posterior
<b>Unicístico IV**</b>	12	M	Mandíbula posterior

\* Amostras utilizadas nos dois experimentos de qPCR Array. \*\* Amostras utilizadas apenas no array para genes de reparo do ao DNA. F: feminino; M: Masculino

#### **4.3 - CORTE DAS AMOSTRAS**

Todas as amostras congeladas de ameloblastoma foram cortadas para verificar a presença de epitélio neoplásico, utilizando um criostato modelo Microm Microtome Cryostat HM 500 OM (Ramsey, EUA) e seguindo os parâmetros adequados do equipamento. Cortes de 10 µm foram realizados sequencialmente e posicionados em lâminas histológica, coradas com azul de toluidina e observadas em microscópio óptico por um especialista. Somente amostras onde foi verificada a presença de epitélio neoplásico foram incluídas no estudo.

#### **4.4 - EXTRAÇÃO DO RNA**

O RNA total das amostras foi extraído utilizando-se o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) e tratado com DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Um microlitro (1 $\mu$ L) de cada amostra foi utilizado para a quantificação e análise de pureza do RNA no equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA). O parâmetro da razão 260/280, que determina a pureza do RNA, foi considerado aproximadamente 2,0, garantindo que não houve contaminantes, como proteínas. A razão 260/230 considerada foi de 1,8 a 2,2, garantindo um ácido nucleico puro (Thermo Fisher Scientific, 2013). O RNA extraído foi armazenado posteriormente a -80°C.

#### **4.5 - TRANSCRIÇÃO REVERSA**

Para o estudo de expressão dos genes do ciclo celular, 1  $\mu$ g de RNA foi utilizado para confeccionar a fita de cDNA, utilizando o RT2 First Strand kit (Qiagen, Maryland, EUA). O volume final de cDNA obtido foi de 102  $\mu$ L.

Para o estudo de expressão dos genes de reparo do DNA, o cDNA foi sintetizado a partir de 2,5  $\mu$ g de RNA total, através do SuperScript® VILO TM MasterMix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O volume final de cDNA obtido foi de 20  $\mu$ L.

#### **4.6 - AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA**

Para a avaliação de expressão gênica relativa, foram utilizadas placas de qPCR array. Para o qPCR de genes do ciclo celular foram usadas três amostras de ameloblastoma multicístico e três de unicístico. Para o qPCR de genes de reparo do DNA foram utilizadas quatro amostras de ameloblastoma multicístico e quatro de unicístico. Nos dois experimentos, as amostras de multicísticos foram consideradas como grupo teste e as de unicísticos como grupo controle. As amostras usadas em cada ensaio estão descritas na Tabela 1.

#### **4.7 - qPCR ARRAY – CICLO CELULAR**

Foram investigados a expressão relativa de 84 genes que fazem parte das diferentes etapas do ciclo celular. O qPCR array utilizado foi o Cell Cycle RT<sup>2</sup> Profiler PCR Array: SAB:PAHS-020C-12 (Qiagen, Germantown, MD, USA). Para a reação da qPCR, foi usado o reagente RT<sup>2</sup> SYBR Green qPCR Mastermix (Qiagen,

Germantown, MD, USA). O layout da placa de qPCR array está ilustrado na Figura 3. Uma placa de 96 poços foi utilizada para cada uma das amostras de cDNA. O mix para cada reação foi preparado para um volume final de 2700 µl, contendo 1350 µl de 2x RT2 SYBR Green Mastermix, 102 µL de cDNA e 1248 µL de RNase-free water. Foram distribuídos 25 µL de mix para cada poço da placa. As etapas de termociclagem para a qPCR seguiram a recomendação do fabricante. Os genes do ensaio estão listados a seguir, de acordo com cada etapa do ciclo celular:

Fase G1 e transição G1/Síntese de DNA: *ANAPC2, CCND1, CCNE1, CDC34, CDK4, CDK6, CDKN1B, CDKN3, CUL1, CUL2, CUL3, SKP2*; Fase Síntese de DNA: *ABL1, MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, PCNA, RPA3, SUMO1, UBA1*; Fase G2 e transição G2/Mitose: *ANAPC2, ANAPC4, DIRAS3, BCCIP, BIRC5, CCNB1, CCNG1, CCNH, CCNT1, CCNT2, CDK5R1, CDK5RAP1, CDK7, CDKN3, CKS1B, CKS2, DDX11, DNMT2, GTF2H1, GTSE1, HERC5, KPNA2, MNAT1, SERTAD1*; Mitose: *CCNB2, CCNF, CDK1, CDC16, CDC20, MRE11A, RAD51*; Regulação do ciclo celular: *ABL1, ANAPC2, ANAPC4, DIRAS3, ATM, ATR, BCCIP, BCL2, BRCA2, CCNB1, CCNB2, CCNC, CCND1, CCND2, CCNE1, CCNF, CCNH, CCNT1, CCNT2, CDC16, CDC2, CDC20, CDK2, CDK4, CDK5R1, CDK6, CDK7, CDK8, CDKN1A, CDKN1B, CKS1B, DDX11, E2F4, GADD45A, KNTC1, MKI67, PCNA, RAD9A, RB1, SKP2, TFDP1, TFDP2, ATM, BAX, BRCA1, CDKN2B, RBL1, RBL2, TP53*; E, por fim, checkpoints e paradas do ciclo: *ATM, ATR, BRCA1, BRCA2, CCNG2, CDC2, CDC34, CDK2, CDKN1A, CDKN1B, CDKN2A, CDKN2B, CDKN3, CHEK1, CHEK2, CUL1, CUL2, CUL3, GADD45A, HUS1, KNTC1, MAD2L1, MAD2L2, NBN, RAD1, RAD17, RAD9A, RB1, RBBP8, TP53*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12
B	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
C	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36
D	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
E	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
F	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72
G	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84
H	HK1	HK2	HK3	HK4	HK5	GDC	RTC	RTC	RTC	PPC	PPC	PPC

Housekeeping genes
Genomic DNA control
Reverse transcription controls
Positive PCR controls

**Figura 5 –Ensaio de genes do ciclo celular - Nas linhas de A a G estão os 84 genes do ciclo celular. Na linha H estão os ensaios para os cinco genes candidatos a controle endógeno para normalização da reação, HK 1, 2, 3, 4 e 5.. Nessa mesma linha, estão os genes para controle positivo da PCR (PPC), da transcrição reversa (RTC) e da presença de DNA genômico (GDC). Fonte: RT2 Profiler PCR Array Handbook, 2011. Disponível em [www.qiagen.com](http://www.qiagen.com)**

Os genes candidatos para controle endógeno foram *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH*, e *ACTB*. Três ensaios para controle da qualidade da reação foram incluídos (Figura 3): PPC, para controle positivo da PCR, que testa a eficiência da reação em cadeia da polimerase (PCR) por meio de primers que detectam a qualidade, pureza e integridade das amostras; RTC, para controle positivo da transcrição reversa, ou seja, testa a eficiência da reação feita com o kit de transcrição reversa por meio de um conjunto de primers. Por último, GDC para controle da presença de DNA genômico, que detecta com alto nível de sensibilidade a presença de DNA genômico não transcrito na amostra.

#### **4.8 - qPCR ARRAY –REPARO DO DNA**

As reações de qPCR Array para os 48 genes alvos que fazem parte das vias de reparo do DNA, foram realizadas utilizando o kit TaqMan® Array Plates (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As placas de 96 poços foram customizadas para conter 48 ensaios de diferentes genes para a corrida simultânea de duas amostras (Figura 6). A reação da qPCR foi realizada usando o reagente TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). O mix para cada amostra foi preparado para volume final de 528 µL, sendo 264 µL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix, 246 µL de DNase-free water e 18 µL de cDNA. Foram distribuídos 10 µL de mix para cada poço. As etapas de termociclagem para a qPCR seguiram a recomendação do fabricante. Os genes de vias de reparo do DNA investigados foram: *APEX1*, *ATM*, *ATR*, *BARD1*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CHEK1*, *CHEK2*, *ERCC1*, *ERCC2*, *FANCA*, *FANCD2*, *FANCG*, *FEN1*, *GADD45A*, *GADD45G*, *HUS1*, *H2AFX*, *LIG1*, *MAPK12*, *MBD4*, *MRE11A*, *MSH2*, *MSH3*, *NBN*, *NTHL1*, *OGG1*, *PARP1*, *RAD51*, *RAD52*, *RAD9A*, *TP53*, *XPA*, *XPC*, *PCNA*, *PNKP*, *PRKDC*, *RAD1*, *RAD17*, *RAD50*, *SMUG1*, *XRCC1*, *XRCC6*, *MLH1*. Já os genes candidatos a controle endógeno foram *18s*, *GAPDH*, *HPRT* e *GUSB*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
<b>A</b>	18S Hs999999 01_s1	GAPDH Hs999999 05_m1	HPRT1 Hs999999 09_m1	GUSB Hs999999 08_m1	APEX1 Hs001723 96_m1	ATM Hs011123 07_m1	18S Hs999999 01_s1	GAPDH Hs999999 05_m1	HPRT1 Hs999999 09_m1	GUSB Hs999999 08_m1	APEX1 Hs001723 96_m1	ATM Hs011123 07_m1
<b>B</b>	ATR Hs003548 07_m1	BARD1 Hs001844 27_m1	BRCA1 Hs015561 93_m1	BRCA2 Hs010374 14_m1	CHEK1 Hs009675 06_m1	CHEK2 Hs002004 85_m1	ATR Hs003548 07_m1	BARD1 Hs001844 27_m1	BRCA1 Hs015561 93_m1	BRCA2 Hs010374 14_m1	CHEK1 Hs009675 06_m1	CHEK2 Hs002004 85_m1
<b>C</b>	ERCC1 Hs010121 58_m1	ERCC2 Hs003611 61_m1	FANCA Hs011166 68_m1	FANCD2 Hs002769 92_m1	FANCG Hs001849 47_m1	FEN1 Hs007487 27_s1	ERCC1 Hs010121 58_m1	ERCC2 Hs003611 61_m1	FANCA Hs011166 68_m1	FANCD2 Hs002769 92_m1	FANCG Hs001849 47_m1	FEN1 Hs007487 27_s1
<b>D</b>	GADD45A Hs001692 55_m1	GADD45G Hs001986 72_m1	HUS1 Hs001895 95_m1	H2AFX Hs002667 83_s1	LIG1 Hs015535 27_m1	MAPK12 Hs002680 60_m1	GADD45A Hs001692 55_m1	GADD45G Hs001986 72_m1	HUS1 Hs001895 95_m1	H2AFX Hs002667 83_s1	LIG1 Hs015535 27_m1	MAPK12 Hs002680 60_m1
<b>E</b>	MBD4 Hs001874 98_m1	MRE11A Hs009674 37_m1	MSH2 Hs009535 23_m1	MSH3 Hs009890 03_m1	NBN Hs001595 37_m1	NTHL1 Hs00267 385_m1	MBD4 Hs001874 98_m1	MRE11A Hs009674 37_m1	MSH2 Hs009535 23_m1	MSH3 Hs009890 03_m1	NBN Hs001595 37_m1	NTHL1 Hs00267 385_m1
<b>F</b>	OGG1 Hs002134 54_m1	PARP1 Hs002423 02_m1	RAD51 Hs001534 18_m1	RAD52 Hs00172 536_m1	RAD9A Hs002702 40_m1	TP53 Hs010342 49_m1	OGG1 Hs002134 54_m1	PARP1 Hs002423 02_m1	RAD51 Hs001534 18_m1	RAD52 Hs001725 36_m1	RAD9A Hs002702 40_m1	TP53 Hs010342 49_m1
<b>G</b>	XPA Hs001660 45_m1	XPC Hs011042 06_m1	PCNA Hs006968 62_m1	PNKP Hs008925 44_m1	PRKDC Hs001791 61_m1	RAD1 Hs004218 91_g1	XPA Hs001660 45_m1	XPC Hs011042 06_m1	PCNA Hs006968 62_m1	PNKP Hs008925 44_m1	PRKDC Hs001791 61_m1	RAD1 Hs004218 91_g1
<b>H</b>	RAD17 Hs006078 30_m1	RAD50 Hs009900 23_m1	SMUG1 Hs002048 20_m1	XRCC1 Hs009598 34_m1	XRCC6 Hs019226 52_g1	MLH1 Hs001798 66_m1	RAD17 Hs006078 30_m1	RAD50 Hs009900 23_m1	SMUG1 Hs002048 20_m1	XRCC1 Hs009598 34_m1	XRCC6 Hs019226 52_g1	MLH1 Hs001798 66_m1

**Figura 6** - Layout da placa customizada de 96 poços contendo 48 ensaios de genes de reparo do DNA. A placa foi desenhada para a corrida simultânea de duas amostras.

#### 4.9 - CÁLCULO DA FOLD-CHANGE

Os resultados da qPCR foram analisados utilizando os valores do cycle threshold (Ct). Threshold é um valor que determina o limiar significativo acima da fluorescência inespecífica emitida na reação e Ct representa o número do ciclo no qual a reação ultrapassa esse limiar. Os valores de Ct foram exportados para o Excel e a expressão relativa dos genes foi calculada através da fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  da seguinte forma: foram nomeados dois grupos, grupo teste (multicístico) e grupo controle (unicístico). A partir disso, foi calculada a média da média geométrica dos Cts dos endógenos escolhidos (Ct med end) de cada grupo, e a média aritmética dos Cts de cada gene alvo (Ct med alvo) de cada grupo. A normalização da expressão gênica para cada grupo ( $\Delta Ct$  multicístico e  $\Delta Ct$  unicístico) foi calculada com a equação: Ct med alvo – Ct med end. Posteriormente determinou-se o  $\Delta\Delta Ct$ , ou seja,  $\Delta Ct$  grupo teste –  $\Delta Ct$  grupo controle. Por último, para obter o fold-change, utilizou-se a fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde 2 representa uma eficiência de 100% dos ensaios. Os valores  $>1$  representam uma expressão maior no grupo multicístico em relação ao unicístico. Os valores  $<1$  representam expressão menor no grupo multicístico comparado ao unicístico. Os valores  $<1$  foram representados pelo negativo do inverso do valor (fórmula:  $-(\text{fold-change})^{-1}$ ) para melhor interpretação biológica da fold-change.

#### 4.10 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para determinar os genes com a expressão relativa estatisticamente significativa entre os grupos, a expressão normalizada dos alvos em todas as amostras de ambos os grupos foi analisada por meio do Teste t de Student. A análise foi realizada conforme as seguintes plataformas on-line de análise de qPCR: RT2 Profiler PCR Array Data Analysis, versão 3.5 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) (Qiagen) e Thermo Fisher Cloud: The Relative Quantification (RQ) app, versão 3.1.0 (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/cloud.html>) (Thermo Fisher). Os valores de p considerados significativos foram abaixo de 0,05 ( $p < 0,05$ ).

**RESULTADOS**

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - ANÁLISE VISUAL DOS RESULTADOS

A baseline e o threshold de cada uma das corridas da qPCR foram definidos automaticamente pelos softwares de análise on-line próprio de cada fabricante. Posteriormente, as corridas foram visualmente inspecionadas a fim de detectar quaisquer inconsistências nas curvas de amplificação dos ensaios e no posicionamento da baseline e do threshold. O threshold foi considerada correto quando posicionado acima dos sinais inespecíficos e entre 1/3 e a metade da fase linear de amplificação para todos os poços da placa. Apenas depois da inspeção visual, os valores de Ct's foram usados para as análises posteriores. Todas as corridas e seus ajustes foram considerados bons para inclusão nas análises.

### 5.2 - ESCOLHA DOS ENDÓGENOS

A escolha dos genes endógenos destinados à normalização da expressão foi feita da mesma forma para os dois arrays. O desvio padrão e a diferença entre as médias da média geométrica dos Cts de todos os genes candidatos a endógenos de cada grupo foram calculados. Apenas os genes que obtiveram desvio padrão pequeno e média de Cts variando menos do que um entre os grupos foram considerados.

Para o array referente aos genes do ciclo celular, todos os endógenos candidatos foram escolhidos, são eles *B2M*, *HPRT1*, *RPL13A*, *GAPDH* e *ACTB*. O desvio padrão de cada gene, em todas as amostras, resultou respectivamente em 2,49, 1,97, 1,28, 1,61 e 2,19. Em seguida foi calculada a média da média geométrica dos Cts dos endógenos de cada grupo, teste e controle. A média da média do grupo teste foi 21,95, já a do grupo controle foi 21,58.

Para o array de genes de reparo do DNA também foram utilizados todos os genes endógenos candidatos, que são: 18s, *GAPDH*, *HPRT* e *GUSB*. O cálculo do desvio padrão de cada endógeno, em todas as amostras, resultou respectivamente em: 2,02, 3,49, 1,70, 2,93. O cálculo da média da média geométrica dos Cts dos endógenos de cada grupo, teste e controle, foi 19,14, 18,75, respectivamente.

### **5.3 - TESTES DE QUALIDADE**

Para o array de genes do ciclo celular foram realizados testes de qualidade da reação utilizando o software: RT2 Profiler PCR Array Data Analysis, versão 3.5 (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>) (Qiagen). Três aspectos foram analisados: a reprodutibilidade da reação de qPCR array, a eficiência da transcrição reversa e os níveis de contaminação por DNA genômico. Os resultados de todas as amostras foram satisfatórios para todos os critérios estabelecidos, tanto nas amostras de multicístico, quanto unicístico..

No array de genes de reparo do DNA não foram incluídas reações para testes de qualidade. Sendo assim, foram realizados previamente testes nas amostras de cDNA para avaliar a presença de fitas funcionais. Para isso foi realizado a qPCR para o gene 18s utilizando quatro concentrações das amostras de cDNA diluídas (1:2). Todas as amostras apresentaram curva de eficiência ~100% e expressão homogênea do endógeno.

#### **5.4 - RESULTADOS DA AVALIAÇÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA**

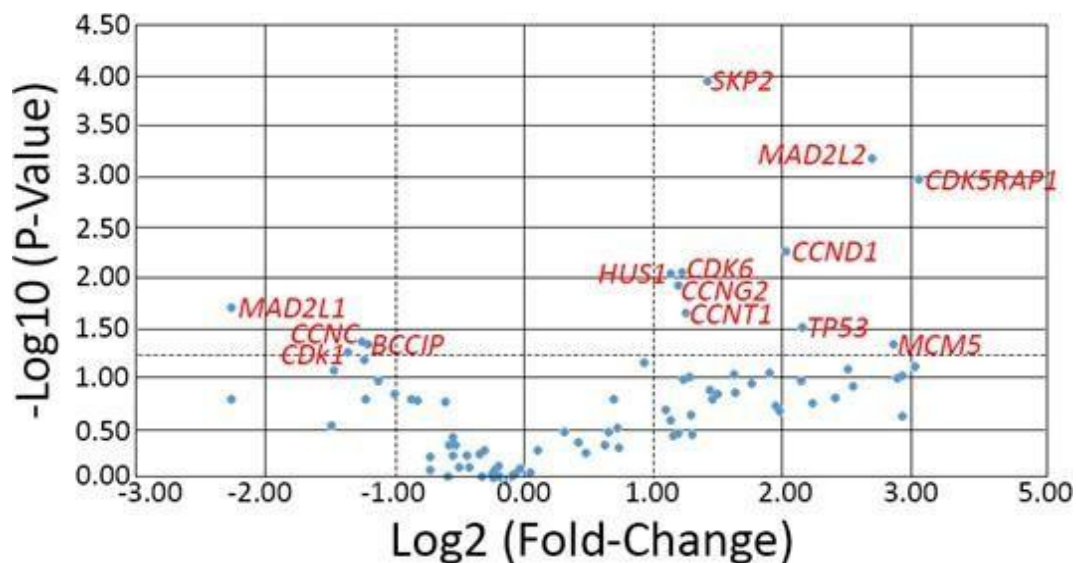
##### **5.5 - qPCR Array – Genes do ciclo celular**

Os resultados da expressão relativa dos genes do ciclo celular estão apresentados na Tabela 2 e figura 7. Catorze genes atingiram expressão diferenciada no ensaio de ciclo celular ( $p < 0,05$ ), sendo que dez mostraram expressão elevada em ameloblastoma multicístico, quando comparado com o grupo unicístico: *CCND1*, *CCNG2*, *CCNT1*, *CDK5RAP1*, *CDK6*, *HUS1*, *MAD2L1*, *MCM5*, *SKP2* e *TP53*. Quatro genes exibiram menor expressão em ameloblastoma multicístico, quando comparado ao grupo unicístico, que foram: *BCCIP*, *CCNC*, *CDK1* e *MAD2L2*.

Tabela 2: Lista de genes do ciclo celular que apresentaram diferença significativa na sua expressão relativa em ameloblastoma multicístico comparado ao unicístico

<b>Alvo</b>	<b>Fold-Change (<math>2^{-\Delta\Delta Ct}</math>)</b>	<b>p-value</b>
<i>BCCIP</i>	-2,33	0.045957
<i>CCNC</i>	-2,38	0.043246
<i>CCND1</i>	4,08	0.005503
<i>CCNG2</i>	2,29	0.011811
<i>CCNT1</i>	2,38	0.022637
<i>CDK1</i>	-2,56	0.054391
<i>CDK5RAP1</i>	8,34	0.001070
<i>CDK6</i>	2,33	0.008931
<i>HUS1</i>	2,19	0.009089
<i>MAD2L1</i>	-4,76	0.019934
<i>MAD2L2</i>	6,49	0.000665
<i>MCM5</i>	7,30	0.046356
<i>SKP2</i>	2,69	0.000114
<i>TP53</i>	4,46	0.030869

Os genes que mostraram maior expressão em ameloblastoma multicístico estão em vermelho. Em azul, os com menor expressão. Os valores de fold-change <1 foram representados como o negativo do inverso da fold-change:  $-(\text{fold-change}^{-1})$ .



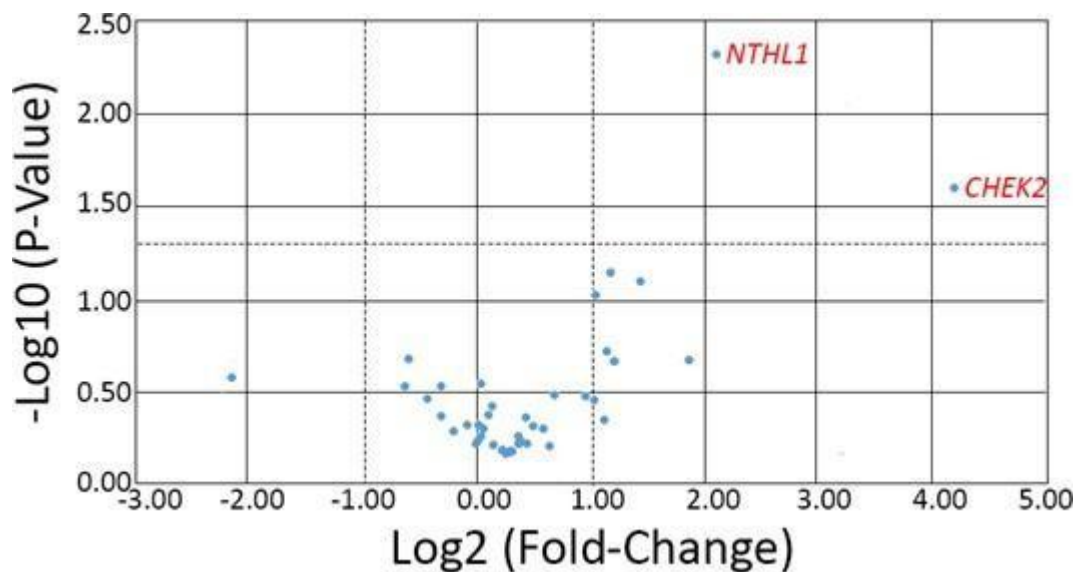
**Figura 7** - Gráfico Volcano Plot representando genes alterados no ensaio de ciclo celular. No eixo y a significância estatística baseada no valor de p e no eixo x, Log2 da fold-change. Do lado esquerdo, é possível observar os genes menos expressos em ameloblastoma multicístico, e do lado direito, os mais expressos, quando comparado ao grupo unicístico. A linha pontilhada horizontal representa  $p=0,05$ . As linhas pontilhadas verticais representam o fold-change = 2 para mais e para menos.

### 5.6 - qPCR Array – Genes de reparo do DNA

Os resultados da expressão relativa dos genes de reparo do DNA estão apresentados na Tabela 3 e Figura 8. Dois genes apresentaram expressão diferenciada no ensaio de genes de reparo do DNA. Os genes *CHEK2* e *NTHL1* estão mais expressos em multicístico, quando comparado com o grupo unicístico. Ambos exibiram resultados estatisticamente significativos, com valores de  $p < 0.05$ .

Tabela 3: Genes de reparo do DNA que apresentaram diferença significativa na sua expressão relativa em ameloblastoma multicístico comparado ao unicístico

Alvo	Fold-Change ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ )	p-value
<i>NTHL1</i>	3,58	0,007
<i>CHEK2</i>	15,23	0,037



**Figura 8** - Gráfico Volcano Plot representando genes alterados no ensaio de reparo do DNA. O eixo y mostra a significância estatística baseada no valor de p e no eixo x, Log<sub>2</sub> da fold-change. Do lado direito é possível observar os genes mais expressos em multicístico, quando comparado ao unicístico. A linha pontilhada horizontal representa p=0,05. As linhas pontilhadas horizontais representam o fold-change = 2 para mais e para menos.

## 6 - DISCUSSÃO

O ciclo celular e suas alterações são fundamentais para o estudo da tumorigênese, uma vez que a proliferação descontrolada é um paradigma da formação das neoplasias. Lesões no genoma das células são características compartilhadas por todas as neoplasias e, portanto, o estudo das alterações do sistema de reparo do DNA tem recebido bastante atenção por parte de importantes grupos de pesquisa do câncer. Neste estudo comparamos 84 genes relacionados ao ciclo celular e 48 genes relacionados ao dano ao DNA, em amostras de ameloblastoma multicístico e unicístico, em busca de diferenças que possam ajudar no entendimento do comportamento biológico distinto destas duas variantes. No ensaio de ciclo celular, dez genes mostraram expressão elevada em ameloblastoma multicístico em comparação com unicístico, e quatro genes mostraram menor expressão na variante multicística, em comparação com unicístico. No ensaio de dano ao DNA, dois genes também apresentaram maior expressão em multicístico, em comparação com unicístico.

### 6.1 - Genes do ciclo celular mais expressos em ameloblastoma multicístico

Mecanismos por trás da maior ativação da ciclina D1 em ameloblastoma multicístico ainda precisam ser determinados. Processos celulares distintos resultantes da mesma mutação *BRAF*, e em menor proporção *SMO*, em ambas variantes, poderiam estar por trás da diferença no comportamento biológico dessas. No presente estudo, a ciclina D1 mostrou-se mais expressa em ameloblastoma multicístico, o que pode refletir um ciclo celular mais ativo em comparação com a variante encapsulada.

O gene *CCND1* que codifica a ciclina D1 atua na transição G1/S do ciclo celular. Em condições normais, a ciclina D1 atua em conjunto com outras moléculas, por exemplo, *CDK6*, *E2F* e *RB*, e participam da transcrição de outros genes responsáveis por estimular a progressão do ciclo celular. Em situações em que essas moléculas sofrem alguma mutação ou alteração de expressão, elas favorecem fenótipos essenciais para a evolução tumoral, como proliferação descontrolada, crescimento independente (BILIRAN, 2005) e resistência a apoptose (TASHIRO & TSUCHIYAIMOTO, 2007). A participação de ciclina D1 na patogênese de outras neoplasias já foi consistentemente relatada, como em câncer de cabeça e pescoço,

câncer de pulmão, mama e melanoma, e seu papel como alvo terapêutico tem sido considerado (revisado em MUSGROVE, 2011). É importante salientar que, de acordo com os achados de Bunz (2008), a transdução de sinais da via MAPK, através de RAF-BRAF, ativa ciclina D1. Estes achados, juntamente com a observação da superexpressão imuno-histoquímica de ciclina D1 em ameloblastoma (KUMAR, 2011; CECIM, 2013; SHTUTMAN, 1999) levantam a hipótese de que a mutação ativadora *BRAF V600E* tem como consequência a ativação da transcrição de ciclina D1 em ameloblastoma, o que poderia levar ao aumento da proliferação desta lesão.

Em outros estudos imunohistoquímicos com ameloblastoma multicístico, foi descrita marcação e correlação positiva da ciclina D1 com  $\beta$ -catenina, uma proteína já relatada como reguladora positiva de ciclina D1 (CECIM, 2013; SHTUTMAN, 1999). A translocação do receptor EGFR para o núcleo tem sido relacionada com a ativação direta da transcrição de ciclina D1 (TAO, 2005). Em um estudo recente, superexpressão de EGFR nuclear e sua colocalização com ciclina D1 nas células neoplásicas de ameloblastoma sugerem um novo mecanismo para a ativação da ciclina neste tumor (PEREIRA, 2015). A transcrição de *CCND1* também pode ser alvo da cascata de sinalização Sonic Hedgehog (SHH) (DUMAN-SCHEEL, 2002). A super expressão dos componentes da via HH: *SMO*, *PTCH1*, *GLI1*, juntamente com *CCND1* em ameloblastoma (GURGEL, 2014) e os achados de mutação de *SMO* neste tumor (SWEENEY, 2014) levantam a possibilidade da participação também da via SHH na ativação da ciclina D1 e na patogênese dos ameloblastomas.

Outro gene com expressão maior em ameloblastoma multicístico, comparado com unicístico, é o *SKP2*, membro da família de proteínas F-box, com funções também de progressão do ciclo celular (WEI, 2004). Esse gene possui a função de ubiquitar e degradar a p27(KIP1), uma inibidora do ciclo celular, e já foi implicado como oncogene de algumas neoplasias (CARRANO, 1999; LATRES, 2001; WANG, 2014). Em um estudo realizado em 70 amostras de carcinoma de células escamosas oral relatou-se maior expressão de *SKP2* no tumor em relação ao tecido normal associada com maior agressividade tumoral e capacidade invasiva (YAMADA, 2016). Em outro estudo conduzido por Gstaiger e colaboradores (2001), foi sugerida a participação do gene *SKP2* em lesões potencialmente malignas, ao encontrar alta expressão da proteína desse gene em displasias epiteliais e carcinoma, quando

comparados ao controle normal e, além disso, altos níveis de SKP2 foram encontrados à medida que o grau de displasia se agravava. A proteína SKP2 também está relacionada à via MAPK, de acordo com o estudo de Villanueva e colaboradores (2007), em que a proteína ERK presente nesta via, quando inibida, induz o acúmulo de p27(KIP1) através da mediação por expressão do gene *SKP2*. O ameloblastoma também foi alvo de estudo da p27(KIP1), em um estudo conduzido por Zhong e colaboradores (2005), em que a taxa de marcação positiva dessa proteína no núcleo das células, foi de 16,7% no total de 54 amostras de ameloblastoma. Esses achados sugerem a possível colaboração do gene *SKP2* à malignidade do fenótipo tumoral.

Outros genes que estão mais expressos em multicístico e estão envolvidos com a progressão do ciclo celular, são a ciclina T1 (*CCNT1*) e a *CDK5RAP1*, que, ao interagir respectivamente com a CDK9 e CDK5, colaboram com o aumento da proliferação celular (WANG, 2015). Correlação entre ciclina T1 com malignidade e crescimento tumoral foram feitas em alguns estudos. No estudo de Moiola e colaboradores (2010) foi demonstrada relação entre superexpressão de ciclina T1 e CDK9 em linhagens celulares de tumores de cabeça e pescoço, com a alta proliferação celular desses tumores. Quanto a desregulação de *CDK5RAP1* em neoplasias, poucos achados são encontrados na literatura. No estudo de Wang e colegas (2015) foi mostrada que a deficiência dessa proteína causa parada do ciclo celular, sugerindo a possibilidade de utilizá-la como alvo terapêutico.

O presente estudo mostra pela primeira vez aumento da expressão em *SKP2*, *CCNT1* e *CDK5RAP1* em ameloblastoma. A função oncogênica destes genes em outras neoplasias sugerem que a super expressão em ameloblastoma multicístico pode estar relacionado com a sua maior agressividade. Estudos *in vitro* abordando o impacto da expressão de *SKP2*, *CCNT1* e *CDK5RAP1* no fenótipo de células de ameloblastomas podem relevar a real importância dessas alterações no processo de tumorigênese desta neoplasia.

Nas amostras estudadas, observou-se a expressão elevada de MCM5 em ameloblastoma multicístico. O complexo MCM é formado pelas proteínas MCM 2 a 7 e MCM 10 e é responsável pela iniciação e extensão da fita de DNA ao interagir com as forquilhas de replicação (LEE & HURWITZ, 2001). A superexpressão dos genes que codificam as proteínas deste complexo já foi relatada em várias neoplasias, tais

como meningioma (GIAGINIS, 2008), câncer de próstata (REN, 2005), osteossarcoma (KUIJER, 2012), dentre outros. E mais especificamente, MCM5, foi considerado marcador de prognóstico em câncer de ovário e de próstata (GAKIOPOULOU, 2007). De acordo com Das e colaboradores (2014), não se sabe se a desregulação de MCM é apenas fruto de desregulação de outras moléculas relacionadas, sendo apenas um marcador proliferativo, ou se a alteração de expressão causa diretamente instabilidade cromossômica ao interferir na replicação do DNA. Em um estudo de imunoexpressão de MCM2 e MCM3, realizado em variantes de ameloblastoma, incluindo multicística e unicística, foi relatada maior expressão das proteínas codificadas por esses genes na variante multicística (CARREÓN-BURCIAGA, 2015). O estudo também sugere que essas proteínas possam ser utilizadas como marcadores de tumores com comportamento mais agressivo. No nosso estudo, foi reportada maior expressão de MCM5 na variante multicística comparada à unicística. Outros estudos são necessários para que seja possível discutir sobre as causas e consequências dessa alteração, porém, por ser uma proteína de funções similares às relatadas anteriormente, é possível sugerir um mesmo papel de marcador de agressividade tumoral.

O ciclo celular também é constituído de moléculas responsáveis por checar a integridade da célula e certificar se os processos estão acontecendo de forma ordenada. Por exemplo, o *TP53* é um conhecido gene supressor de tumor cuja alteração está relacionada a 50% das neoplasias (VOGELSTEIN, 2010) (<http://p53.free.fr/>). Alteração do *TP53* incluem mutação no próprio gene, superexpressão de vias relacionadas ou alteração em moléculas reguladoras, como MDM2, que se liga à P53 e a regula negativamente. Conhecido como “guardião do genoma”, o gene *TP53* codifica a proteína P53, que é normalmente ativada em reação a algum tipo de dano ao DNA, redução de O<sub>2</sub> ou ativação de oncogenes. Com isso, P53 produz respostas biológicas como parada do ciclo celular para que o dano seja reparado, ou indução à apoptose ou senescência, (YEE, 2005; RILEY, 2008; GREEN & KROEMER, 2009).

No presente estudo, a expressão relativa de p53 era maior na variante multicística comparada à unicística. Este achado corrobora com os demais autores que associaram maior expressão de P53 com a maior agressividade dos tumores

odontogênicos. A expressão mais elevada de P53 também pode ser interpretada levando em consideração os múltiplos contextos onde P53 é ativada, sugerindo que sua super ativação em ameloblastoma multicístico é reflexo de maior frequência de dano ao DNA, redução de O2 ou maior ativação de oncogenes.

Vários estudos realizados em ameloblastoma ou outros tumores odontogênicos relataram alterações em P53. Em um estudo de imunoexpressão foi mostrada a correlação entre ki-67, um marcador de proliferação, e P53 em amostras de ameloblastoma comparado ao tumor odontogênico queratocístico. Como as amostras de ameloblastoma apresentaram maior marcação de P53, os autores sugeriram que a tendência de expressão dessa proteína cresce à medida que o tumor se apresenta com maior grau de agressividade (GADBAILA & CHAUDHARY, 2011). Essa mesma sugestão foi feita em outro estudo imunohistoquímico, dessa vez fazendo um paralelo entre ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatóide (TOA). Barboza e colaboradores (2005) interpretaram que a P53 pode ter um papel na maior agressividade do ameloblastoma, já que apresentou maior marcação de P53 comparado ao TOA. Por último, um estudo testou a relação da P53 com MDM2 e P14, outra proteína que participa da regulação do ciclo celular, em diversos subtipos histológicos de ameloblastoma e em germes dentais. Foi revelado maior expressão de P53, MDM2 e p14 em ameloblastoma do que em germes dentais, sugerindo a participação desses reguladores na tumorigênese de ameloblastoma (KUMAMOTO, 2004).

Existem outros genes encarregados de verificar a integridade do DNA e responder a danos, como *CCNG2*, que é um gene que codifica a ciclina G2 e está relacionada à inibição do crescimento celular quando há necessidade de responder a algum dano ao DNA. Foi demonstrada, em uma linhagem celular do carcinoma colorretal, que a superexpressão de ciclina G2 induz parada do ciclo celular de maneira dependente de P53 e também é responsável pela ativação de *CHEK2* por fosforilação (ZIMMERMANN, 2012). É interessante notar que encontramos maior expressão de *TP53*, *CCNG2* e *CHEK2* em ameloblastoma multicístico, o que levanta a hipótese de que a expressão de *CCNG2* poderia estar diretamente relacionada à expressão dos demais genes citados em ameloblastoma. Experimentos *in vitro* poderiam ajudar a testar esta hipótese. Outro gene também relacionado com *CHEK2*

é o gene *HUS1* que codifica uma proteína que leva à parada do ciclo celular em resposta ao dano ao DNA. Essa proteína cria um complexo com Rad1 e Rad9 e, em conjunto com ATR, também induz ativação de CHEK2, causando parada celular ou apoptose.

#### FALAR DE MAD2L2

A proteína codificada por *MAD2L2* também é responsável pela integridade do genoma por ser encarregado do checkpoint do fuso mitótico e também por responder a danos ao DNA (BOERSMA, 2015). Não há estudos anteriores que correlacionam esses genes com a patogênese de tumores odontogênicos, incluso ameloblastoma. No presente estudo, a proteína *MAD2L2* se encontra mais expressa em multicístico e a partir de nossos resultados é possível propor uma associação entre a alta expressão de alguns genes de reparo do DNA com a resposta exacerbada da célula ao tentar regular o seu ciclo celular. Estes podem ser eventos secundários resultantes da desregulação da atividade do ciclo celular, reflexo do aumento da proliferação nesta lesão.

#### **6.2 - Genes do ciclo celular menos expressos em ameloblastoma multicístico**

Quatro genes exibiram menor expressão em ameloblastoma multicístico, quando comparado ao grupo de ameloblastoma unicístico. São eles: *BCCIP*, *CCNC*, *CDK1* e *MAD2L1*.

A proteína codificada por *BCCIP* atua em interação com *BRCA2* e *CDKN1A* para regular a progressão do ciclo celular e é também um dos responsáveis pelo reparo de quebra de fita dupla do DNA.

O gene *CCNC* codifica a ciclina C, que age em conjunto com a *CDK8* para promover a progressão do ciclo celular. Ela é considerada reguladora da saída da célula de G0, pois apresenta alta expressão de mRNA nessa fase. Ciclina C age em conjunto com RB, apesar de não estimular a entrada da célula na fase S (LIU, 1998; RICKERT, 1996). A quinase *CDK1* atua no sentido de promover as transições necessárias à progressão do ciclo celular, ao estimular a fase M e as fases de transição G1/S, G2/M. Esse gene se encontra super expresso em algumas neoplasias, como em câncer de próstata, e sua expressão foi relacionada à maior proliferação e sobrevivência celular ao interagir com outras proteínas, como FOXO 1

(LIU, 2008). Tanto o gene *CCNC*, quanto *CDK1* estão mais expressos em unicístico e, por estarem relacionados diretamente à proliferação, sugere-se um possível papel na biologia específica do ameloblastoma unicístico.

O gene *MAD2L1* tem função conhecida no checkpoint do fuso mitótico ao garantir que os cromossomos estejam alinhados de forma adequada (PERCY, 2000). Assim como os genes citados acima, *MAD2L1* também apresenta menor expressão na variante multicística e pode estar relacionado com a maior agressividade desta variante. Estes achados devem ser fortalecidos utilizando-se um número maior de amostras

### **6.3 - Genes de reparo do DNA**

No ensaio de genes de reparo do DNA, dois genes apresentaram expressão diferenciada. *CHEK2* e *NTHL1* estão mais expressos em ameloblastoma multicístico, quando comparado com o grupo unicístico.

A proteína CHEK2, codificada pelo gene de mesmo nome, está envolvida na patogênese de diversas neoplasias. É ativada, principalmente, por ATM em resposta à quebra de fita dupla de DNA e é considerada inativa na ausência de danos. Quando a CHEK2 é ativada, é capaz de parar o ciclo em G1 e também prevenir a entrada da célula na mitose, caso ela não esteja em equilíbrio (NEVANLINNA & BARTEK, 2006; revisado em BARTEK & LUKAS, 2003). Em um estudo funcional para verificar o papel de CHEK2, apontou-se a inibição da proliferação e a indução da parada do ciclo celular, da apoptose e da senescência quando CHEK2 estava expressa (CHEN, 2005). Já NTHL1 está envolvido no reparo por excisão de bases (BER) e tem função de reparar sítios apúricos ou apirimídicos. Sua expressão alterada está envolvida em alguns tipos de câncer, como câncer de mama (SUMMA, 2014) e câncer colorretal (BRODERICK, 2006).

A proliferação celular é controlada por genes conhecidos como proto-oncogenes e, se ocorre alguma mutação, esses genes adquirem característica de oncogenes e são responsáveis por induzir proliferação descontrolada. Essa proliferação descontrolada pode gerar o chamado estresse replicativo, responsável pela formação e acúmulo de danos ao DNA. Diferentes tipos de danos no DNA ativam vias de

respostas responsáveis pela contenção das alterações e por barrar uma possível tumorigênese. As vias de reparo do DNA representam então um mecanismo anti-tumorigênico. Apesar do ameloblastoma multicístico apresentar graus de agressividade, ausência de cápsula e poder infiltrar na cortical óssea, tanto ele quanto a variante unicística são benignos e virtualmente não tem a capacidade de gerar metástases, características de tumores malignos. Tal comportamento pode ser explicado pela ativação dos genes de reparo do DNA, já que ativação das vias relacionadas podem agir como barreira anti-tumorigênica. Por outro lado, ativação das vias de reparo do DNA tem sido relacionado com a progressão de lesões pré-neoplásicas. Um estudo demonstrou a presença da via CHEK2-ATM em estágios iniciais de neoplasias, ao comparar lesões de câncer de bexiga em diferentes estágios, de acordo com o sistema TNM, considerando lesões primárias (Ta), lesões invasivas primárias (T1) e lesões em estágios mais avançados (T2-T4). A marcação imunohistoquímica, ao contrário dos tecidos normais, foi positiva para o anticorpo CHEK2 nas lesões Ta, de forma semelhante em T1, mas em T2-T4, apesar de haver marcação, foi em níveis moderados. Esses achados sugerem uma hipótese de que a via CHEK2-ATM está mais ativada em lesões iniciais de neoplasias (BARTKOVA, 2005).

O estudo de Gorgoulis (2005), propôs que o desenvolvimento das neoplasias, desde o início do desenvolvimento, poderia ter relação com estresse replicativo, que leva à instabilidade genômica por possivelmente causar quebra de fita dupla. O estudo foi realizado monitorando várias proteínas de reparo do DNA, como a histona H2AX, 53BP1, P53 e CHEK2, em neoplasias como carcinoma de pulmão de células não pequenas (NSCLC) e melanoma. Nesse estudo foram demonstradas marcações dessas proteínas fosforiladas, que são responsivas ao dano, como CHEK2, em tecidos displásicos relacionados às neoplasias. Esses achados sugerem que os checkpoints responsáveis por responder aos danos ao DNA são ativados já nas fases iniciais de neoplasias. Para explicar a associação entre esses achados e o estresse replicativo, foi testada a hipótese de haver desequilíbrio alélico nessas lesões pré-neoplásicas utilizando tecido normal, hiperplásico e neoplásico de pulmão. Os resultados foram plausíveis com a hipótese da presença do estresse replicativo já presente em lesões iniciais.

Os resultados deste estudo sugerem que a variante multicística possui transcrição mais elevada do que unicística, principalmente dos genes relacionados à progressão do ciclo celular e conseqüentemente com o estímulo à proliferação. Apenas dois genes de checkpoint e reparo estão diferencialmente expressos nas variantes, sugerindo que as alterações no processo de reparo dos danos possuem papel menor na biologia do tumor. Especula-se também uma alta atividade de resposta a possíveis alterações e danos ao DNA presentes com mais frequência em ameloblastoma multicístico do que em unicístico.

Genes relacionados ao controle do ciclo celular e ao reparo do DNA são diferencialmente expressos nas variantes de ameloblastoma e as suas vias relacionadas podem ser relevantes para a biologia dos ameloblastomas. Estudo com um número maior de amostras é necessário para confirmar os nossos achados e para melhor compreender a real importância e o peso de cada gene nos mecanismos de tumorigênese. A relevância já comprovada em outras neoplasias pode servir de indicador na escolha dos genes alterados alvos para os futuros estudos.

**CONCLUSÃO**

## **7 - CONCLUSÃO**

Genes relacionados ao controle do ciclo celular e ao reparo do DNA são diferencialmente expressos nas variantes de ameloblastoma. Estes genes podem estar relacionados à diferença no comportamento biológico do ameloblastoma multicístico e unicístico. A investigação destes genes em um maior número de amostras e estudos funcionais podem ajudar a elucidar os mecanismos da patogênese e evolução dos ameloblastomas.

***REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS***

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARTKOVA, JIRINA et al. DNA damage response as a candidate anti-cancer barrier in early human tumorigenesis. *Nature*, [s.l.], v. 434, n. 7035, p.864-870, 14 abr. 2005. Nature Publishing Group.

BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SIDRANSKY D. WHO classification of tumours. *Pathology & Genetics. In head and neck tumours*. Lyon: IARC 2005; 283-327

GARNIER M, DELAMARE V. *Dicionário de termos técnicos de medicina*. 2ª ed., 1984.

PACIORNICK P. *Dicionário médico*. 2ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 1975.

KATCHBURIAN e ARANA, V. *Histologia e embriologia oral*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Cap. 6, Odontogênese; p. 147-75.

MELROSE RJ (1999). Benign odontogenic tumors. *Semin Diagn Pathol* 16:271-287

HERTOG D, BLOEMENA E, AARTMAN I, van der Waal I. Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. *Med Oral*. 2012;:e76-e82.

AHMED, MOHAMED M.; EL-AZAB, SAMIA M.. Evaluation of Cell Cycle-Related Indicators in Plexiform Ameloblastoma. *Journal Of The Egyptian Nat. Cancer Inst, Cairo*, v. 20, n. 3, p.294-301, set. 2008.

BACHMANN, ANGELA M.; LINFESTY, RONALD L.. Ameloblastoma, Solid/Multicystic Type. *Head And Neck Pathol*, [s.l.], v. 3, n. 4, p.307-309, 25 out. 2009. Springer Science + Business Media.

GARDNER D. Some current concepts on the pathology of ameloblastomas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*. 1996;82(6):660-669.

KURPPA K, CATÓN J, MORGAN P, RISTIMÄKI A, RUHIN B, KELLOKOSKI J et al. High frequency of BRAFV600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol.* 2014;232(5):492-498.

BROWN, N. A. et al. Activating FGFR2-RAS-BRAF Mutations in Ameloblastoma. *Clinical Cancer Research*, [s.l.], v. 20, n. 21, p.5517-5526, 3 jul. 2014. American Association for Cancer Research (AACR).

BRUNNER, P. et al. BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. *Oral Oncology*, [s.l.], v. 51, n. 10, p.77-78, out. 2015. Elsevier BV.

DINIZ M, GOMES C, GUIMARÃES B, CASTRO W, LACERDA J, CARDOSO S et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumor Biol.* 2015;36(7):5649-5653.

SWEENEY, ROBERT T et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nature Genetics*, [s.l.], v. 46, n. 7, p.722-725, 25 maio 2014. Nature Publishing Group.

DHILLON, A S et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene*, [s.l.], v. 26, n. 22, p.3279-3290, 14 maio 2007. Nature Publishing Group.

BOLOGNA-MOLINA R, MOSQUEDA-Taylor A, LOPEZ-CORELLA E, ALMEIDA O, CARRASCO-DAZA D, GARCIA-VAZQUEZ F et al. Syndecan-1 (CD138) and Ki-67 expression in different subtypes of ameloblastomas. *Oral Oncology.* 2008;44(8):805-811

IEZZI G, PIATTELLI A, RUBINI C, ARTESE L, GOTERI G, FIORONI M et al. CD10 expression in stromal cells of ameloblastoma variants. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology.* 2008;105(2):206-209.

SALEHINEJAD J, ZARE-MAHMOODABADI R, SAGHAFI S, JAFARIAN A, GHAZI N, RAJAEI A et al. Immunohistochemical detection of p53 and PCNA in ameloblastoma

and adenomatoid odontogenic tumor. *J Oral Sci.* 2011;53(2):213-217.

KUMAMOTO H, OHKI K, OOYA K. Expression of Sonic hedgehog (SHH) signaling molecules in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2004;33(3):185-190.

PERDIGÃO P, GOMEZ R, PIMENTA F, De MaRCO L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncology.* 2004;40(8):841-846.

GOMES, Carolina Cavalieri et al. Current concepts of ameloblastoma pathogenesis. *Journal Of Oral Pathology & Medicine*, [s.l.], v. 39, n. 8, p.585-591, 2 jul. 2010. Wiley-Blackwell.

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 613.

CORDON-CARDO, C. Mutations of cell cycle regulators. Biological and clinical implications for human neoplasia. *The American Journal Of Pathology*, New York, v. 147, n. 3, p.545-560, Sep. 1995.

BUNZ F. Principles of cancer genetics. [Dordrecht]: Springer; 2008.P. 218.

HARTWELL LH, KASTAN MB. Cell cycle control and cancer. *Science.* 1994 Dec 16;266(5192):1821-8.

ASGHAR, UZMA et al. The history and future of targeting cyclin-dependent kinases in cancer therapy. *Nature Reviews Drug Discovery*, [s.l.], v. 14, n. 2, p.130-146, 30 jan. 2015. Nature Publishing Group.

FOSTER D, YELLEN P, XU L, Saqcena M. Regulation of G1 Cell Cycle Progression: Distinguishing the Restriction Point from a Nutrient-Sensing Cell Growth Checkpoint(s). *Genes & Cancer.* 2010;1(11):1124-1131.

BUNZ F. Principles of cancer genetics. [Dordrecht]: Springer; 2008; p. 218

BUNZ F. Principles of cancer genetics. [Dordrecht]: Springer; 2008; p. 220

MASSAGUÉ J. G1 cell-cycle control and cancer. *Nature*. 2004;432(7015):298-306.

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 197.

ALBERTS, Bruce. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2004; p. 259-260.

LEE J HURWITZ J. Processive DNA helicase activity of the minichromosome maintenance proteins 4, 6, and 7 complex requires forked DNA structures. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2001;98(1):54-59.

BLOW JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005; 6: 476–86.

VARGAS P, CHENG Y, BARRETT A, CRAIG G, SPEIGHT P. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. *Journal of Oral Pathology & Medicine*. 2008;37(5):309-318.

ALISON M. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. *Gut*. 2002;50(3):290-291.

ALBERTS, Bruce. *Biologia Molecular da Célula*. Porto Alegre: Artmed, 2004; p. 238-246.

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 201-204.

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 615.

CAMPBELL A, ANDERSON W, JONES E. Annual review of genetics. Palo Alto, Calif.: Annual Reviews; 2002. 36:617–56 (arrumar referência replication checkpoints)

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 637-640.

MANNINI L, MUSIO A. The dark side of cohesin: The carcinogenic point of view. Mutation Research/Reviews in Mutation Research. 2011;728(3):81-87.

O'CONNOR, C. (2008) Cell Division: Stages of Mitosis. *Nature Education* 1(1):188

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 637-655.

UHLMANN F. Separase regulation during mitosis. Biochem Soc Symp. 2003;70:243-251

ALBERTS B. Fundamentos da biologia celular. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 637-655.

WOLFEL T, HAUER M, SCHNEIDER J, SERRANO M, WOLFEL C, KLEHMANN-HIEB E et al. A p16INK4a-insensitive CDK4 mutant targeted by cytolytic T lymphocytes in a human melanoma. Science. 1995;269(5228):1281-1284.

HALL M, PETERS G (1996) Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and CDK inhibitors in human câncer *Adv. Cancer Res.* 68, 67

BUESO-RAMOS C, MANSOURI T, HAIDAR M, HUH Y, KEATING M, ALBITAR M. Multiple Patterns of MDM-2 Deregulation in Human Leukemias: Implications in Leukemogenesis and Prognosis. *Leukemia & Lymphoma.* 1995;17(1-2):13-18.

KUMAR H, VANDANA R, KUMAR G. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.* 2011;15(3):283.

PEREIRA N, do CARMO A, DINIZ M, GOMEZ R, GOMES D, GOMES C. Nuclear localization of epidermal growth factor receptor (EGFR) in ameloblastomas. *Oncotarget*. 2015;6(12):9679-9685.

SANDRA F, MITSUYASU T, NAKAMURA N, SHIRATSUCHI Y, OHISHI M. Immunohistochemical evaluation of PCNA and Ki-67 in ameloblastoma. *Oral Oncology*. 2001;37(2):193-198.

ALBERTS B. *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 208.

BERNSTEIN C, R. A, Nfonam V, Bernstei H. DNA Damage, DNA Repair and Cancer. *New Research Directions in DNA Repair*. 2013;:413-465.

ALBERTS B. *Fundamentos da biologia celular*. Porto Alegre (RS): ARTMED; 2006; p. 208-214.

WU L, CHIOU C, CHANG P, WU J. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics. *Clinica Chimica Acta*. 2004;339(1-2):1-9.

KRYSTON T, GEORGIEV A, PISSIS P, GEORGAKILAS A. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*. 2011;711(1-2):193-201.

ALBERTS B, JOHNSON A, LEWIS J, *et al*. *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; 2002. DNA Repair. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26879/>.

CANNAN W, PEDERSON D. Mechanisms and Consequences of Double-Strand DNA Break Formation in Chromatin. *J Cell Physiol*. 2015;231(1):3-14.

OSBORNE M, URBANO K. *Advances in genetics research*. Hauppauge, N.Y.: Nova Science; 2010. (colocar o resto das informações)

HILLS S, DIFFLEY J. DNA Replication and Oncogene-Induced Replicative Stress. *Current Biology*. 2014;24(13):1563.

MAZOUZI A, VELIMEZI G, LOIZOU J. DNA replication stress: Causes, resolution and disease. *Experimental Cell Research*. 2014;329(1):85-93.

CHIAL, H. (2008) Proto-oncogenes to oncogenes to cancer. *Nature Education* 1(1):33

GAILLARD H, GARCÍA-MUSE T, AGUILERA A. Replication stress and cancer. *Nature Reviews Cancer*. 2015;15(5):276-289.

GORGOULIS V, VASSILIOU L, KARAKAIDOS P, ZACHARATOS P, KOTSINAS A, LILOGLOU T et al. Activation of the DNA damage checkpoint and genomic instability in human precancerous lesions. *Nature*. 2005; 434(7035):907-913.

KUNKEL T, ERIE D. DNA MISMATCH REPAIR\*. *Annu Rev Biochem*. 2005; 74(1):681-710.

MÉCHALI M. Eukaryotic DNA replication origins: many choices for appropriate answers. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2010;11(10):728-738.

BERNSTEIN C. DNA repair/pro-apoptotic dual-role proteins in five major DNA repair pathways: fail-safe protection against carcinogenesis. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2002; 511(2):145-178.

KIM YM, WILSON III D. Overview of Base Excision Repair Biochemistry. *Current Molecular Pharmacology*. 2012; 5(1):3-13.

RENKAWITZ J, LADEMANN C, JENTSCH S. Mechanisms and principles of homology search during recombination. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2014;15(6):369-383.

VOET D, VOET J, PRATT C. Fundamentos de bioquímica. Grupo A - Artmed; 2000.

DAMINENI S, RAO VR, KUMAR S, RAVURI RR, KAGITHA S, DUNNA NR, DIGUMARTHI R, SATTI V. Germline mutations of TP53 gene in breast cancer. *Tumour Biol.* 2014 Sep;35(9):9219-27. Epub 2014 Jun 15.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P.. TP53 Mutations in Human Cancers: Origins, Consequences, and Clinical Use. *Cold Spring Harbor Perspectives In Biology*, [s.l.], v. 2, n. 1, p.1008-1008, 11 nov. 2010. Cold Spring Harbor Laboratory Press.

TOSS A; TOMASELLO C, RAZZABONI E, CONTU G, GRANDI G, CAGNACCI A, SCHILDER RJ, Cortesi L. Hereditary ovarian cancer: not only BRCA 1 and 2 genes. *Biomed Res Int.* 2015; 2015: 341723. Epub 2015 May 17. Review

MASICA DL, LI S, DOUVILLE C, MANOLA J, FERRIS RL, BurtneSS B, FORASTIERE AA, KOCH WM, CHUNG CH, KARCHIN R. Predicting survival in head and neck squamous cell carcinoma from TP53 mutation. *Hum Genet.* 2015 May;134(5):497-507. Epub 2014 Aug 10

NA, El-sissy. Immunohistochemical detection of p53 protein in ameloblastoma types. *East Mediterr Health J, Mansoura, Egypt*, v. 5, n. 3, p.478-489, May 1999.

MACHERET, MORGANE; HALAZONETIS, THANOS D.. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, [s.l.], v. 10, n. 1, p.425-448, 24 jan. 2015. Annual Reviews.

HOEIJMAKERS, Jan H. J. Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. *Nature*, [s.l.], v. 411, n. 6835, p.366-374, 17 maio 2001. Nature Publishing Group).

HALAZONETIS, T. D.; GORGOULIS, V. G.; BARTEK, J. An Oncogene-Induced DNA Damage Model for Cancer Development. *Science*, [s.l.], v. 319, n. 5868, p.1352-1355, 7 mar. 2008. American Association for the Advancement of Science (AAAS).

BILIRAN, H. Overexpression of Cyclin D1 Promotes Tumor Cell Growth and Confers Resistance to Cisplatin-Mediated Apoptosis in an Elastase-myc Transgene-

Expressing Pancreatic Tumor Cell Line. *Clinical Cancer Research*, v. 11, n. 16, p. 6075-6086, 2005.

TASHIRO, E.; TSUCHIYA, A.; IMOTO, M. Functions of cyclin D1 as an oncogene and regulation of cyclin D1 expression. *Cancer Science*, v. 98, n. 5, p. 629-635, 2007.

MUSGROVE, E. et al. Cyclin D as a therapeutic target in cancer. *Nature Reviews Cancer*, v. 11, n. 8, p. 558-572, 2011.

KUMAR, H.; VANDANA, R.; KUMAR, G. Immunohistochemical expression of cyclin D1 in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Journal of Oral and Maxillofacial Pathology*, v. 15, n. 3, p. 283, 2011.

CECIM, R. et al. Expression of molecules related to AKT pathway as putative regulators of ameloblastoma local invasiveness. *J Oral Pathol Med*, v. 43, n. 2, p. 143-147, 2013.

SHTUTMAN, M. et al. The cyclin D1 gene is a target of the  $\beta$ -catenin/LEF-1 pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 96, n. 10, p. 5522-5527, 1999.

TAO, Yongguang et al. Nuclear accumulation of epidermal growth factor receptor and acceleration of G1/S stage by Epstein–Barr-encoded oncoprotein latent membrane protein 1. *Experimental Cell Research*, [s.l.], v. 303, n. 2, p.240-251, fev. 2005. Elsevier BV.

DUMAN-SCHEEL, Molly et al. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature*,[s.l.], v. 417, n. 6886, p.299-304, 16 maio 2002. Nature Publishing Group.

GURGEL, C. et al. Transcriptional profiles of SHH pathway genes in keratocystic odontogenic tumor and ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*, v. 43, n. 8, p. 619-626, 2014.

WEI, W. et al. Degradation of the SCF component Skp2 in cell-cycle phase G1 by the anaphase-promoting complex. *Nature*, v. 428, n. 6979, p. 194-198, 2004.

CARRANO AC, EYTAN E, HERSHKO A, PAGANO M.. SKP2 is required for ubiquitin-mediated degradation of the CDK inhibitor p27. *Nat. Cell. Biol.*, New York, v. 1, n. 4, p.193-199, Aug. 1999.

LATRES, E. et al. Role of the F-box protein Skp2 in lymphomagenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 98, n. 5, p. 2515-2520, 2001.

WANG, J. et al. E3-ligase Skp2 predicts poor prognosis and maintains cancer stem cell pool in nasopharyngeal carcinoma. *Oncotarget*, v. 5, n. 14, p. 5591-5601, 2014.

YAMADA, S. et al. Skp2 Regulates the Expression of MMP-2 and MMP-9, and Enhances the Invasion Potential of Oral Squamous Cell Carcinoma. *Pathology & Oncology Research*, v. 22, n. 3, p. 625-632, 2016.

VILLANUEVA, J. et al. ERK Activity and G1 Phase Progression: Identifying Dispensable Versus Essential Activities and Primary Versus Secondary Targets. *Molecular Biology Of The Cell*, [s.l.], v. 18, n. 4, p.1457-1463, 21 fev. 2007. American Society for Cell Biology (ASCB).

ZHONG, M; LIU, J.; GONG, YB. [Expression of p21WAF1, p27KIP1 and cyclin E in ameloblastoma]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, Shenyang, v. 4, n. 40, p.306-309, jul. 2005

GSTAIGER, M. et al. Skp2 is oncogenic and overexpressed in human cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, [s.l.], v. 98, n. 9, p.5043-5048, 17 abr. 2001. *Proceedings of the National Academy of Sciences*.

WANG H, WEI L, LI C, ZHOU J, LI Z. CDK5RAP1 deficiency induces cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cell line by the ROS/JNK signaling pathway. *Oncology Reports*. 2015;.

MOIOLA C, DE LUCA P, GARDNER K, VAZQUEZ E, DE SIERVI A. Cyclin T1 overexpression induces malignant transformation and tumor growth. *Cell Cycle*. 2010;9(15):3191-3198.

GIAGINIS C, GEORGIADOU M, DIMAKOPOULOU K, TSOUROUFLI G, GATZIDOU E, KOURAKLIS G et al. Clinical Significance of MCM-2 and MCM-5 Expression in Colon Cancer: Association with Clinicopathological Parameters and Tumor Proliferative Capacity. *Dig Dis Sci*. 2008;54(2):282-291.

REN B, YU G, TSENG G, CIEPLY K, GAVEL T, NELSON J et al. MCM7 amplification and overexpression are associated with prostate cancer progression. *Oncogene*. 2005;25(7):1090-1098.

KUIJER M, RYDBECK H, KRESSE S, BUDDINGH E, LID A, ROELOFS H et al. Identification of osteosarcoma driver genes by integrative analysis of copy number and gene expression data. *Genes Chromosom Cancer*. 2012;51(7):696-706.

GAKIOPOULOU H, KORKOLOPOULOU P, LEVIDOU G, THYMARA I, SAETTA A, PIPERI C et al. Minichromosome maintenance proteins 2 and 5 in non-benign epithelial ovarian tumours: relationship with cell cycle regulators and prognostic implications. *Br J Cancer*. 2007;97(8):1124-1134.

DAS M, SINGH S, PRADHAN S, NARAYAN G. MCM Paradox: Abundance of Eukaryotic Replicative Helicases and Genomic Integrity. *Molecular Biology International*. 2014;2014:1-11.

CARREÓN-BURCIAGA R, GONZÁLEZ-GONZÁLEZ R, MOLINA-FRECHERO N, BOLOGNA-MOLINA R. Immunoexpression of Ki-67, MCM2, and MCM3 in Ameloblastoma and Ameloblastic Carcinoma and Their Correlations with Clinical and Histopathological Patterns. *Disease Markers*. 2015;2015:1-8.

VOGELSTEIN, B., SUR, S. & PRIVES, C. (2010) p53: The Most Frequently Altered Gene in Human Cancers. *Nature Education* 3(9):6

p53\_web\_site [Internet]. P53.free.fr. 2016 [cited 28 June 2016]. Available from: <http://p53.free.fr/>

YEE K. Complicating the complexity of p53. *Carcinogenesis*. 2005;26(8):1317-1322.

RILEY T, SONTAG E, CHEN P, LEVINE A. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2008;9(5):402-412.

GREEN D, KROEMER G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53. *Nature*. 2009;458(7242):1127-1130.

GADBAIL A, PATIL R, CHAUDHARY M. Co-expression of Ki-67 and p53 protein in ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor. *Acta Odontologica Scandinavica*. 2011;70(6):529-535.

BARBOZA C, PINTO L, FREITAS R, COSTA A, SOUZA L. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and p53 protein expression in ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor. *Brazilian Dental Journal*. 2005;16(1).

KUMAMOTO H, IZUTSU T, OHKI K, TAKAHASHI N, OOYA K. p53 gene status and expression of p53, MDM2, and p14ARF proteins in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(5):292-299.

PERCY M, MYRIE K, NEELEY C, AZIM J, ETHIER S, PETTY E. Expression and mutational analyses of the humanMAD2L1 gene in breast cancer cells. *Genes Chromosom Cancer*. 2000;29(4):356-362.

MAFALDA, Pinto et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1 and BUBR1 is associated with genomic complexity in clear cell kidney carcinomas. *Cellular Oncology*, [s.l.], v. 30, n. 5, p.389-395, 2008. IOS Press.

BOERSMA, Vera et al. MAD2L2 controls DNA repair at telomeres and DNA breaks by inhibiting 5' end resection. *Nature*,[s.l.], v. 521, n. 7553, p.537-540, 23 mar. 2015. Nature Publishing Group.

RICKERT, P. SeghezZI, W. SHANAHAN, F. CHO, H. LEES, E. Cyclin C/CDK8 is a novel CTD kinase associated with RNA polymerase II. *Oncogene*, Palo Alto, v. 12, n. 12, p.2631-2640, 20 Jun. 1996.

LIU P, KAO T, HUANG H. CDK1 promotes cell proliferation and survival via phosphorylation and inhibition of FOXO1 transcription factor. *Oncogene*. 2008;27(34):4733-4744.

NEVANLINNA, H; BARTEK, J. The CHEK2 gene and inherited breast cancer susceptibility. *Oncogene*, [s.l.], v. 25, n. 43, p.5912-5919, 25 set. 2006. Nature Publishing Group.

BARTEK, Jiri; LUKAS, Jiri. Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell*, [s.l.], v. 3, n. 5, p.421-429, maio 2003. Elsevier BV.

CHEN, C.-r. et al. Dual Induction of Apoptosis and Senescence in Cancer Cells by Chk2 Activation: Checkpoint Activation as a Strategy against Cancer. *Cancer Research*, [s.l.], v. 65, n. 14, p.6017-6021, 15 jul. 2005. American Association for Cancer Research (AACR).

SUMMA, S de et al. Expression of base excision repair key factors and miR17 in familial and sporadic breast cancer. *Cell Death Dis*, [s.l.], v. 5, n. 2, p.1076-1076, 20 fev. 2014. Nature Publishing Group.

BRODERICK, Peter; BAGRATUNI, Tina; VIJAYAKRISHNAN, Jairam. Evaluation of NTHL1, NEIL1, NEIL2, MPG, TDG, UNG and SMUG1 genes in familial colorectal cancer predisposition. *Bmc Cancer*, [s.l.], v. 6, n. 1, p.243-243, 9 Oct. 2006. Springer Nature.