

---

---

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

**TESE DE DOUTORADO**

ESTUDO MOLECULAR DO TUMOR  
ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO E DO CISTO  
ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO

Marina Gonçalves Diniz

2012

---

---



**FACULDADE DE MEDICINA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**

**ESTUDO MOLECULAR DO TUMOR  
ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO E DO CISTO  
ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO**

**Marina Gonçalves Diniz**

*Sob a orientação do Professor*

**Ricardo Santiago Gomez**

Tese apresentada no Programa de  
Pós-Graduação em Medicina Molecular da  
Faculdade de Medicina da Universidade  
Federal de Minas Gerais, como requisito  
parcial para a obtenção do grau de Doutor  
em Medicina Molecular.

Belo Horizonte, Junho de 2012

---

---



FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

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



## DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores: Ricardo Santiago Gomez - orientador UFMG – presidente da banca, Prof. Dawidson Assis Gomes, Prof.<sup>a</sup> Paula Rocha Moreira UFMG, Prof. Guilherme Machado Xavier King's College, Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza PUCMG (membros titulares), aprovou a defesa Tese de Doutorado de **MARINA GONÇALVES DINIZ**. A Tese foi intitulada: **“ESTUDO MOLECULAR DO TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO E DO CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO.”**, estando à mesma apta à obtenção do título de Doutora em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais.

Belo Horizonte, 13 de junho de 2012.

Prof.º Ricardo Santiago Gomez / orientador

Prof. Dawidson Assis Gomes

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

Prof. Guilherme Machado Xavier

Prof. Paulo Eduardo Alencar



**FACULDADE DE MEDICINA  
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO**

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



ATA DA DEFESA DE DOUTORADO DE MARINA GONÇALVES DINIZ, nº de registro 2008701756. No dia **treze de junho de Dois mil e Doze**, reuniu-se na Faculdade de Odontologia da UFMG, a Comissão Examinadora de Tese indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **“ESTUDO MOLECULAR DO TUMOR ODONTOGÊNICO CERATOCÍSTICO E DO CISTO ODONTOGÊNICOS ORTOQUERATINIZADO.”**, requisito final para a obtenção do Grau de Doutora em Medicina Molecular, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Prof.º Ricardo Santiago Gomez, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do trabalho final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof.º Ricardo Santiago Gomez / orientador	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovado</u>
Prof. Dawidson Assis Gomes	Instituição UFMG	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof.ª Paula Rocha Moreira	Instituição: UFMG	Indicação: <u>aprovada</u>
Prof. Guilherme Machado Xavier	Instituição: KING'S COLLEGE	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza	Instituição: PUCMG	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pelo Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.  
Belo Horizonte, 13 de junho de 2012.

Prof.º Ricardo Santiago Gomez / orientador Ricardo Santiago Gomez

Prof. Dawidson Assis Gomes Dawidson A. Gomes

Prof.ª Paula Rocha Moreira Paula Rocha Moreira

Prof. Guilherme Machado Xavier Guilherme Machado Xavier

Prof. Paulo Eduardo Alencar de Souza Paulo EAS

Prof. Luiz Armando Cunha De Marco/ Coordenador [Assinatura]

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

*Aos meus pais,  
Maria Tereza e Otávio*

*“SE VOCÊ PODE SABER, SE É POSSÍVEL SABER, ENTÃO POR QUE SE CONTENTAR EM ACREDITAR?”*

*OSHO*

*“O CONHECIMENTO DO CONHECIMENTO OBRIGA. OBRIGA-NOS A ASSUMIR ATITUDE DE PERMANENTE VIGÍLIA CONTRA A TENTAÇÃO DA CERTEZA, A RECONHECER QUE NOSSAS CERTEZAS NÃO SÃO PROVAS DA VERDADE, COMO SE O MUNDO QUE CADA UM VÊ FOSSE O MUNDO E NÃO UM MUNDO QUE CONSTRUÍMOS JUNTAMENTE COM OS OUTROS”*

*HUMBERTO MATURANA*

# Agradecimentos

Ao meu orientador, Ricardo Gomez, por conduzir este trabalho de forma muito ética e por instigar o pensamento crítico em nós, alunos e colegas, nos auxiliando da melhor forma possível no difícil processo de se formar um verdadeiro doutor.

À professora, colaboradora e amiga, Carolina, e aos demais professores e colegas da UFMG e Unimontes, que colaboraram em todas ou em algumas fases de meu doutoramento; esta colaboração foi de grande estima e imprescindível para a finalização dos trabalhos desta tese.

Aos cientistas e colegas da UAB, Prof. Macdougall, Chanchung Ren e Hope Amm, pela preciosa contribuição em minha pesquisa do doutorado e em minha formação de pesquisadora.

Às formidáveis amizades que conquistei no Laboratório de Patologia Molecular e que agregaram muito valor ao meu dia a dia: Ana Carolina, Clarice, Daniele, Elizete, Fabrício Amaral, Fabrício Tinôco, Gefter, Jeane, João, Kelma, Lucyana, Renata, Thiago, Vanessa e aos alunos de IC Alessandra, Flávia, Leonardo, Lissur, Marcela e Natália.

Aos meus amigos de infância que sempre se fizeram presentes e estão me vendo graduar pela quarta, quinta ou sexta vez; aos meus amigos especiais que me acompanharam desde a faculdade, e aqueles que eu ganhei com a dança e a PB e que são quem me ajudaram no importante processo de esvaziar a mente. Sou também eternamente grata aqueles que eu encontrei, conheci e convivi na cidade de Birmingham, por terem sido de importância ímpar durante o período do doutorado-sanduiche, fazendo-o ser menos penoso e muito mais feliz.

Em especial, agradeço aos meus pais, Maria Tereza e Otávio, aos meus irmãos, Letícia, Lucas e Gustavo, à Kamila e aos bebês, aos meus padrinhos e familiares queridos que, sendo impossível fugir do senso comum, são fonte inesgotável de estímulo, apoio e incentivo, desde sempre.

Agradeço à UFMG e à CAPES, CNPQ e FAPEMIG, pelo apoio financeiro à pesquisa e à minha formação, desde a iniciação científica. E por fim, mas não menos importante, agradeço aos pacientes portadores de tumor odontogênico queratocístico e cisto odontogênico ortoqueranitizado que, gentilmente, aceitaram participar da pesquisa de doutorado e por quem realmente valeu a pena realizar este trabalho.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1</b> – HISTOLOGIA DO TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO	23
<b>FIGURA 2</b> – HISTOLOGIA DO CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO	27
<b>FIGURA 3</b> – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DA VIA HH	31
<b>FIGURA 4</b> – LOCALIZAÇÃO DOS MARCADORES DE MICROSSATÉLITE NA REGIÃO CROMOSSÔMICA ASSOCIADA AO GENE <i>PTCH</i>	37
<b>FIGURA 5</b> – PASSOS E MOLÉCULAS ENVOLVIDAS NO PROCESSAMENTO E FUNÇÃO DOS MI RNAS	42
<b>FIGURA 6</b> – MI RNAS miR-15A E miR-16-1 E O SÍTIO ÚNICO DE COMPLEMENTARIDADE MI RNA::MRNA	44
<b>FIGURA 7</b> – MAPA CONCEITUAL-METODOLÓGICO DO ESTUDO DA PERDA ALÉLICA DO GENE <i>PTCH</i> EM CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO E TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO	50
<b>FIGURA 8</b> – MAPA CONCEITUAL-METODOLÓGICO DO ESTUDO DA EXPRESSÃO DE miR-15A/16-1 E DO GENE <i>BCL2</i> E O IMPACTO DA EXPRESSÃO DESSES MI RNAS NA EXPRESSÃO DO <i>BCL2</i> EM TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO	53
<b>FIGURA 9</b> – MICRODISSECÇÃO MANUAL	109
<b>FIGURA 10</b> – BANDAS RESULTANTES DA DIGESTÃO DO DNA COM ENZIMAS ESPECÍFICAS PARA O SÍTIO DE CLONAGEM	110
<b>FIGURA 11</b> – ELETROFEROGRAMA EXIBINDO AS SEQUÊNCIAS DE miR-15A miR-16-1	111

## ***FIGURAS DO ARTIGO 1***

**FIGURA 1** – PHOTOMICROGRAPH OF A ORTHOKERATINIZED ODONTOGENIC CYST (A) AND KERATOCYSTIC ODONTOGENIC TUMOR (B) INCLUDED IN THE STUDY.

**FIGURA 2** – REPRESENTATIVE ANALYSIS OF LOSS OF HETEROZYGOSITY (LOH) ASSAY IN *PTCH* GENE REGION OF ORTHOKERATINIZED ODONTOGENIC CYST (OOC) 66

## ***FIGURAS DO ARTIGO 2***

**FIGURA 1** – QRT-PCR SHOWING MI RNAs MI R-15A/16-1 CLUSTER EXPRESSION 83

**FIGURA 2** – ANALYSIS OF BCL2 MRNA AND PROTEIN EXPRESSION IN KCOT 84

**FIGURA 3** – BCL-2 EXPRESSION IN KCOT-1 CELLS OF A PRIMARY CULTURE EXPRESSING MI RNA-15A/16-1 WILD TYPE OR MUTANT 85

# LISTA DE TABELAS

## *TABELAS DO ARTIGO 1*

**TABELA 1** – PRIMERS PAIRS USED TO STUDY POLYMORPHIC MICROSATELLITE MARKERS FOR MULTIPLE GENETIC LOCI ENCOMPASSING 9Q22-31 CHROMOSOME REGION 67

**TABELA 2** – CLINICAL DATA AND RESULTS OF LOH IN THE PTCH GENE REGION OF SEVEN ORTHOKERATINIZED ODONTOGENIC CYST (OOC) AND SPORADIC ODONTOGENIC KERATOCYST (OKC). 00

## *TABELA DO ARTIGO 2*

**TABELA 1** – PATIENTS, CLINICAL FEATURES AND METHODS USED IN EACH CASE 82

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**TOQ:** TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO

**COO:** CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO

**PTCH:** GENE PATCHED

**SCBN:** SÍNDROME DO CARCINOMA BASOCELULAR NEVÓIDE

**VIA HH:** VIA HEDGEHOG

**BCL2:** GENE LINFOMA DE CÉLULAS B, 2

**MIRNAS:** MICRORNAs

**MRNA:** RNA MENSAGEIRO

**PA:** PERDA ALÉLICA

**HH:** PROTEÍNA SINALIZADORA HEDGEHOG

**SMO:** PROTEÍNA SMOOTHENED

**GLI:** PROTEÍNA GLIOMA-ASSOCIATED ONCOGENE 1

**HIP:** PROTEÍNA HUNTINGTIN INTERACTING

**SNP:** “SINGLE NUCLEOTIDE POLYMORPHISM”

**QRT-PCR:** “QUANTITATIVE REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION”

**ACTB:** GENE ACTIN, BETA

### ***ABREVIATURAS DO ARTIGO 1***

**OOC:** ODONTOGENIC ORTHOKERATINIZED CYST

**OKC:** ODONTOGENIC KERATOCYST

**LOH:** LOSS OF HETEROZYGOSITY

**SHH PATHWAY:** SONIC HEDGEHOG PATHWAY

**PCR:** POLYMERASE CHAIN REACTION

### ***ABREVIATURAS DO ARTIGO 2***

**KCOT:** KERATOCYST ODONTOGENIC TUMOR

**NBCCS:** NEVOID BASAL CELL CARCINOMA SYNDROME

# SUMÁRIO

<b>I. INTRODUÇÃO</b>	17
<b>II. REVISÃO DA LITERATURA</b>	21
1. O TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO E O CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO	21
2. O GENE <i>PTCH</i>	28
3. PERDA DE HETEROZIGOSIDADE, OU PERDA ALÉLICA	32
4. O GENE <i>BCL2</i>	35
5. MICRORNAs	39
<b>III. OBJETIVOS</b>	47
1. OBJETIVO GERAL	47
2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	47
<b>IV. MATERIAIS E MÉTODOS</b>	49
1. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA	49
2. ESTUDO DA PERDA ALÉLICA DO GENE <i>PTCH</i> EM CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO E TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO	49
2.1 AMOSTRAS	51
2.2 EXTRAÇÃO DO DNA	
2.3 ANÁLISES DE FRAGMENTOS	51
3. INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIR-15A/16-1 E DO GENE <i>BCL2</i> E O IMPACTO DA EXPRESSÃO DESSES MI RNAs NA EXPRESSÃO DO <i>BCL2</i> NO TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO	52
3.1 AMOSTRAS	54
3.2 CULTURA DE CÉLULAS	54
3.3 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (QRT-PCR)	54
3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA	55
3.5 TRANSFERÊNCIA DE WESTERN	56
3.6 ESTUDO <i>IN VITRO</i>	56

<b>V. RESULTADOS</b>	59
1. ARTIGO 1	59
2. ARTIGO 2	72
<b>VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	90
<b>VII. CONCLUSÕES</b>	96
<b>VIII. REFERENCIAS</b>	98
<b>APÊNDICES</b>	108
APÊNDICE A – SEQUÊNCIA DO ENXERTO CONTENDO OS MIRNAS MIR-15A E MIR-16-1	108
APÊNDICE B – EXEMPLO DE MICRODISSECÇÃO MANUAL	109
APÊNDICE C – BANDAS DOS FRAGMENTOS ORIGINADAS A PARTIR DA DIGESTÃO DO VETOR PSR-MIR-15/16 CONTENDO ENXERTO DOS GENES MIRNA 15A/16-1	110
APÊNDICE D – ELETROFEROGRAMA EXIBINDO AS SEQUÊNCIAS DOS MIRNAS MIR-16-1 E MIR-15A CONTIDAS NO PLASMÍDEO PSR-MIR-15/16-WT	111
<b>ANEXO</b>	
ANEXO A – CÓPIA DA CARTA DE APROVAÇÃO DO COEP	113

## RESUMO

O ceratocisto odontogênico, ou tumor odontogênico queratocístico (TOQ), e o cisto odontogênico ortoqueratinizado (COO) são tipos histológico distintos de lesões odontogênicas que, ainda que, apresentam semelhanças histológicas, apresentam também diferenças biológicas e clínicas. Mutações e perda de heterozigossidade do gene supressor de tumor *Patched* (*PTCH*) foram demonstradas no TOQ e também a alta expressão do gene anti-apoptótico *linfoma de células B, 2* (*BCL2*) em comparação ao COO e outros tumores odontogênicos. A proteína PTCH está envolvida na via Hedgehog (via HH), reprimindo a expressão de vários genes-alvo importantes para o desenvolvimento. Alterações no gene *PTCH* levam à ativação constitutiva da via HH, podendo, inclusive, levar à tumorigênese. O gene *BCL2* codifica uma proteína capaz de parar a apoptose, facilitando a sobrevivência da célula independentemente de promover a divisão celular. Dentre os mecanismos que podem levar ao aumento da expressão do *BCL2*, está a perda dos microRNAs (miRNAs) miR15a e miR-16-1. Neste estudo, nós nos propusemos a investigar os aspectos moleculares das lesões TOQ e COO na tentativa de descobrir prováveis mecanismos patogênicos que explicam a semelhança histopatológica de ambos, assim como os mecanismos envolvidos na maior agressividade clínica e na maior tendência de recorrência do TOQ em relação a outras lesões odontogênicas. Para isso, nós avaliamos a perda alélica da região associada ao gene *Patched 1* (*PTCH*), 9q22.3-31, em COO e TOQ e investigamos a expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 e seu impacto na expressão do *BCL2* em TOQ. Os marcadores D9S287, D9S196 e D9S127, localizados no cromossomo 9q, foram investigados para perda alélica (PA). Houve PA de pelo menos um *locus* em 5/7 TOQ e em 4/7 COO. Através da utilização da PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), verificamos menor expressão de miR-15a e/ou miR-16-1 em 24/28 TOQ, comparadamente à folículos pericoronários. Também encontramos maior expressão do mRNA *BCL2* em 19/20 TOQs comparadamente à folículos pericoronários através da qRT-PCR. Além disso, alta imunopositividade do Bcl-2 foi encontrada nas células da camada basal em 16/18 TOQ analisados (mediana: 42,6%). A super-expressão *in vitro* de miR-15a/16-1 em cultura de células primárias de TOQ resultou em uma diminuição da expressão proteica de Bcl-2. Todos os cinco pares de TOQs coletados antes, tumor primário, e após o procedimento de marsupialização, tumor marsupializado, exibiram níveis de expressão aumentados de miR-15a após este procedimento cirúrgico ( $p = 0,04$ ). Nossas descobertas demonstram que,

apesar da existência de diferenças clínicas, morfológicas, imuno-histoquímicas e biológicas entre COO e TOQ, ambos carregam alterações genéticas similares no cromossomo 9q. Nossos resultados também sugerem que as células neoplásicas do TOQ apresentam um perfil anti-apoptótico no qual a baixa expressão de miR-15a/16-1 pode estar relacionado. Além disso, por fim, nós demonstramos aumento de expressão destes miRNAs após marsupialização, indicando um possível papel etiológico e terapêutico destas pequenas moléculas de RNA no TOQ.

**Palavras-chaves:** ceratocisto odontogênico, tumor odontogênico queratocístico, cisto odontogênico ortqueratinizado, *PTCH*, *BCL2*, microRNAs, miR-15a/16-1

## ABSTRACT

The odontogenic keratocyst, or odontogenic keratocyst tumor (TOQ), and the odontogenic cyst orthokeratinized (COO) are distinct histologic types of odontogenic cyst presenting histological similarities, however, biological and clinical differences. Mutation and loss of heterozygosity in the tumor suppressor gene *Patched 1 (PTCH)* have been demonstrated in TOQ plus high expression of the anti-apoptotic gene *B-cell CLL/lymphoma 2 (BCL2)* compared to the COO and other odontogenic cysts. The PTCH protein is involved in the Hedgehog pathway (via HH) by suppressing the expression of several target genes important for development. The gene BCL2 encodes a protein capable of stopping apoptosis, facilitating survival of the cell independent of promoting cell division. Among the mechanisms that can lead to increased expression of BCL2 is the loss of microRNAs (miRNAs) miR15a/16-1. In this study we set out to investigate the molecular aspects of TOQ and COO in an attempt to discover probable pathogenic mechanisms that explain the histopathological similarities between TOQ and COO and clinical aggressiveness and great tendency to recurrence of the former. Therefore, we evaluated the allelic loss (PA) of the region associated with the *PTCH* gene, 9q22.3-31, in COO and TOQ and investigated the expression of miRNAs miR-15a and miR-16-1 and its impact on the expression of BCL2 in TOQ. The microsatellites markers D9S287, D9S196, and D9S127 were investigated for PA. There was loss in at least one *locus* in 5/7 TOQ and in 4/7 COO samples. By using real time PCR (qRT-PCR), we found miR-15a and/or miR-16-1 downregulation in the majority of TOQ samples (24/28). We also found higher *BCL2* mRNA expression in 19 out of 20 TOQ frozen samples through qRT-PCR. Additionally, moderate to high Bcl-2 immunopositivity was found in the basal layer cells in 16 out of 18 paraffin embedded TOQ (median: 42.6%). *In vitro* over-expression of miR-15a/16-1 in human TOQ primary cell culture (KCOT-1) resulted in a decrease of Bcl-2 protein expression. Furthermore, all five paired TOQs collected before (primary tumor) and after the marsupialization procedure (marsupialized tumor) exhibited increased levels of miR-15a expression after this surgical procedure ( $p = 0.04$ ). Our findings demonstrate that, despite the existence of clinical, morphological, immunohistochemical, and biological behavior differences between COO and TOQ, both harbor similar genetic alterations at 9q. Also, our results strongly suggest that TOQ neoplastic cells present an anti-apoptotic profile to which a lower miR-15a/16-1 expression might be related. Additionally, we demonstrated that miRNA expression

increases after marsupialization, implicating an etiological and therapeutic role of these small RNA molecules in TOQ.

**Key-words:** odontogenic keratocyst, keratocyst odontogenic tumor, orthokeratinized odontogenic cyst, *PTCH*, *BCL2*, microRNAs, miRNA15a/16-1

# I. Introdução

## I. INTRODUÇÃO:

O tumor odontogênico queratocístico (TOQ) e o cisto odontogênico ortoqueratinizado (COO) são dois tipos histológicos distintos de lesões odontogênicas de natureza neoplásica e cística respectivamente. TOQ e COO apresentam grande semelhança histológica, como a presença de componente cístico e de uma superfície queratinizada, característica que levou a classificação prévia do COO como sendo uma variante ortoqueratinizada do ceratocisto odontogênico (PHILLIPSEN,1956). Estudos na literatura demonstram diferenças significativas nas características histológicas e no comportamento clínico entre TOQ e COO. Enquanto o TOQ típico é caracterizado por um revestimento uniforme e uma camada de células basais bem desenvolvida, formando uma superfície corrugada e paraqueratinizada, no COO, esses aspectos não estão presentes. De acordo com Neville, em contraste com a taxa de recorrência significativa após o tratamento cirúrgico convencional do TOQ, o COO mostra pouca agressividade clínica (NEVILLE ET AL.,2009)

A mutação e a perda de heterozigossidade do gene supressor de tumor *Patched* (*PTCH*) em TOQs esporádico e também associados à síndrome do carcinoma basocelular nevíide (SCBN) foram demonstrados em diversos estudos (LENCH ET AL.,1996; BARRETO ET AL.,2000). Baseados nas evidências de que a via de sinalização do gene *PTCH*, a via Hedgehog (via HH), está associada à odontogênese e de que os tumores odontogênicos são derivados de remanescentes do tecido odontogênico, alguns pesquisadores sugeriram que esta sinalização estaria envolvida também na tumorigênese odontogênica, atuando como mediadora das interações epitelio-mesênquima. A proteína *PTCH* está envolvida na via HH, reprimindo a expressão de vários genes-alvo importantes para o desenvolvimento e diferenciação celular. O gene *PTCH* foi mapeado no cromossomo 9q22.3 e codifica uma proteína que inibe a proteína SMO e a transdução de sinal da via HH. Alterações no gene *PTCH* e evidências da ativação constitutiva da via HH foram descritas em TOQ (DINIZ ET AL.,2009), porém, não há relatos na literatura de qualquer evidência de alterações no gene *PTCH* em COO.

Além do gene *PTCH*, uma maior expressão de alguns marcadores moleculares foi demonstrada em TOQ, quando comparado ao COO. Dentre esses marcadores, tem-se o marcador de proliferação IPO-38 (THOSAPORN ET AL.,2004), os marcadores de ciclo celular, PCNA e o p53 (LI ET AL.,1994; PIATTELLI ET AL.,1998), e os marcadores de proliferação Ki-67 e P63 (DONG ET AL.,2010; JOHANN ET AL.,2011). Esses estudos sugerem uma possível

anormalidade na regulação do ciclo celular, tais como maior atividade proliferativa e comportamento anti-apoptótico no TOQ. Um menor índice apoptótico no TOQ é também corroborado por estudos de expressão do gene anti-apoptótico *linfoma de células B, 2 (BCL2)*, no quais uma notável imunomarcagem do BCL2 foi detectada nas camadas basais do TOQ, e não em COO (RANGIANI & MOTAHHARY,2009). No entanto, a significância dessa observação ainda é pouco entendida.

O gene *BCL2* é um importante proto-oncogene localizado no cromossomo 18q21.3 que codifica uma proteína capaz de parar apoptose, facilitando a sobrevivência da célula independente de promover a divisão celular (VAUX ET AL.,1988; HOCKENBERY ET AL.,1990). Acredita-se que o *BCL2* está envolvido na resistência ao tratamento convencional do câncer e sua expressão aumentada tem sido implicada em um número grande de neoplasias (COTTER,2009). Dentre os mecanismos que podem levar ao aumento da expressão do *BCL2*, foi identificada a perda de microRNAs (miRNAs), os quais regulam negativamente a sua expressão (CIMMINO ET AL.,2005).

Os miRNAs são pequenos RNAs que regulam a expressão dos RNAs mensageiros (mRNA) e têm sido associados à tumorigênese humana (AMBROS,2004; GOMES & GOMEZ,2008). Em animais, miRNAs de fita simples se ligam à sequências de mRNAs específicos através de uma complementariedade imperfeita. O mRNA ligado pode permanecer não traduzido, resultando em níveis reduzidos da proteína correspondente, ou pode ser degradado, resultando na redução de seus níveis. O cluster de miRNAs miR-15a/16-1 demonstrou ser capaz de induzir a apoptose ao ter como alvo o fator anti-apoptótico *BCL2* ao nível pós-transcricional (CIMMINO ET AL.,2005). Portanto, miR-15a e miR-16-1 são considerados antisense naturais *BCL2* e exibem um papel supressor de tumor.

Nesse estudo, foram investigados aspectos moleculares do TOQ e do COO na tentativa de descobrir prováveis mecanismos patogênicos que explicam a semelhança histopatológica dessas duas lesões, assim como mecanismos que ajudem no entendimento da maior agressividade clínica e maior tendência de recorrência do TOQ em relação às outras lesões odontogênicas. Para isso, foi proposto avaliar a perda alélica (PA) da região associada ao *PTCH*, 9q22.3-31, em COO e TOQ, e a investigar a expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 e seu impacto na expressão do *BCL2* em TOQ.

O estudo de eventos genéticos que relacionam o gene *PTCH* à patogênese do COO, além da do TOQ, é de grande relevância, já que possibilita elaborar teorias mais concisas de desenvolvimento e progressão neoplásica dos cistos odontogênicos, juntamente com o papel da via HH nesses processos. Paralelamente a este estudo, e tomando como base a notável

super expressão da proteína anti-apoptótica BCL2 em TOQ comparadamente a outros cistos, a investigação de mecanismos que modulam a expressão de *BCL2* - como os miRNAs miR-15a/16-1, também se torna relevante, por abrir novos caminhos úteis na busca da patogênese do TOQ.

## II. Revisão da literatura

## **II. REVISÃO DA LITERATURA:**

### **1. O TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO E O CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO**

Os cistos e tumores odontogênicos compreendem um grupo de lesões que acomete a maxila e/ou a mandíbula. Algumas dessas lesões são classificadas como neoplasias, ainda que raramente apresentem comportamento maligno. Tumores odontogênicos, semelhantes à odontogênese, apresentam interações variadas entre os tecidos epiteliais e do ectomesênquima. Devido à frequente, porém atípica relação entre os cistos e tumores odontogênicos da mandíbula e o dente, quando presentes na área dentada, e o comum aparecimento dos cistos e tumores odontogênicos no ramo ascendente da mandíbula, há uma concordância geral de que os remanescentes dos tecidos associados à odontogênese tais como a lâmina dentária, o órgão do esmalte e a bainha de Hertwig, são provavelmente os responsáveis pelo desenvolvimento dos cistos e tumores odontogênicos (SOSKOLNE & SHEAR,1967; TOLLER,1967; STOELINGA ET AL.,1975). As teorias que propõem explicar o desenvolvimento dos cistos odontogênicos a partir dos tecidos associados à odontogênese serão descritas abaixo.

As células encontradas nos cistos mandibulares podem migrar anormalmente durante o desenvolvimento da lamina dental (PANDERS & HADDLERS,1969), deixando remanescentes epiteliais em localização anormal. A migração aberrante pode ser causada por programação errônea, devido à alteração em um gene regulatório. Também é possível que remanescentes da lâmina dental sejam bioprodutos normais da formação do dente, e que devem, normalmente, regredir, em estágios tardios do desenvolvimento. No entanto, as células precursoras dos cistos mandibulares podem falhar em involuir, devido à alteração genética. Alternativamente, remanescentes da lamina dental podem permanecer quiescentes no osso da mandíbula ou da maxila durante a infância e vida adulta, a não ser que eventos genéticos criem clones de células hiperproliferativas, similar a neoplasmas benignos. As células do revestimento de alguns cistos, de fato, apresentam alta atividade mitótica, mas, ao mesmo tempo, também demonstram inibição por contato, fenômeno característico do epitélio normal (VEDTOFTE ET AL.,1982). Finalmente, o defeito primário, que leva ao desenvolvimento do cisto, pode ser

encontrado no tecido mesenquimal adjacente, o qual pode induzir o crescimento dos remanescentes epiteliais.

O tumor odontogênico queratocístico (TOQ), também conhecido como ceratocisto odontogênico, é um tumor odontogênico cístico, intra-ósseo, benigno e com potencial para agressividade e comportamento infiltrativo (NEVILLE ET AL.,2009). No passado, o TOQ era chamado de tumor primordial, devido à crença de que esse se originava dos primórdios de um dente antes que a mineralização acontecesse, e, somente na década de 50, a lesão foi descrita como ceratocisto odontogênico, por Phillipson (PHILLIPSON,1956). Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reclassificou a lesão como sendo uma neoplasia, por melhor refletir a sua natureza. O TOQ, que é mais frequentemente presente na segunda, terceira e quarta décadas de vida, se desenvolve principalmente na mandíbula posterior e afeta um número levemente maior de indivíduos do sexo masculino. O seu crescimento tende a ser no sentido ântero-posterior dos espaços medulares, e as lesões podem ser únicas ou múltiplas, multi ou uniloculadas, pequenas ou extensas (NEVILLE ET AL.,2009). Histologicamente, o TOQ é caracterizado por epitélio uniforme, geralmente corrugado, de 6 a 8 células de espessura, apresentando uma interface plana basal com a parede fibrosa. As células basais colunares que apresentam polaridade nuclear reversa é uma importante característica do TOQ (NEVILLE ET AL.,2009) (figura 1) e cistos satélites podem ser encontrados em alguns casos (HODGKINSON ET AL.,1978; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU & NICOLATOU,1990).

O TOQ pode ocorrer de forma esporádica ou associada à síndrome do carcinoma basocelular nevóide (SCBN). A SCBN foi descrita por Gorlin e Goltz, em 1960, como uma síndrome que compreende múltiplos carcinomas basocelulares, múltiplos TOQ e anormalidades esqueléticas. Espectros de outras anomalias neurológicas, oftalmológicas e endócrinas, são variáveis associadas também à síndrome (MANFREDI ET AL.,2004). Em 1996, dois grupos distintos de pesquisadores descobriram que a principal mutação causativa da SCBN ocorre no gene *PTCH*. Mutações neste gene em TOQs associados à SCBN foram descritas em 1997, e subsequentemente, a mutação neste gene foi relatada no revestimento epitelial de casos esporádicos de TOQ (LENCH ET AL.,1996; BARRETO ET AL.,2000).

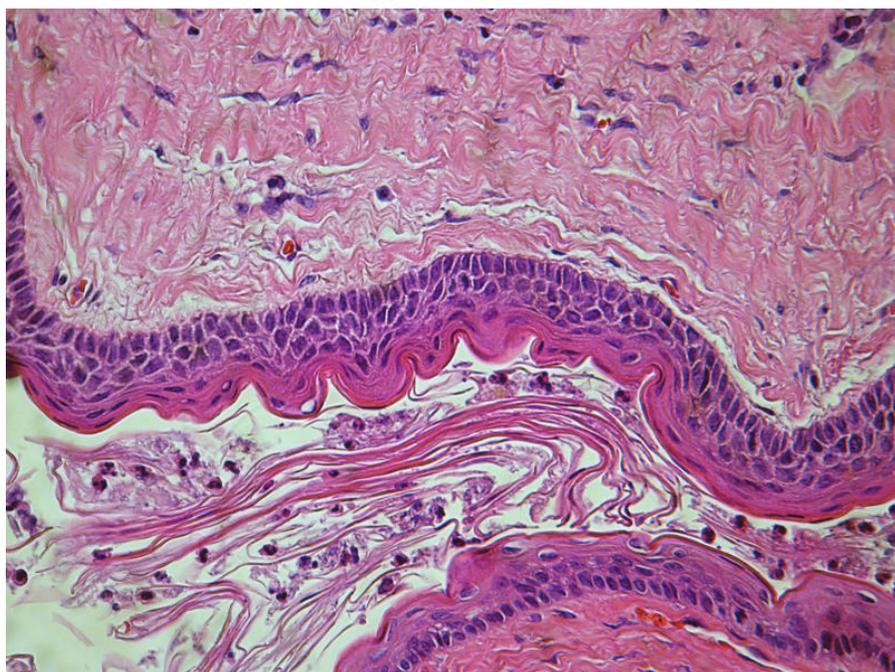


Figura 1 – Histologia do tumor odontogênico queratocístico. O TOQ apresenta uma capsula fibrosa delgada e friável. O revestimento epitelial é composto por uma camada uniforme de epitélio escamoso, estratificado com 6 a 8 células de espessura. A superfície luminal exhibe células epiteliais paraceratóticas achatadas, que exibem aspecto ondulado ou corrugado. A camada basal epitelial é composta por uma camada em paliçada de células epiteliais colunares, as quais frequentemente apresentam núcleos hipercromáticos (NEVILLE ET AL.,2009). Lamina corada com H&E, ampliação de 400x.

O TOQ é uma das lesões odontogênicas com componente cístico mais agressiva, possuindo altos índices de recorrência e uma tendência de invadir tecidos adjacentes. O índice de recorrência varia de aproximadamente 20% a 62% (CHIRAPATHOMSAKUL ET AL.,2006). Em alguns casos, o comportamento agressivo do TOQ pode levá-lo a penetrar a cortical do osso. Esse comportamento agressivo, associado ao alto índice de recorrência, confirma o legítimo potencial neoplásico do TOQ. O conceito neoplásico dessa lesão também é apoiado por estudos moleculares que demonstraram perda de heterozigosidade, principalmente nos genes *p16*, *p53*, *PTCH1*, *MCC*, *TSLC1*, *LTAS2* e *FHIT* (AGARAM ET AL.,2004; HENLEY ET AL.,2005; MALCIC ET AL.,2008). Tais estudos também comprovaram o alto índice de expressão de marcadores de proliferação e anti-apoptóticos como PCNA, p53, p63 e BCL2 (DE PAULA ET AL.,2000; HAYASHITA ET AL.,2005; IORIO ET AL.,2005; LO MUZIO ET AL.,2005; MURAKAMI ET AL.,2006; WANG ET AL.,2008). Levando em consideração que todos estes genes são genes supressores de tumor associados a diferentes tipos de neoplasias humanas, esses dados ajudam na explicação do comportamento agressivo do TOQ. Tomando como base estas características clínicas e moleculares, em 2005, a OMC reclassificou essa entidade como sendo um tumor benigno com epitélio odontogênico e estroma maduro e fibroso, sem ectomesênquima odontogênico.

Abordagens terapêuticas para o TOQ variam nos diferentes estudos, indo da marsupialização e enucleação, que podem ser combinadas com terapias adjuvantes como a crioterapia e a solução de Carnoy, à ressecção marginal ou radical. A marsupialização envolve técnicas que aliviam a pressão dentro do cisto que causa o seu crescimento. Essa técnica pode ser executada através de uma pequena abertura no cisto, a qual pode ser mantida aberta por algum tipo de dreno, ou através da conversão do cisto em uma bolsa, suturando o revestimento do cisto à mucosa oral quando possível. Essa conversão resulta na exposição do revestimento do cisto à cavidade oral, causa a diminuição dele e ainda reduz a morbidade do processo patológico. A marsupialização é utilizada principalmente como uma etapa intermediária e anterior à enucleação (EYRE & ZAKRZEWSKA,1985; BRONDUM & JENSEN,1991; MARKER ET AL.,1996). Referências na literatura científica relatam a regressão dos cistos marsupializados e mudanças substanciais no seu epitélio (NAKAMURA ET AL.,2002). Em alguns estudos, foi relatado o completo desaparecimento do TOQ (EYRE & ZAKRZEWSKA,1985; NAKAMURA ET AL.,2002; POGREL & JORDAN,2004).

Por outro lado, alguns pesquisadores acreditam que a marsupialização não é um tratamento adequado para o TOQ, pois pode levar as células neoplásicas a serem deixadas *in situ*, sem um destino conhecido (CRANIN ET AL.,1994; STOELINGA,2001; POGREL,2007).

Muitos destes estudos indicam que a marsupialização deve ser apenas um tratamento preliminar de grandes TOQ e, uma vez que o cisto regrida em tamanho, uma cirurgia mais definitiva se tornaria necessária.

O cisto odontogênico ortoqueratinizado (COO) é um cisto intra-ósseo solitário e relativamente raro, pouco agressivo e caracterizado por um epitélio de revestimento ortoqueratinizado. Geralmente, o COO se apresenta como uma lesão única e pequena na mandíbula posterior, entre a quarta e quinta década de vida, e não possui predileção pelo sexo. O COO foi descrito pela primeira vez por Schultz como um cisto dermóide (SCHULTZ,1927), e, mais tarde, foi considerado como uma variante eventual do TOQ por Phillipsen (PHILLIPSEN,1956). Wright, por sua vez, reportou 59 casos do que denominou ser uma entidade distinta do TOQ e demais cistos (WRIGHT,1981). A partir de então, inúmeros trabalhos vêm reportando as características clinico-patológicas do COO, sua natureza e sua classificação histopatológica real. Atualmente, a OMS considera que as lesões císticas da maxila revestida por epitélio ortoqueratinizado não fazem parte do espectro do TOQ e, por isso, devem ser distinguidas das mesmas. Hoje é geralmente aceito o termo descritivo “cisto odontogênico ortoqueratinizado”, sugerido por Li e colaboradores (LI ET AL.,1998), e que reflete a mais plausível origem histológica do cisto. Entre as distinções descritas até os dias de hoje não foram encontradas diferenças significativas entre TOQ e COO, comparando idade, raça, sexo, sintomas e impressões clínicas. Assim, a razão para a separação destas duas entidades, que é basicamente baseada nas diferenças da camada basal e no modo de queratinização, ainda é constantemente avaliada.

Clinicamente, o COO tem recorrência menor, representando cerca de 2.2% dos casos, comparado com 42.2% do TOQ (CROWLEY ET AL.,1992; CHIRAPATHOMSAKUL ET AL.,2006). Histologicamente, COO possui um revestimento epitelial fino e uniforme, com uma superfície luminal de ortoqueratina (WRIGHT,1981). As células basais do COO, que são menos desenvolvidas do que aquelas em TOQ, tendem a serem cuboides ou escamosas e mostram pouca tendência à polarização ou à disposição em paliçada. Além disso, a queratinização no COO é mais extensa (figura 2).

Dentre as características radiográficas, a presença de dentes impactados é um achado mais comum em pacientes apresentando COO do que TOQ. Esse fato pode levar alguns autores a classificar esta entidade como o que provavelmente seria uma variante do cisto dentígero. No entanto, esse critério de diagnóstico é descritivo e suas propriedades biológicas ainda não são bem conhecidas.

Várias tentativas têm sido conduzidas com a intenção de distinguir o TOQ do COO. Estudos imunohistoquímicos revelaram que o perfil de expressão de queratinas entre TOQ e COO é distinto e completamente diferente entre eles. Enquanto o COO expressa queratina 1, 2 e 10, sugerindo diferenciação semelhante quanto a epiderme; o TOQ expressa queratina 4, 13, 17 e 19, um padrão único de expressão remanescente do epitélio escamoso da mucosa (DA SILVA ET AL.,2002; ARAGAKI ET AL.,2010). Tais achados revelam a normalidade e a constância no processo de queratinização ocorrente no COO.

No intuito de delinear possíveis diferenças entre os componentes teciduais de TOQ e COO, alguns trabalhos também avaliaram e compararam os aspectos da parede da capsula cística de ambos. Em um primeiro momento, os autores avaliaram, por marcação com vermelho picrossirius e luz polarizada, as fibras colágenas presentes na parede da capsula cística. Foram demonstradas diferenças significativas na polarização das fibras colágenas na zona sub-epitelial, revelando, assim, a presença de fibras bem empacotadas no COO e fibras empacotadas frouxamente no TOQ. Essa descoberta seria um indicio de fibras pré-colágenas, intermediárias ou patológicas neste último, TOQ (ZHANG ET AL.,2011). Posteriormente, da Silva e colaboradores demonstraram um perfil difuso de fibronectina e COLs I e III em uma parede cística menos organizada no TOQ, em comparação à expressão fibrilar das fibras colágenas no COO. Estes achados revelaram um envelope cístico mais bem formado em COO comparadamente ao TOQ (DA SILVA ET AL.,2002).

Além de diferenças no perfil de expressão de queratina e na constituição da parede da capsula cística, diferenças na expressão de marcadores moleculares também foram demonstradas entre TOQ e COO. A avaliação do marcador de proliferação IPO-38 e da calretinina – uma proteína “calcium-binding” presente na lamina dental - revelou marcação nuclear particularmente na camada suprabasal do COO e TOQ e maior índice de imunomarcação em TOQ (THOSAPORN ET AL.,2004). Uma maior ocorrência de outros marcadores do ciclo celular, como o PCNA e o p53, também foi descrita na camada parabasal de TOQ, comparadamente ao COO e a outros cistos odontogênicos, refletindo, assim, uma possível anormalidade na regulação do ciclo celular em TOQ (LI ET AL.,1994; PIATTELLI ET AL.,1998; CHEN ET AL.,2009).

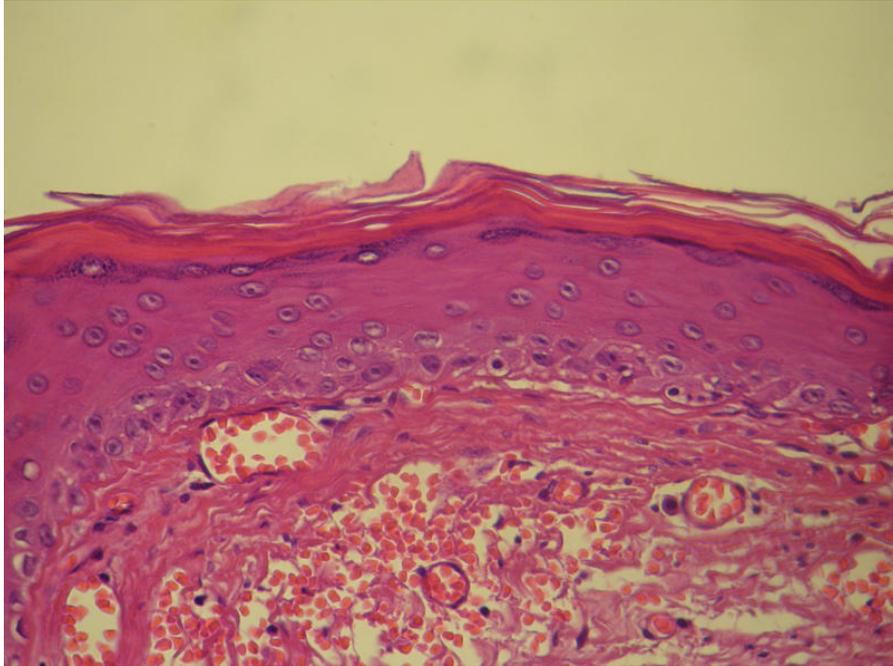


Figura 2 – Histologia do cisto odontogênico ortoqueratinizado. O revestimento cístico do COO é composto por epitélio escamoso estratificado, que mostra uma superfície ortoqueratinizada de espessura variada. Os grânulos de cerato-hialina podem ser proeminentes na camada superficial do epitélio subjacente à ortoceratina. O revestimento epitelial pode ser relativamente delgado. Uma camada basal proeminente organizada em paliçada, característica do TOQ, não está presente (NEVILLE ET AL.,2009). Lamina corada com H&E, ampliação de 400x.

A análise dos níveis de marcadores de proliferação Ki-67 e P63 revela que eles são também significativamente maiores no TOQ quando comparado tanto ao COO como a outros cistos de desenvolvimento (DONG ET AL.,2010; JOHANN ET AL.,2011). Essa observação sugere uma maior atividade proliferativa e menor índice apoptótico em TOQ. O fato do TOQ apresentar um menor índice apoptótico também é corroborado por estudos de expressão do gene anti-apoptótico *BCL2*, nos quais foi detectada notável imunomarcagem do *BCL2* na camada basal do TOQ, mas não na do COO (RANGIANI & MOTAHHARY,2009). No entanto, a significância desse achado ainda é pobremente entendida.

## **2. O GENE *PTCH***

O gene *PTCH* (OMIM NO 601309) está mapeado na região 9q22.32, consiste de 23 exons que se estendem por aproximadamente 47 kb e codifica uma glicoproteína transmembrana de aproximadamente 1447 aminoácidos. “Splicings” alternativos desse gene resultam em múltiplos transcritos que codificam isoformas diferentes. Esse gene está envolvido na via Hedgehog (via HH), um regulador chave do desenvolvimento embrionário, e controla a proliferação e determinação celular.

A via HH possui participação essencial na embriogênese, pois determina a diferenciação celular e/ou a morfogênese de diversos órgãos e tecidos, incluindo o epitélio dental (CHIANG ET AL.,1996; HARDCASTLE ET AL.,1998; CHIANG ET AL.,1999; HEBROK ET AL.,2000). Componentes dessa via coordenam a invaginação do epitélio oral no tecido embrionário subjacente, durante a fase inicial de formação dos dentes (HARDCASTLE ET AL.,1998). Outra evidência da importância dessa via na formação e desenvolvimento dos dentes foi notada através de um experimento com alelos condicionais que tornou possível a remoção da atividade de expressão da proteína sinalizadora hedgehog (HH) apenas no germe dentário de camundongos. Esse experimento demonstrou que a ausência desse sinalizador no tecido odontogênico desses animais provoca acentuado retardamento do crescimento do dente, levando à disposição anômala destes na mandíbula e interrupção da morfogênese (DASSULE ET AL.,2000).

Múltiplos componentes da via HH localizam-se na estrutura celular denominada cílio primário e atualmente acredita-se que a sinalização acontece por meio dessa organela (NEVILLE ET AL.,2009). O cílio primário tem função sensorial e é estruturado por microtúbulos que recebem sinais mecânicos e químicos e os transmite ao núcleo (figura 3). De acordo com

esse modelo de funcionamento da via, na ausência da proteína sinalizadora HH, o receptor transmembranar PTCH impede que a vesícula que contém SMO entre no cílio. Nesse estado, o efetor da via, GLI, é fosforilado, marcado com ubiquitina e degradado por proteossomos. O GLI parcialmente degradado atua como repressor da transcrição. Na presença do ligante, O PTCH é internalizado em um endossomo e, posteriormente, é degradado. O SMO é então liberado, trafega pelo microtúbulo, se torna ativado e ativa o efetor da via GLI. Em seguida, o GLI ativado entra no núcleo e ativa a transcrição de genes alvos, incluindo o próprio *GLI*, o *PTCH* e *HIP* (TEGLUND & TOFTGARD,2010) (figura 3). O HIP possui a atividade de sequestrar o ligante HH e, junto com PTCH, promovem um “feedback” negativo dentro da via (INGHAM ET AL.,1991).

Os alvos da via HH são importantes para a função oncogênica dessa via e incluem genes que controlam a proliferação celular (proto-oncogenes), além de também conter genes envolvidos na angiogênese. A superatividade da via, seja ela causada pela mutação de algum componente da via HH ou pela superexpressão do ligante, é uma marca molecular de diversos grupos de tumores, incluindo carcinoma basocelular, meduloblastoma, câncer de pâncreas, de pulmão e de próstata (DAHMANE ET AL.,1997; RAFFEL ET AL.,1997; THAYER ET AL.,2003; WATKINS ET AL.,2003; SANCHEZ ET AL.,2004). A evidência de que essa via está constitutivamente ativa foi demonstrada também em um estudo com TOQ. Nesse estudo, a análise das isoformas do *PTCHI* demonstrou que o TOQ, assim como as mucosas adjacentes à lesão, apresentam níveis de expressão da única isoforma auto-regulada pela via HH (*PTCH1b*) (AGREN ET AL.,2004), ao contrário dos folículos pericoronários, sugerindo que essa via está constitutivamente ativa na lesão (DINIZ ET AL.,2009).

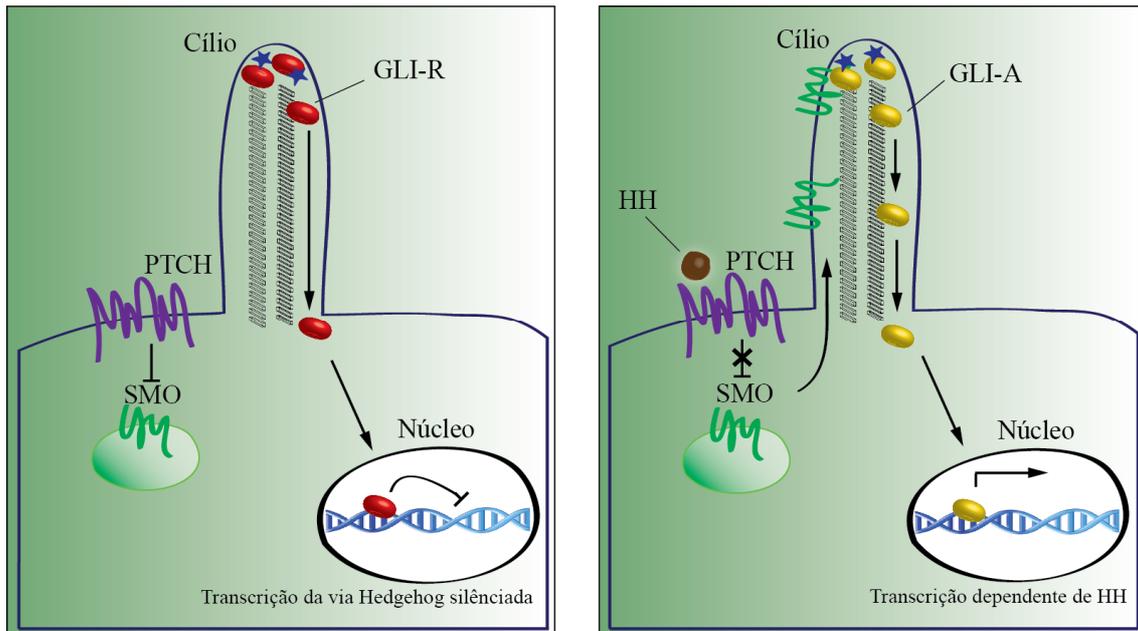


Figura 3 – Representação esquemática da via HH. (A) Na ausência do ligante HH, a proteína PTCH está presente no cílio primário e previne o asseso de SMO a este. O fator de transcrição “zinc-finger” GLI é parcialmente degradado pelo proteossomo, em um fragmento repressor (GLI-R) - em função de mecanismos que envolvem o cílio primário. (B) Na presença do ligante ou inativação do PTCH, o SMO se torna livre e se move para dentro do cílio, onde leva à estabilização e ativação de GLI. O GLI ativado (GLI-A) migra até o núcleo e estimula a transcrição de genes alvos da via HH.

Em 1996, foi descoberto que o *PTCH1* era o responsável pela SCBN (HAHN ET AL.,1996; JOHNSON ET AL.,1996). Pacientes com SCBN podem desenvolver múltiplos carcinomas basocelulares em idades precoces e também meduloblastomas e TOQ, sendo que todas essas neoplasias exibem alteração do *PTCH*. Uma vez que o *PTCH* é supressor da função HH, a perda desse gene pode causar crescimento anormal em muitos tipos de células. Em 2006, o padrão de distribuição de 284 mutações do gene *PTCH* localizadas no DNA extraído de tumores e de pacientes portadores da SCBN foram analisadas. Segundo os autores, as mutações estão aglomeradas principalmente nos "loops", sendo os dois grandes "loops" extracelulares e o extenso "loop" intracelular. Interessante notar que, nos casos de SCBN e em cada classe de tumor analisado, revelou-se uma distribuição das mutações em diferentes domínios do *PTCH*. No entanto, não houve correlação entre a posição da mutação germline e o fenótipo nos pacientes com SCBN (WICKING ET AL.,1997; BOUTET ET AL.,2003). O tipo de mutação foi também único para os diferentes grupos de neoplasias associadas à SCNB, como o carcinoma basocelular. O número de mutações descritas para TOQ eram muito pequenas para estabelecer um padrão.

### **3. PERDA DE HETEROZIGOSIDADE, OU PERDA ALÉLICA**

Entre as ferramentas mais comuns utilizadas na procura por alterações genômicas, está o sequenciamento direto e a chamada análise de fragmentos. Esta última pode ser empregada na busca da perda de heterozigosidade - ou perda alélica (PA). A PA é um fenômeno biológico resultante de variações ambientais e/ou genéticas, como instabilidade genômica - incluindo não disjunção mitótica e recombinação, perda cromossomal, mutação e deleção do DNA, translocação e conversão gênica (CAVENEY ET AL.,1983; YOKOTA ET AL.,1987; OGIWARA ET AL.,2008). Os estudos que buscam detectar a PA identificam perda de um alelo em um *locus* particular heterozigoto. Se a PA acontece em um gene supressor de tumor e o alelo remanescente sofre mutação, deleção ou silenciamento genético e a célula é levada a um estado de hemizigose (um alelo deletério e um deletado) ou homozigose (para o alelo deletério). A consequência desse estado pode ser a inativação da função supressora de tumor, contribuindo para o desenvolvimento de câncer ou metástase (KNUDSON,1971; VOGELSTEIN ET AL.,1989; GOLDBERG ET AL.,2000; OSORIO ET AL.,2002; JOERGER & FERSHT,2008). A identificação de regiões de PA aumenta o entendimento dos mecanismos de tumorigenesis e

pode facilitar tanto o desenvolvimento de marcadores de prognóstico genético como o de alvos terapêuticos.

A análise de PA em cânceres pode ser conduzida sob dois tipos de designe: o estudo de amostras pareadas e o de não pareadas. A análise de PA de amostras pareadas identifica regiões de PA pelo exame de alterações no status genômico de células normais em relação às células tumorais do mesmo paciente. O outro tipo de estudo realiza a análise de PA em situações na qual a amostra de DNA normal do paciente não está disponível. Diversos métodos/software têm sido desenvolvidos para inferir o status de PA, analisando dados genótipos sob diferentes modelos de probabilidade (COX ET AL.,2005; YANG ET AL.,2011). Em ambos designes para estudo de PA, a análise, que incide sob um marcador genético, é geralmente composta da procura por mudanças na dosagem de um alelo heterozigoto em relação ao outro alelo.

Marcadores genéticos são seqüências de DNA genômico com localização única e conhecida em um cromossomo, os quais podem ser usados para identificar células, indivíduos ou espécies. Tais marcadores são descritos como uma variação no DNA gênomico surgida devido à mutação ou alteração no *locus* cromossômico e que pode ser observada. Um marcador genético pode ser ou uma seqüência pequena de DNA que engloba uma mudança em um único par de bases, como SNP (*single nucleotide polymorphism*), ou uma seqüência mais longa, como microsátélites.

Microsátélites são também conhecidas como *Simple Sequence Repeats* (SSRs) ou *Short Tandem Repeats* (STRs) e são constituídos por seqüências, repetidas, de um a seis pares de bases do DNA genômico. Um exemplo comum de microsátélites é uma repetição  $(CA)_n$ , onde  $n$  varia entre os alelos. A seqüência é geralmente simples, constituindo de 2, 3 ou 4 nucleotídeos (di-, tri-, e tetra-nucleotídicas, respectivamente) que podem se repetir de 2 a 100 vezes. A grande variabilidade entre os alelos pode ser explicada devida à alta taxa de mutação nestas regiões de microsátélites, que passam então a apresentar altos níveis de polimorfismos inter ou intra-específicos, dentro de uma população. Essa característica faz dos marcadores de microsátélites, ou marcadores polimórficos, um artifício usado exhaustivamente em estudos de PA.

Inicialmente, os estudos de PA foram realizados usando análises baseadas em *Southern blot* de polimorfismos de comprimento de fragmentos de restrição que diferenciam um alelo parental de um indivíduo em um dado *locus* e permite, assim, a avaliação da PA pela simples comparação do padrão alélico detectado em dois tipos de amostras pareadas de DNA extraído; a primeira amostra vem do DNA de um tecido normal, e a segunda, do DNA de um

tumor (LASKO ET AL.,1991). Atualmente, biotecnologias bem estabelecidas e rotineiramente usadas para examinar PA incluem hibridização genômica comparativa (BALSARA ET AL.,1999), cariótipo espectral (ABDEL-RAHMAN ET AL.,2001), hibridização fluorescente *in situ* (PRAYSON ET AL.,2002) e reação em cadeia da polimerase (PCR). Essa última abordagem analítica é baseada na amplificação por PCR de seqüências polimórficas de STR, predominantemente da forma (CA)<sub>n</sub> (JONES & NAKAMURA,1992; JONES & NAKAMURA,1992). O uso dessa tecnologia foi extensivamente validado e mostra boas vantagens, pois (i) requer pouco material inicial, o que permite uma análise de PA em circunstâncias nas quais as amostras são escassas ou de pouca qualidade (como material fixado e embebido em parafina); (ii) é rápida; e (iii) o desenvolvimento de mapas genéticos de alta resolução baseados em STRs (WEISSENBACH,1993; GYAPAY ET AL.,1994) permite que marcadores sejam selecionados para alto conteúdo polimórfico e para posição cromossômica desejada, aumentando a probabilidade de análises informativas.

Posteriormente, o uso de tecnologia baseada no sequenciamento de DNA fluorescente foi adaptado e usado para detecção de regiões múltiplas e sobrepostas de alelos de microsatélites amplificados por PCR (DAVIES ET AL.,1994; REED ET AL.,1994). Tal sistema permite a determinação automática do tamanho, a quantificação linear dos alelos e, por fim, a discriminação computadorizada entre alelos verdadeiros e bandas *stutter* dos marcadores de microsatélites (REED ET AL.,1994) – sendo estas últimas bandas de pequenos fragmentos, causadas pelo deslizamento da polimerase e prolongamento da extensão da extremidade 3' sem molde (HAUGE & LITT,1993).

A busca de PA, assim como de mutações, na região/gene *PTCH* em diferentes tumores foi incentivada, primeiramente, pela localização do gene para SCBN nas bandas 9q22.3-31 do cromossomo 9 através da análise de ligação, utilizando-se indivíduos de uma mesma família (FARNDON ET AL.,1992; CHENEVIX-TRENCH ET AL.,1993; GOLDSTEIN ET AL.,1994).Posteriormente, essa busca foi incentivada pela identificação do gene específico mutado – *PTCH* – responsável pela SCBN (HAHN ET AL.,1996; JOHNSON ET AL.,1996).

De acordo com diversos estudiosos, a ocorrência de PA na região 9q22.3-31 e/ou mutação somática do *PTCH* está presente em vários contextos. Dentre os quais, em TOQ (LENCH ET AL.,1996; BARRETO ET AL.,2000), em outros tumores associados em maior ou menor grau a SCBN – como o carcinoma basocelular, meduloblastoma, rabiomioma e rhabdomyosarcoma fetal e tumores de ovários (SCHOFIELD ET AL.,1995; CHIDAMBARAM & DEAN,1996; GAILANI ET AL.,1996; LEVANAT ET AL.,1996; UNDEN ET AL.,1996; WOLTER ET AL.,1997; ASZTERBAUM ET AL.,1998; DONG ET AL.,2000; TSUJI ET AL.,2005; TOSTAR ET

AL.,2006). Percebeu-se, também, em outros tumores derivados do tecido do cérebro, mama, bexiga e esôfago (XIE ET AL.,1997; MAESAWA ET AL.,1998; MCGARVEY ET AL.,1998). A PA para marcadores da região 9q22–9q31 foi também encontrada em cisto dentífero (LEVANAT ET AL.,1996; PAVELIC ET AL.,2001) e em ameloblastoma (FARIAS ET AL.,2012); Além disso, uma mutação no gene *PTCH* foi relatada em cisto odontogênico calcificante (PEACOCK ET AL.,2010).

Nos estudos de PA da região que contém o *PTCH*, são normalmente utilizados a amplificação por PCR para diferentes marcadores fluorescentes polimórficos de microsatelites distribuídos pela região cromossômica – a qual compreende a região de 9q22 a 9q31. O marcador D9S196 se encontra em posição centromérica e proximal, o D9S287 se encontra em posição telomérica e ambos se encontram na banda 9q22.3. Já o marcador D9S127 flanqueia o lado distal em 9q31 (figura 4).

As freqüências de PA para os marcadores da região *PTCH* variam entre os estudos e entre o tipo de amostra investigada. Uma frequência considerável foi encontrada em carcinoma basocelular e em TOQ, para os marcadores D9S196, D9S127 e D9S287. Em alguns artigos, a PA do marcador D9S196 foi relatado em 20% dos TOCs (LEVANAT ET AL.,1996) e de 30% a 72.2% dos carcinomas basocelular nevídes (HOLMBERG ET AL.,1996; DANAEE ET AL.,2006). A PA do marcador D9S287 foi descrita em 40% e 42% dos carcinomas basocelular nevídes (HOLMBERG ET AL.,1996; SHEN ET AL.,1999). Em TOC, a PA dos marcadores D9S287 e D9S127 foi descrita em estudos conduzidos por Levanat e colaboradores em dois momentos distintos (1996 e 2000), (LEVANAT ET AL.,1996; LEVANAT ET AL.,2000) e os resultados foram: 50% e 67%, para o primeiro marcador, e 47% e 20%, para o segundo.

#### **4. O GENE *BCL2***

O gene *BCL2* é um importante proto-oncogene localizado no cromossomo 18q21. Seu produto proteico esta localizado nas membranas do núcleo, no retículo endoplasmático e nas mitocôndrias (AKAO ET AL.,1994). O *BCL2* foi originalmente relacionado ao câncer por ter sua função alterada na translocação cromossômica t4;18. Essa translocação leva a expressão constitutiva de *BCL2* e foi tida como a causa do linfoma folicular (TSUJIMOTO ET AL.,1984).

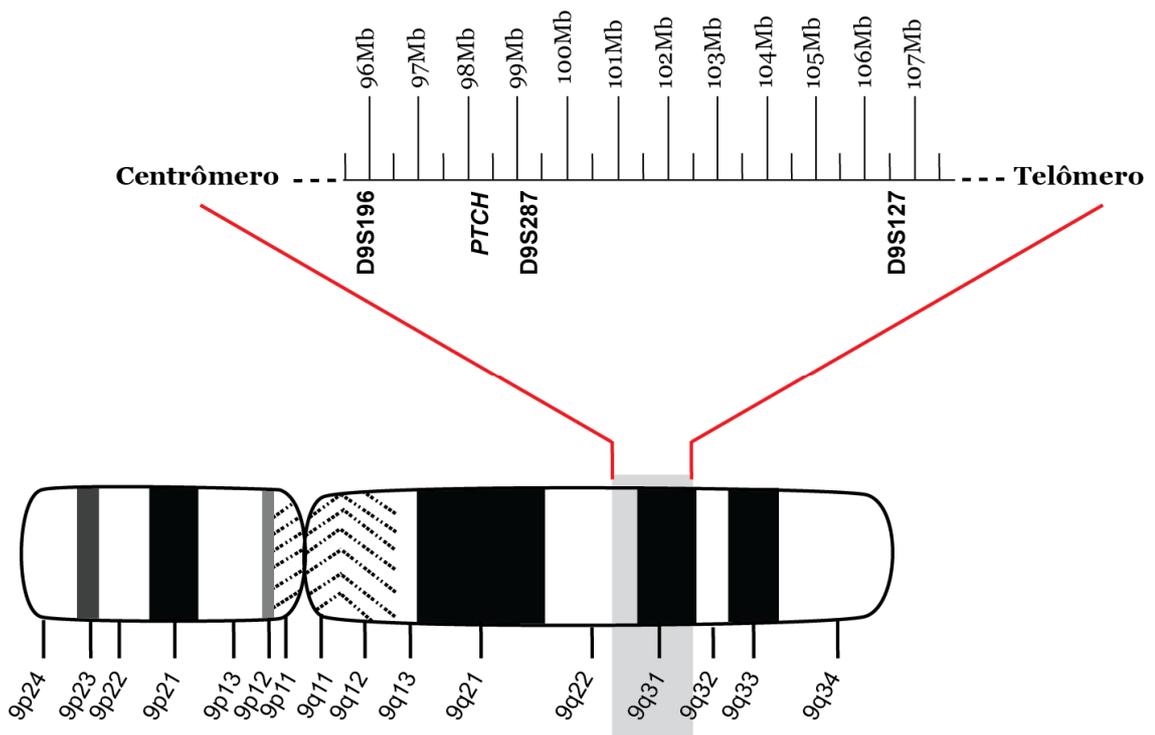


Figura 4 – Localização dos marcadores de microssatélite na região cromossômica 9q22.3-31, associada ao gene *PTCH*. As bandas citogenéticas do cromossomo 9 está representado no ideograma abaixo. O mapa físico dos marcadores cotendo o *locus* ocupado por eles e a distância aproximada entre os *loci* adjacentes está representado acima. A distância entre D9S196 e D9S287 é de aproximadamente 3 Mb. O marcador D9S127 flanqueia o lado distal em 9q31.

A proteína BCL2 é capaz de bloquear a morte celular (apoptose) de algumas células, como os linfócitos, e assim, facilitar a sobrevivência da célula independentemente de promover a divisão celular (VAUX ET AL.,1988; HOCKENBERY ET AL.,1990). A falha no processo de apoptose é essencial para o desenvolvimento do câncer, ao mesmo tempo que representa uma barreira importante para seu tratamento efetivo. A decisão celular para entrar em apoptose é determinada por interações entre três frações da família de proteínas BCL2, em resposta a diversos sinais intracelulares de stress. Em uma das vias de apoptose, a transdução do sinal resultante do stress celular é feita pelas proteínas *BH3-only*, distinguidas pelo domínio BH3 usado para se ligar em seus relativos agentes pró-sobrevivência: BCL2, BCLXL, BCLW, MCL1 E A1. Essa interação reduz a função pró-sobrevivência e permite a ativação das proteínas BAX e BAK presentes na membrana mitocondrial. As proteínas BAX e BAK interagem com o canal aniônico dependente de voltagem e levam à perda do potencial de membrana e à liberação de citocromo no citoplasma. A ativação da via das caspases é então desencadeada pelas moléculas liberadas para o citoplasma e faz com que a célula entre em apoptose (ULUKAYA ET AL.,2011). O balanço entre proteínas pró-sobrevivência e seus ligantes BH3 regula a homeostase do tecido e, tanto a super expressão dos membros da família BCL2, quanto a perda dos relativos fatores pró-apoptóticos, podem ser oncogênicos.

Indícios de alta expressão de BCL2 foram relatados em estudos imunohistoquímicos com TOQ e outros cistos odontogênicos (PIATTELLI ET AL.,1998; KIMI ET AL.,2001; KOLAR ET AL.,2006; WANG ET AL.,2008; VERED ET AL.,2009). Esses trabalhos descrevem uma maior imunopositividade de BCL2 tanto em TOQ, como também em ameloblastoma, em comparação com cistos dentígeros, radiculares e/ou COO, os quais apresentam pouca ou nenhuma reatividade para a proteína anti-apoptótica (KIMI ET AL.,2001; VERED ET AL.,2009). A positividade do BCL2 em TOQ é geralmente localizada na camada basal do revestimento epitelial com ausência de casos de superexpressão, total ou parcial. Os TOQs, esporádico ou associado à SCBN, parecem não possuírem diferenças significativas de imunomarcagem para BCL2. A perda da imunoposição de BCL2 em TOQs marsupializados foi relatada por Pogrel e Jordan (POGREL & JORDAN,2004) em um estudo *follow-up* com 10 pacientes. Nesse trabalho, todos os TOQ marsupializados desapareceram após um período de 7 a 19 meses e a imunoposição do BCL2, antes positiva na primeira biopsia, não foi encontrada no material histológico obtido após a marsupialização. Até o presente momento, pouco se sabe sobre quais são os mecanismos biológicos por trás do comportamento dos cistos marsupializados.

Entre os mecanismos que podem levar a desregulação e aumento da expressão do BCL2, são exaltados as translocações cromossômicas, a hipermetilação e a perda de

microRNAs (miRNAs) regulatórios (TSUJIMOTO ET AL.,1984; TSUJIMOTO ET AL.,1984; HANADA ET AL.,1993; CIMMINO ET AL.,2005).

## 5. MICRORNAS

Os miRNAs são fitas simples de RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos, encontrados em plantas e animais, e que atuam principalmente como reguladores negativos de genes (BARTEL,2004). Os miRNAs possuem genes próprios que podem estar em regiões intrônicas de RNA codificantes ou em regiões de RNA não codificantes (ncRNA). Alguns genes de miRNAs parecem ser solitários e expressos sob o controle de seus próprios promotores. Outros, no entanto, estão arrançados em clusters e podem ser co-regulados com outros membros do cluster. Neste último caso, os miRNAs são provavelmente processados pelo mesmo transcrito precursor policistrônico - molécula única de RNAm produzida a partir do transcrito de vários genes arrançados em tandem - dos genes comuns e podem conter miRNAs de sequências similares ou distintas. O transcrito primário de um gene miRNA (pri-miRNA) abrange um precursor *stem-loop* (pré-miRNA) que abriga a sequência madura do miRNAs (SAYED & ABDELLATIF,2011). De forma similar ao RNAm, os pri-miRNAs são também sujeitados à regulação pós-transcricional. Isso foi inicialmente predito devido à falta de correlação entre os níveis de miRNAs maduros e seus transcritos primários, em várias células normais e de câncer.

Durante a biogênese dos miRNAs, o pri-miRNA é clivado no núcleo, na base da estrutura *stem-loop*, pela enzima RNase III Droscha (LEE ET AL.,2003) e seu associado, DGCR8/Pasha (DENLI ET AL.,2004; GREGORY ET AL.,2004; HAN ET AL.,2004; HAN ET AL.,2006). Nesta reação, DGCR8 identifica o sítio exato de clivagem nas projeções 5' e 3', o qual que flanqueia o *stem-loop*, enquanto a Droscha catalisa a excisão. Alternativamente, poucos pri-miRNAs intrônicos (mirtrons) evitam a Droscha/DGCR8 e são processados por mecanismos de splicing (BEREZIKOV ET AL.,2007; RUBY ET AL.,2007). E ainda, miRNAs que são derivados de pequenos RNAs nucleolar (snoRNA) em várias espécies (ENDER ET AL.,2008; SARAIYA & WANG,2008; HUTZINGER ET AL.,2009; TAFT ET AL.,2009) são processados pela Dicer, mas não requerem Droscha (HUTZINGER ET AL.,2009). Seguindo a complementação desse passo de processamento nuclear, o pré-miRNA *stem-loop* é exportado do núcleo para dentro do citoplasma via exportin-5 e de maneira dependente de RanGTP (YI ET AL.,2003; BOHNSACK ET AL.,2004; LUND ET AL.,2004). No citoplasma, o pré-

miRNA é mais tarde processado pela Dicer para se tornar o constructo maduro funcional de fita simples de 20-22 ribonucleotídeos (HUTVAGNER & ZAMORE,2002).

Os miRNAs exercem seu efeito através de vários mecanismos. Em um primeiro passo, o pré-miRNA é agregado a complexos protéicos volumosos conhecidos como complexos miRNA de silenciamento induzido por RNA (RISC ou miRISC). Dentre as proteínas que formam o complexo RISC, incluem-se: a endonuclease específica de RNA (Dicer), a qual está envolvida no processamento do pré-miRNA em sua forma madura (HUTVAGNER & ZAMORE,2002); a proteína Argonauta, que possui a capacidade de clivar o alvo RNAm (MEISTER ET AL.,2004; O'CONNELL ET AL.,2008); a proteína PW182 do tipo “P-body”; a proteína TRBP, que recruta Argonauta Ago 2 para o complexo; a FMRP1, que está associada com polirribossomos, dentre outras proteínas cuja funções dentro do RISC ainda não foram completamente examinadas. Guiado pela sequência parcialmente complementar entre o miRNA e seu alvo, o complexo RISC se liga ao sítio alvo, principalmente na 3'-UTR do gene, inibindo a tradução do mRNA. Essa inibição aconteceria após a iniciação da tradução e foi primeiramente notada em *C. elegans*, onde lin-4 inibe a tradução de lin-14 sem reduzir a abundância do RNAm, a poliadenilação ou o conteúdo polirribossomal (OLSEN & AMBROS,1999). A partir dessa observação, os autores sugeriram que este efeito poderia ser resultado da dissociação prematura dos ribossomos durante a elongação na tradução.

Um segundo modo de função empregado pelos miRNAs é a inibição do início da tradução, o que requer ambas estruturas caudais, *cap* e *poly(A)* (HUMPHREYS ET AL.,2005; PILLAI ET AL.,2005; THERMANN & HENTZE,2007), cuja ações, em concerto, facilita a tradução. Isso foi demonstrado em um modelo onde o miRNA inibiu a tradução via inibição da montagem do complexo ribossomal 80S em uma maneira dependente de “cap” (MATHONNET ET AL.,2007). Esse efeito pode ser parcialmente atribuído ao recrutamento do fator de anti-associação eIF6 pela RISC, que previne a associação do complexo 80S. Outro mecanismo de ação mais elaborado do miRNAs envolve a deadenilação do RNAm (BEHM-ANSMANT ET AL.,2006; WU ET AL.,2006; WAKIYAMA ET AL.,2007). Existem evidências de que essa função é mediada pela interação da proteína Ago com outros fatores e enzimas deadenilases. Outro modelo para este mecanismo sugere que os miRNAs tornam os RNAm mais susceptíveis a deadenilação via uma maquinaria de degradação. Em geral, a deadenilação do RNAm leva à sua desestabilização. As diferentes formas de regulação gênica provocadas por miRNAs estão representadas na figura 5.

Embora o mecanismo de ação dos miRNAs em mamíferos seja geralmente mais conhecido pela inibição da tradução do RNAm do que pela sua degradação, existem

evidências substanciais que apoiam esta última (BAGGA ET AL.,2005). No entanto, a questão de se os miRNAs induzem a inibição da tradução ou a degradação dos RNAm é melhor adereçada ao nível individual dos miRNAs, do alvo específico e do “background” da célula.

Em 2002, o grupo do Dr. Croce forneceu as primeiras evidências de que genes de miRNAs poderiam ser importantes para a tumorigênese (CIMMINO ET AL.,2005). Os pesquisadores identificaram os genes de miRNA *miR-15* e *miR-16*, mais especificamente *miR-15a* e *miR-16-1*, como potenciais genes de câncer na patogênese da leucemia linfóide crônica. Estes genes estão localizados na região 13q14.3, uma região que, por estar frequentemente deletada em mais da metade dos casos da leucemia linfóide crônica, levou a sucessivas buscas pelo suposto gene do câncer presente nesta região. Porém, somente em 2002 foi identificado, em um caso de leucemia linfóide crônica associada com retinoblastoma e translocação cromossômica t(2:13)(q32;q14), a região crítica deletada e que contém os dois miRNAs, *miR-15a* e *miR-16-1*. Neste mesmo estudo, análises de “Northern blot” e “microarray” demonstraram que miR-15a e miR-16-1 são expressos de forma ubíqua e em altos níveis em linfócitos CD5+ (células que originam a leucemia linfóide crônica) (CALIN ET AL.,2002). Estes achados sugeriram que estes genes poderiam ter um importante papel na homeostase de células B CD5<sup>+</sup>.

Baixos níveis de miR-15a e miR-16-1 foram também reportados em adenomas da pituitária em comparação com tecido pituitário normal (BOTTONI ET AL.,2005). Em cânceres de próstata, também foi encontrada deleção da região 13q14 e baixa expressão de miR-15a e miR-16-1 em aproximadamente 80% das amostras analisadas (BONCI ET AL.,2008). Estes dados, juntamente com os achados em leucemia linfóide crônica (CALIN ET AL.,2002), sugeriram que o miR-15a e o miR-16-1 funcionam como supressor de tumor e sua inativação pode contribuir para a tumorigênese.

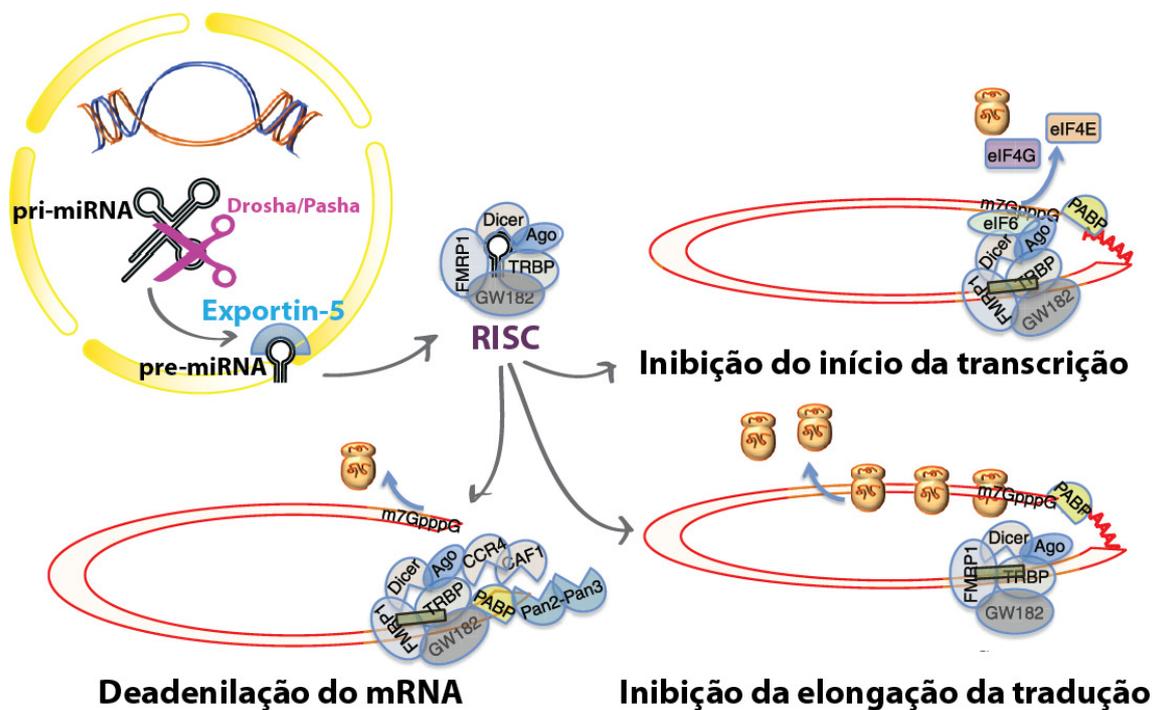


Figura 5 – Passos e moléculas envolvidas no processamento e função dos miRNAs. A primeira etapa do processamento ocorre no núcleo, onde o pri-miRNA é clivado pela enzima Drosha e Pasha. A estrutura pré-miRNA em forma de grampo é então exportada para o citoplasma através da exportina-5. No citoplasma, o pré-miRNA se reúne ao complexo RISC, onde o laço do pré-miRNA é clivado e a vertente madura é usada para direcionar o complexo ao seu sítio de destino, na região 3'-UTR de um RNAm complementar. RISC está envolvida em três funções diferentes: inibição da tradução, inibição da iniciação do alongamento durante a tradução, ou deadenilação - o que resultaria em degradação do mRNA. Revisado por (SAYED & ABDELLATIF,2011)

Genes do câncer anormalmente expressos são frequentemente alvos para mutações que podem ativar ou inativar suas funções. Assim, a triagem de mutações em miRNAs tem sido um passo fundamental na determinação da contribuição que esta nova classe de genes representa para o desenvolvimento do câncer e na identificação de mecanismos genéticos responsáveis pela desregulação dos miRNAs. Sabendo disso, tem sido sugerido que mutações genéticas possam inativar a expressão de miRNAs. De fato, foi identificada mutação germinativa e somática em 5 de 42 miRNAs sequenciados em 11 de 75 pacientes com leucemia linfóide crônica. No entanto, essa mesma mutação não foi achada em 160 indivíduos sem câncer (CALIN ET AL.,2005). Dentre essas mutações, uma germinativa (substituição homozigota C → T a 7pb na direção 3' após o precursor) na sequência pri-miR-16-1 foi encontrada em dois pacientes. Essa mutação reduz a expressão de miR-16-1 *in vivo* e as células de leucemia linfóide crônica, que expressam esse mutante, exibem redução de miR-16-1 se comparadas com células CD5+. (CALIN ET AL.,2005)

Após a constatação de que a expressão de *miR-15a* e *miR-16-1* está ausente ou reduzida em células da leucemia linfóide crônica, foi hipotetizado que estes dois genes poderiam ter como alvo a expressão de um oncogene desconhecido ou de um fator de sobrevivência essencial para o desenvolvimento desta leucemia. Usando ferramentas de bioinformática, foi descoberto que as seqüências dos miRNA-15a e miRNA-16-1 e a seqüência do *BCL2* RNAm compartilham homologia complementar, o que sugere que a oncoproteína BCL2 pode ser um alvo de repressão pós-transcricional pelos genes miR-15a e miR-16-1 (CIMMINO ET AL.,2005) (figura 6).

Para identificar e comprovar a funcionalidade dos miRNAs miR-15a e miR-16-a, o grupo do Dr. Croce construiu um plasmídeo expressando *miRNA-15a* e *miRNA-16-1* a partir de uma seqüência genômica de 832 pb (CIMMINO ET AL.,2005) (Apêndice A). Essa seqüência incluía os dois miRNAs selvagens (pSR-miR-15/16-WT) além de um plasmídeo contendo miR-16-a com a mutação na posição +7 (substituição C→T) (pSR-miR-16-1-MUT), mutação na na posição +7 a qual havia sido encontrada anteriormente nos dois pacientes com leucemia linfóide crônica. Essa mutação causa a redução da expressão de ambos miRNAs de maneira drástica. Os plasmídeos foram construídos ligando a seqüência relevante em orientação sense a um vetor de expressão mamífero, pSR-GFP-Neo.

Hsa\_BCL2: 3260-TATGGAATATCCAATCCTGTGCTGCTATCC-3290  
 |||||  
 Hsa\_miR-15: GTGTTTGGTAATACACGACGAT-5'  
 Hsa\_miR-16-1: GCGGTTATAAATGCACGACGAT-5'

Figura 6 – miRNAS miR-15a e miR-16-1 e o sítio único de complementaridade miRNA::mRNA.

O constructo selvagem (pSR-miR-15/16-WT) foi transfectado em células MEG-01, que é uma linhagem de células derivada de pacientes de leucemia, com deleção de um alelo e alteração do outro *locus* miR-15a/16-1, além de nenhuma expressão dos genes miR-15a e miR-16-1. O constructo demonstrou reduzir drasticamente a expressão de BCL2 em células transfectadas, em comparação com células MEG-01 selvagem ou células transfectadas com vetor vazio. Para confirmar mais ainda este efeito, o vetor contendo a substituição germline +7 (substituição C→G) (pSR-miR-15/16-1-MUT) foi também transfectado em células MEG-01 e, como esperado, os níveis de BCL2 foram comparáveis com aqueles das células selvagens ou transfectadas com o vetor vazio. Nesse mesmo trabalho do grupo do Dr. Croce, foi confirmado que ambos miR-15a e miR-16-1, e não apenas um deles, influenciam, por um efeito direto, a expressão da proteína BCL2 (complementaridade miRNA::mRNA), ou seja, ambos miRNAs interagem diretamente com a região 3' UTR do *BCL2* mRNA e sem o degradar (CIMMINO ET AL.,2005).

Em 2008, Bonci e colaboradores, em um estudo com câncer de próstata, identificaram que o cluster miR-15a/16-1 tem como alvo não somente o *BCL2*, mas também os genes *CCND1*, que codifica a proteína reguladora do ciclo celular ciclina D1), e *WNT3A*, que promove várias características tumorigênicas na próstata, incluindo sobrevivência, proliferação e invasão (BONCI ET AL.,2008). Adicionalmente, os autores demonstraram que “knockdown” de miR-15a e miR-16-1 promove a proliferação, sobrevivência e invasão de células da próstata não transformadas, indicando, dessa maneira, que a perda desses miRNAs pode ser um evento patogênico relevante na carcinogênese do câncer de próstata (BONCI ET AL.,2008). Em camundongos “nude” imunossuprimidos, a expressão ectópica de miR15a/16-1 causou supressão dramática da tumorigênese, prevenindo o crescimento da leucemia xenográfica (CALIN ET AL.,2008).

## III. Objetivos

### **III. OBJETIVOS:**

#### **1. OBJETIVOS GERAIS:**

Comparar a PA da região associada ao gene *PTCH*, 9q22.3-31, em COO e TOQ.

Investigar a expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 e do *BCL2* em TOQ e o possível impacto desses miRNAs na expressão do *BCL2* na lesão.

#### **2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS:**

- Identificar a PA dos marcadores de microsatélites D9S287, D9S196 e D9S127 no TOQ e no COO.
- Comparar o perfil da PA da região do *PTCH* do COO com a do TOQ.
- Investigar os níveis de expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 e do seu alvo *BCL2* em TOQ.
- Avaliar o efeito da marsupialização sobre a expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1.
- Comparar a expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 em TOQs esporádicos e síndrômicos.
- Avaliar a influência da expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 na transcrição e tradução do *BCL2*.

## IV. Materiais e métodos

## **IV. MATERIAIS E MÉTODOS:**

Com a intenção de melhor apresentar o desenvolvimento da tese, esta foi dividida em dois estudos intitulados:

- (i) Estudo da Perda Alélica do Gene *PTCH* em COO e TOQ  
e
- (ii) Investigação da Expressão de Mir-15a/16-1 e do Gene *BCL2* e o Impacto da Expressão destes miRNAs na Expressão do *BCL2* em TOQ.

### **1. APROVAÇÃO PELO COMITÊ DE ÉTICA**

Os estudos da tese foram apreciados e aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP) sob o parecer número 0214.0.203.000-10 (Anexo A). Um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi obtido dos pacientes participantes. Os experimentos com células humanas de cultura primária de TOQ foram realizados no “Institute of Oral Health Research, University of Alabama at Birmingham” (IOH-UAB), AL, EUA sob os preceitos éticos dessa universidade.

### **2. ESTUDO DA PERDA ALÉLICA DO GENE *PTCH* EM CISTO ODONTOGÊNICO ORTOQUERATINIZADO E TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO**

Sete amostras de COO e sete de TOQ, retiradas do arquivo da faculdade de odontologia da UFMG (FO-UFMG), foram incluídas neste estudo. Os marcadores de microssatélite D9S287, D9S196 e D9S127, localizados na região associada ao gene *PTCH*, no cromossomo 9q, foram investigadas para PA através da técnica de análise de fragmentos (figura 7). Amostras de carcinoma basocelular foram utilizadas como controle positivo da PA na região de interesse. Os resultados deste estudo foi publicado na revista *Journal of Oral pathology & Medicine* e pode ser acessado na livreria online Pubmed (PMID: 21138481).

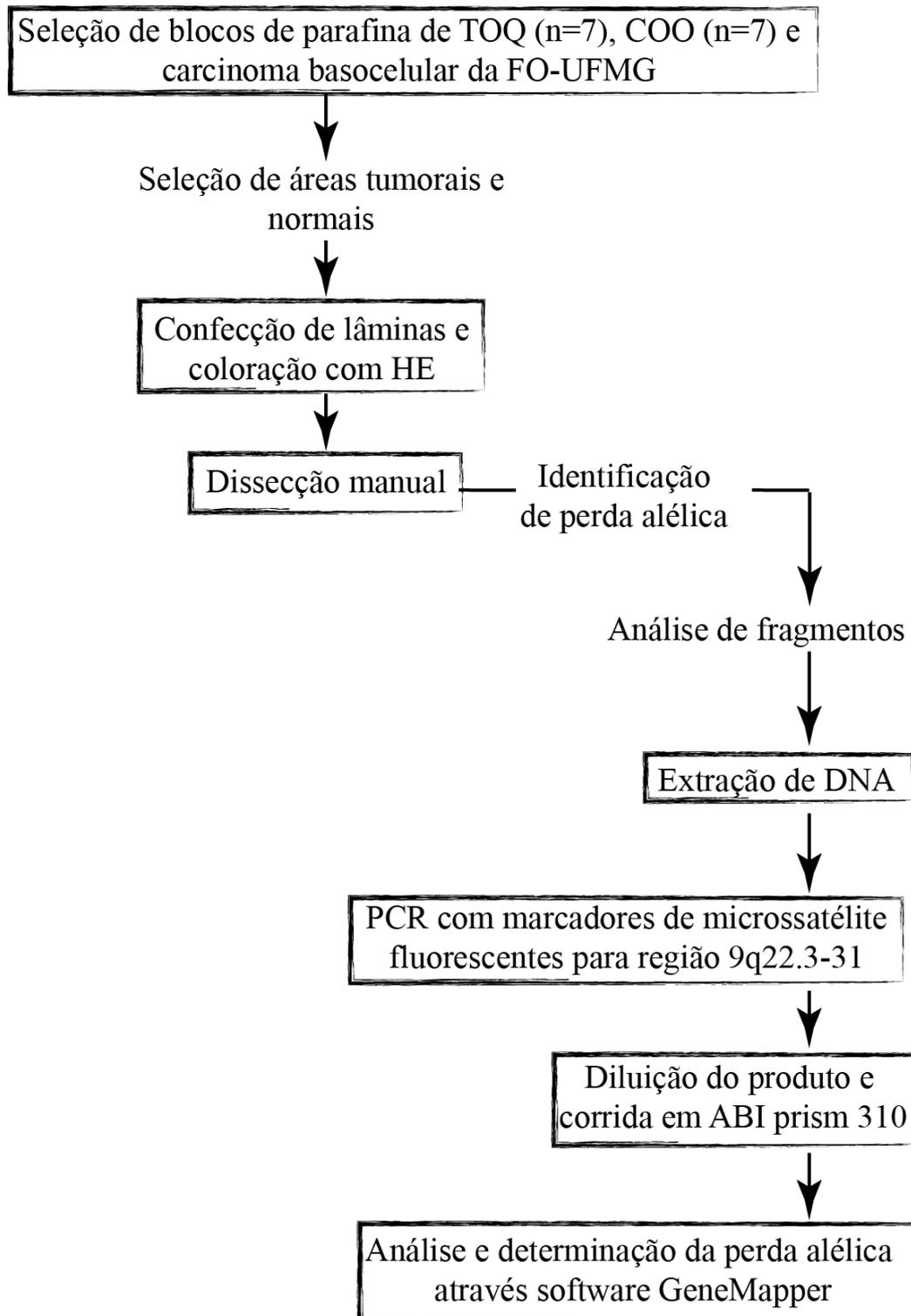


Figura 7 – Mapa conceitual-metodológico do estudo da perda alélica do gene *PTCH* em cisto odontogênico ortoqueratinizado e tumor odontogênico queratocístico.

## **2.1 AMOSTRAS**

Sete amostras de COO e sete de TOQ incluídas em parafina foram selecionadas do arquivo do serviço de Patologia Oral da FO-UFMG. Seções coradas com H&E foram examinadas por um patologista e as áreas tumorais e normais foram apontadas. Fragmentos do epitélio e da cápsula foram obtidos por microdissecção manual (Apêndice B). A microdissecção foi realizada através de uma série de cortes do tecido parafinado de 20 µm de espessura. Três amostras de carcinoma basocelular nevóide foram usadas como controle positivo para a perda alélica em 9q, uma vez que esta lesão apresenta considerável PA nos *loci* utilizados no nosso estudo (HOLMBERG ET AL.,1996; SHEN ET AL.,1999; DANAEE ET AL.,2006).

## **2.2 EXTRAÇÃO DO DNA.**

Os cortes microdissecados foram desparafinizados com xilol e hidratados com etanol graduado. Posteriormente, esse material foi digerido com proteinase K e o DNA genômico foi extraído com DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany), seguindo as recomendações do fabricante. O DNA total foi resuspendido em H<sub>2</sub>O destilada e deionizada, quantificado e armazenado a -20 °C.

## **2.3. ANÁLISES DE FRAGMENTOS**

Para avaliar a PA da região associada ao gene *PTCH*, a técnica de análise de fragmentos foi conduzida para genotipar e analisar regiões de microsatelites. Os seguintes marcadores de microsatelites para múltiplos *loci* genéticos em 9q22.3-31 foram selecionados:

- D9S287 em 9q22.3
- D9S196 em 9q22.3
- D9S127 em 9q31

Para a amplificação da região dos microsatelites selecionados, a PCR foi conduzida utilizando primers marcados com moléculas fluorescentes. Todas as PCRs foram realizadas para o tecido normal e tumoral sob a mesma condição. Uma pequena parte do produto da PCR

(5-10µl) foi corrida em gel de poliacrilamida corado com prata para visualização e confirmação da presença da banda de interesse (bandas de 105 a 267 pb). O produto positivo da PCR foi diluído em H<sub>2</sub>O destilada e deionizada na proporção de 1:3 a 1:80, de acordo com a intensidade da banda. Ao produto diluído, foi acrescentado 0,5 µl de padrão de peso molecular antes de ser alocado para correr em uma ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, Foster City, CA). O tamanho, a quantificação linear e a discriminação dos alelos verdadeiros foram determinados através do software GeneMapper, versão 4.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA). A PA foi calculada utilizando a seguinte razão:

$$\frac{(\text{Altura do alelo curto do tecido normal} / \text{Altura do alelo longo do tecido normal})}{(\text{Alelo do alelo curto do tecido tumoral} / \text{Altura do alelo longo do tecido tumoral})}$$

A perda alélica foi contabilizada quando a altura de um dos alelos do tecido tumoral (epitélio) diminuiu mais de 50% se comparada ao mesmo alelo no tecido normal (capsula) (razão <0,5 ou > 2). Baseada em Van Houten, a correção do “stutter” foi realizada sempre que necessário (VAN HOUTEN ET AL.,2000). Quando o DNA do tecido normal não apresentava dois alelos claramente distinguíveis, o paciente foi considerado não-informativo.

### **3. INVESTIGAÇÃO DA EXPRESSÃO DE MIR-15A/16-1 E DO GENE *BCL2* E O IMPACTO DA EXPRESSÃO DESSES MIRNAs NA EXPRESSÃO DO *BCL2* EM TUMOR ODONTOGÊNICO QUERATOCÍSTICO**

Para investigar a expressão de miR-15a, miR-16-1 e *BCL2* e o impacto desses miRNAs na expressão do *BCL2* em TOQ, a qRT-PCR dos miRNAs miR-15a e do miR-16-1 e *BCL2*, assim como estudos imunohistoquímicos do *BCL2*, foram conduzidos com amostras de TOQ. Adicionalmente, o impacto da expressão transiente de miRNA-15a/16-1 na expressão do *BCL2* foi investigada por meio de estudos *in vitro* utilizando culturas de células primárias de TOQ (figura 8). Os resultados deste estudo foi publicado na revista *Cellular Oncology* e pode ser acessado na livraria online Pubmed (PMID: 22684875).

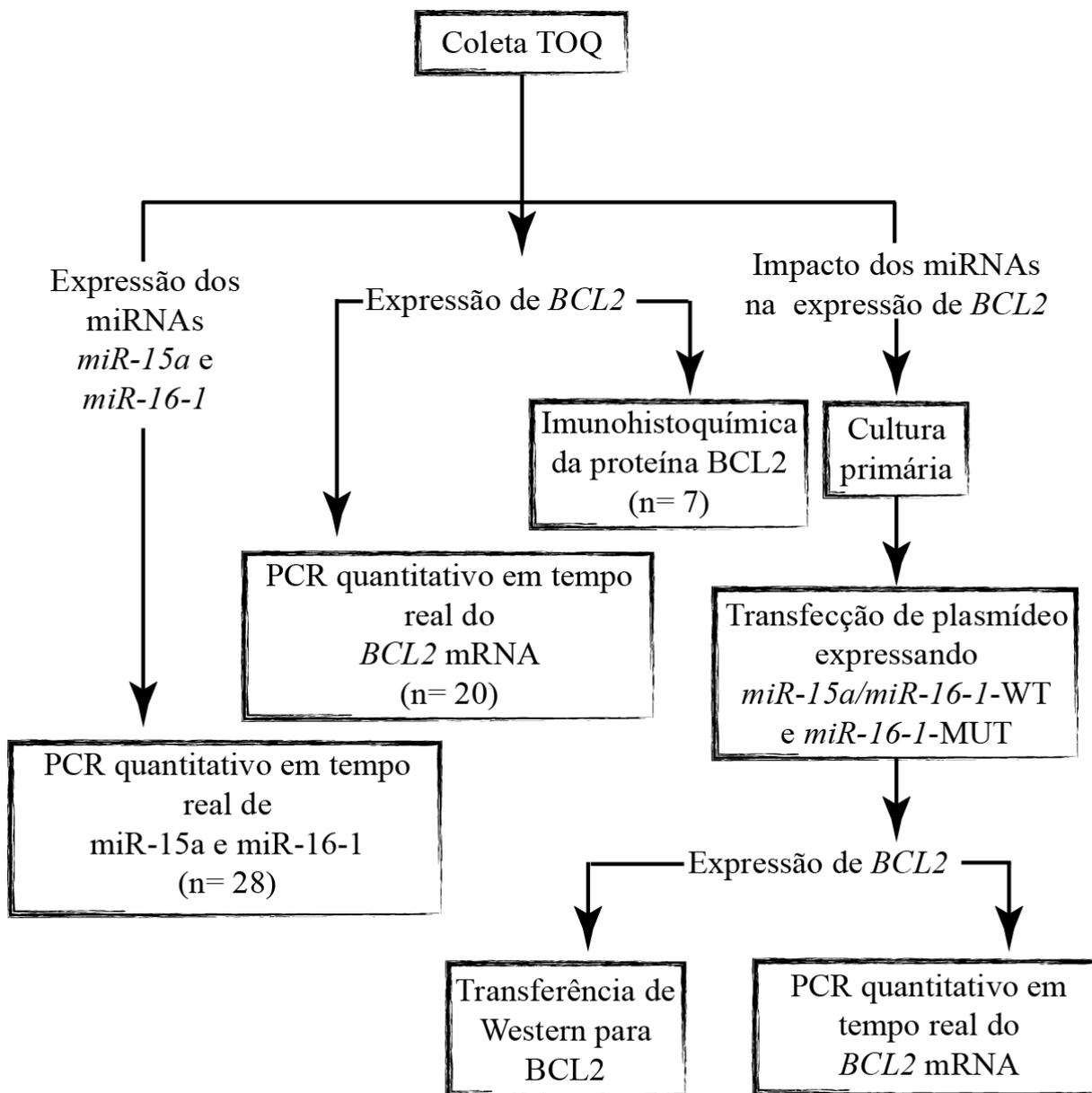


Figura 8 – Mapa conceitual-metodológico do estudo da expressão de *miR-15a/16-1* e do gene *BCL2* e o impacto da expressão desses miRNAs na expressão do *BCL2* em tumor odontogênico queratocístico. Um número diferente de amostras foram usadas na identificação dos níveis de expressão dos miRNAs e do *BCL2*, em TOQ, devido à indisponibilidade de tecido tumoral suficientemente grande.

### 3.1 AMOSTRAS

Um total de 28 amostras de TOQ foram utilizadas no estudo, incluindo 18 cistos marsupializados (7 esporádicos e 11 associados à SCBN) e 10 lesões primárias (1 esporádica e 9 associados à SCBN) de 15 pacientes diferentes, sendo que 7 desses 15 apresentavam a SCBN. Em cada caso, uma porção da lesão foi removida, imediatamente congelada e armazenada a -80°C. Para os estudos de imunohistoquímica e análises histopatológicas, as amostras cirúrgicas foram fixadas em formalina 10% e depois incorporadas em parafina.

### 3.2 CULTURA DE CÉLULAS

Para os estudos *in vitro*, foi utilizada cultura primária de TOQ (KCOT-1) (REN ET AL.,2011). Esta cultura foi estabelecida a partir do componente epitelial do TOQ dissecado manualmente. Os procedimentos seguiram o protocolo de estabelecimento de populações de células orais previamente descrito (MACDOUGALL ET AL.,1998). Em resumo, o tecido epitelial de uma amostra de TOQ foi dissecado, partido e prateado sob lamínulas esterilizadas em meio DMEM, contendo soro fetal bovino a 10%, 100 unidades/ml penicilina e estreptomicina; esse material foi mantido a uma temperatura de 37°C, em ambiente umidificado a 5% CO<sub>2</sub>. Depois das células crescidas e bem estabelecidas, os pedaços de tumores foram retirados e as camadas de células foram removidas com tripsina e expandidas.

### 3.3 PCR QUANTITATIVO EM TEMPO REAL (qRT-PCR)

O RNA total foi isolado das amostras congeladas usando o kit *Tri-Phasis Reagent* (BioAgency, São Paulo, Brasil), segundo recomendações do fabricante, e tratado com *DNAse* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Para a quantificação relativa do mRNA *BCL2*, o cDNA total foi sintetizado com o *Superscript First-Strand Synthesis System kit* (Invitrogen Life Technologies), de acordo com as instruções do fabricante e a análise da qRT-PCR foi realizada usando *TaqMan Gene Expression Assay kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Assay ID: Hs00153350\_m1). Para a quantificação dos miRNAs, foi usado *TaqMan® MicroRNA Assay Kit* (Applied Biosystems, Foster City, CA) (Assays ID: miR-15a: 000389; miR-16-1: 000391). A expressão do *BCL2* foi normalizada com a *ACTB* (controle interno) e

miRNAs ao RNU44 (endógeno). O ciclo do limiar médio (Ct), para duas repetições por amostra, foi utilizada para calcular  $\Delta Ct$ . A quantificação relativa dos miRNAs e do *BCL2* foi calculada com o método  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Como calibrador, foram utilizadas amostras de folículo pericoronário.

Diante dos ensaios da qRT-PCR, em células de cultura, utilizamos o kit *RNeasy Protect Mini Kit* (Qiagen, Valencia CA) para extrair o RNA total e o cDNA foi construído com o kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems Carlsbad, CA), seguindo instruções do fabricante. Para avaliar a quantidade de mRNA *BCL2* em cada grupo, mutante e selvagem, determinou-se a seguinte proporção: Ct *BCL2*/Ct *GAPDH*.

Todas as reações foram feitas em duplicadas e corridas na máquina *Step One* (Applied Biosystems, Foster City, CA).

### 3.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Estudos de imunohistoquímica foram realizados em seções de tecido de 18 TOQ e 5 folículos pericoronários. Brevemente, 4  $\mu m$  de seções embebidas em parafina foram desparafinizadas em xileno e hidratadas com etanol graduado. Indução antigênica por calor foram realizadas em tampão de citrato a 10 mM e pH 6.0, por 30 minutos, em um vaporizador a 96°C. Atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com metanol contendo 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. As seções foram incubadas com anticorpo primário monoclonal anti BCL2 humano (diluição 1:50, Clone 124) (Dako Corp., Carpinteria, CA) por 30 minutos à temperatura ambiente sobre agitação. Posteriormente, as seções foram incubadas com high sensitivity polymer-based system (Dako). Atividade da peroxidase foi revelada com DAB (Sigma, St Louis, MO) com tempo monitorado e usando amostras controle. As seções foram contra-coradas com hematoxilina, desidratada e montadas. Tonsilas embebidas em parafina foram usadas como controle. Um controle negativo nos quais o anticorpo primário foi omitido foi incluído para cada reação. Expressão imunohistoquímica do BCL2 foi avaliada usando microscópio *Olympus BH2* (lentes objetivas de  $\times 10$  ocular e  $\times 40$ ). Uma rede ocular (área 0.092 mm<sup>2</sup>) com 100 pontos compostos de 10 linhas horizontais e 10 verticais foram sobrepostas no campo de teste para contagem. A análise imunohistoquímica do BCL2 foi realizada considerando marcação nuclear e citoplasmática, não importando a intensidade. A pontuação final foi calculada pela porcentagem de células epiteliais positivas em um campo contado (15 campos

para cada espécime). Ao final, as seções foram avaliadas por dois patologistas experientes de forma duplo-cega.

### 3.5 TRANSFERÊNCIA DE WESTERN

A proteína total foi isolada de células de TOQ em cultura em pratos de 12 poços, utilizando tampão RIPA contendo inibidor de protease. Um total de 35 mg de proteína de cada grupo de célula foi aplicado ao mini gel pré fabricado *NuPAGE Novex Bis-Tris* (Invitrogen, Carlsbad, CA) e corrido, segundo recomendações do fabricante. Após a eletroforese, as proteínas foram transferidas para membrana em PVDF, previamente ativada com metanol, em cuba, contendo 1x tampão *NuPage* (Invitrogen, Carlsbad, CA). Posteriormente, a membrana foi incubada com anticorpo BCL2 anti-camundongo (1:500) (Cell Signaling, Danvers, MA), durante a noite, sob agitação e refrigeração. A membrana foi então lavada com *PBS-tween* e incubada com segundo anticorpo IRDye800CW (1:20000) (Li-Cor, Lincoln, NE). Como controle interno de expressão proteica, utilizamos  $\beta$ -actina anti-coelho (1:1000) e anticorpo secundário, IRDye680 (1:20000). A revelação da transferência de Western foi feita através de scanner de dois canais infravermelho (Odyssey Infrared Imaging System) (Li-Cor, Lincoln, NE).

### 3.6 ESTUDO *IN VITRO*

Para testar a hipótese de que os miRNAs miR-15a/16-1 reduzem a expressão do *BCL2* em células de TOQ, obteve-se o vetor p-RetroSuper contendo os genes miR-15a e miR-16-1 (pSR-miR-15-16), o qual foi transfectado em células KCOT-1. Este vetor foi construindo ligando um fragmento contendo a sequência dos miRNAs 15a e 16-1 em um vetor *pSR-GFP-Neo vector* (Apêndice B), gentilmente cedido pelo grupo do Dr. Croce, do “Human Cancer Genetics Program and Department of Molecular Virology, Immunology, and Medical Genetics, Ohio State University”, OH, EUA.

As células KCOT-1 forma cultivadas em pratos de 12 poços e transfectadas com o vetor pSR-miR-15-16 selvagem. Como controle, foi utilizado esse mesmo vetor mutado e incapaz de expressar miRNAs funcionais (CIMMINO ET AL., 2005).

Para assegurar a integridade do vetor pSR-miR-15-16, esse foi clonado, purificado e quantificado e digerido com enzimas específicas para o sítio de clonagem: *EcoRI-HindIII* e

*EcoRI* -*Sall* . A digestão do DNA com estas enzimas geram fragmentos de 287 bp e 302pb, respectivamente, para clones positivos (Apêndice C).

Em um segundo momento, para certificar da presença dos genes que expressam os miRNAs miR-15a/miR-16-1 no vetor pSR-miR-15-16, foi fabricado os primers que franqueiam o sítio de clonagem e sequenciamos o DNA clonado. As sequências foram analisadas e confirmadas (Apêndice D).

O plasmídeo pRS-15a/16-1 foi transfectadas em células KCOT-1 utilizando *FuGENE HD* (proporção 3:2) (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) de acordo com o protocolo do fabricante. As células foram avaliadas quanto à eficiência da transfecção através da visualização indireta da proteína verde fluorescente (GFP) e após dois dias da transfecção, as células atingiram de 60 a 70% de confluência e foram colhidas para isolar o RNA e a proteína total.

## V. Resultados

## V. RESULTADOS:

Os resultados estão apresentados em forma de artigos, que foram divididos em:

artigo 1 - referente ao estudo da perda alélica do gene *PTCH* em COO e TOQ;

artigo 2 - referente à investigação da expressão de mir-15a/16-1 e do gene *BCL2* e ao impacto da expressão desses miRNAs na expressão do *BCL2* em TOQ.

### 1. ARTIGO 1

#### **Evidence of loss of heterozygosity of the *PTCH* gene in othokeratinized odontogenic cyst**

Marina Gonçalves Diniz<sup>a</sup>

Clarice Ferreira Galvão<sup>a</sup>

Paula Macedo Serelli<sup>a</sup>

Carolina Cavaliéri Gomes<sup>b</sup>

Ricardo Santiago Gomez<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, <sup>b</sup>Department of Pathology. Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte-MG, CEP 31270 901, Brazil

\*Corresponding author:

Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry. Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte-MG CEP 31270 901, Brazil

Tel: +55 31 34092477      Fax: +55 31 34092430      email address: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br) (R.S. Gomez)

## Abstract

The orthokeratinized odontogenic cyst (OOC) is an odontogenic cyst of unknown etiology. Clinical, histological and biological differences are reported between odontogenic keratocyst (OKC) and OOC. *PTCH* is a tumor suppressor gene related to Sonic Hedgehog (SHH) pathway important in embryological development. Considering that alterations in this pathway have been described in sporadic and nevoid basal cell syndrome-associated OKC, we tested the hypothesis that OOC is also associated with loss of heterozygosity (LOH) of the *PTCH* gene. Seven samples of OOC and seven of OKC were included in the study. D9S287, D9S196 and D9S127 microsatellite markers located in the region of *PTCH* gene, at chromosome 9q, were investigated for LOH. There was loss in at least one locus in 5/7 OKC and in 4/7 OOC samples. The present finding demonstrates that, despite the existence of clinical, morphological, immunohistochemical and biological behavior differences between OOC and OKC, both harbor similar genetic alterations at 9q.

**Keywords:** orthokeratinized odontogenic cyst; odontogenic keratocyst; Loss of heterozygosity, *PTCH* gene; Sonic Hedgehog pathway

## Introduction

The orthokeratinized odontogenic cyst (OOC) was first described by Schultz<sup>1</sup> in 1927 as a dermoid cyst. On the basis of the definition of the odontogenic Keratocyst (OKC) as a distinct entity by Philipsen<sup>2</sup> in 1956, some authors regarded all keratinizing jaw cyst as a type of OKC.<sup>3</sup> Some investigations have demonstrated significant differences in histological features and clinical behavior between OKC and OOC. While typical OKC is characterized by a uniform lining with a well-developed basal cell layer and a corrugated parakeratinized surface, the OOC lacks these aspects. In contrast to the significant recurrence rate following conventional surgical treatment of OKC, the OOC show little clinical aggressiveness.<sup>4-9</sup> Compared with OKC, expression levels of Ki-67, P63 and BCL-2 was significantly lower in OOC, suggesting a lower proliferative activity and higher apoptotic index.<sup>10-12</sup>

Odontogenic tumors are thought to derive from primordial tooth-forming tissues. The Sonic Hedgehog (SHH) pathway not only participates in odontogenesis, regulating growth and determining the shape of the tooth,<sup>13-15</sup> but is also thought to be involved in odontogenic tumorigenesis as mediator of epithelial–mesenchymal interactions. SHH protein was reported to be expressed in odontogenic epithelium during the early stage of tooth germ initiation,<sup>16</sup> a stage of tooth formation associated as a possible precursor for some odontogenic cysts and tumors. Patched (PTCH) protein is involved in the SHH pathway by repressing the expression of various target genes, including wingless and *PTCH* itself.<sup>17</sup> *PTCH* is mapped to chromosome 9q22.3 and encodes a protein that inhibits the G protein-coupled, Smoothed (SMO), and signal transduction to the SHH pathway. When the extracellular protein SHH is secreted, it binds to PTCH and SMO becomes activated and promotes the activation of full-length GLI proteins. The transcription factor GLI enters the nucleus and promotes transcription of target genes, which results in cellular proliferation.<sup>18,19</sup> Molecular biology studies have demonstrated mutation and loss of heterozygosity (LOH) of the tumor suppressor gene *PTCH* in sporadic and nevoid basal cell syndrome-associated OKC.<sup>20-24</sup>

Despite being considered separate entities, OKC and OOC share some histological similarities, such as the presence of keratin. In the present study the authors prompted to test the hypothesis whether *PTCH* is also the underlining genetic event in OOC. Therefore, LOH of polymorphic markers located at chromosome 9q, near or at *PTCH* gene, was studied for the first time in a set of OOC cases.

## **Materials and Methods**

### **Human tissue**

Seven samples of paraffin-embedded OOC and seven sporadic KOT samples were selected from the files of the Oral Pathology Service. The criteria for the diagnosis of OOC and KOT were described elsewhere (25). Microscopically, all the OOC samples showed a fibrous capsule lined by a keratinized stratified squamous epithelium of varying thickness and containing keratohyalin granules. A prominent palisaded basal layer was not observed (Fig. 1A). All the KOT lesions showed an epithelial lining composed of a uniform layer of stratified squamous with a corrugated parakeratotic surface and a hyperchromatic palisaded basal cell layer (Fig. 1B). H&E-stained sections were examined by a pathologist for the presence of normal and tumor tissue. The epithelium and capsule fragments were obtained by microdissection. Tissue was microdissected from a series of 20- $\mu$ m-thick paraffin-embedded tissue sections under direct visualization using a stereoscopic microscope and a surgical blade.

### **Molecular analysis**

Microdissected tissue was digested with proteinase K and genomic DNA was extracted with DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany). To evaluate allelic loss, a panel of polymorphic microsatellite markers for multiple genetic loci at 9q22-31 was selected for PCR (Table 1). Fluorescent-labeled primers were used yielding PCR products varying from 105 – 267 base pairs. All PCR reactions were performed for tumor and normal tissue under the same conditions. Amplification products were detected using an ABI PRISM 310 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). LOH is calculated as the ratio between short allele normal (Sn)/long allele-normal (Ln) and short allele-tumor (St)/long allele-tumor (Lt), in the formula: (Sn:Ln)/(St:Lt). LOH was scored if one allele was decreased by more than 50% in the tumor sample (cyst) when compared with the same allele in normal tissue (stroma) DNA after stutter correction when necessary<sup>26</sup> (score < 0.5 or > 2). When the control DNA for normal tissue did not display a clear two allele pattern, the patient was considered non informative (NI). Three samples of basal cell carcinoma were used as positive controls for LOH assays on chromosome 9q.

## Results

The results of molecular analysis and the main clinical characteristics of all lesions are shown in table 2. Representative results of LOH at the region containing *PTCH* gene are in figure 2. There was loss in at least one locus in five out of seven OKC and in four out of seven OOC samples. Three out of 4 OOC samples carrying LOH were associated with impacted tooth (samples # 3, 4, and 6). The clinical and radiographic provisional diagnosis of the remaining case of OOC harboring LOH was OKC (sample # 7). The average of informative loci per OOC case was 1.43 (range 1-3).

## Discussion

The OOC is an odontogenic cyst of unknown etiology that occurs predominantly in the posterior segment of the mandible. Morphological comparison of the epithelia lining of OOC and OKC shows some important differences. While OKC has a highly cellular parakeratinized epithelial lining with surface corrugations and a polarized layer of basal cells, the OOC exhibits an onion-skin-like orthokeratin layer, a prominent granular layer beneath the cornified layer, and low cuboidal flattened basal cell layer without tendency of nuclear palisading. In addition, in contrast to the OOC proliferative activity confined to the basal cell layer, OKC shows predominant suprabasal proliferative activity.<sup>8</sup> Finally, OOC has a less aggressive nature than OKC, a lower proliferative activity and higher apoptotic index and is not associated with nevoid basal cell carcinoma syndrome.<sup>5,7,9-12</sup>

Although speculative, the common occurrence of OOC in the posterior mandible together with the high activity of the dental lamina in this area have supported this epithelial source for OOC development. As OKC occurs on the same region of OOC and both show keratinization, they may share a common histogenic origin.<sup>8</sup> Based on this common origin hypothesis and on the fact that *PTCH* gene is altered in OKC.<sup>20</sup> we investigated LOH at chromosome 9q by using short tandem repeat markers flanking *PTCH* in OOC and OKC.

Five out the seven OKC samples presented LOH at the *PTCH* region, in line with previous studies.<sup>21-24</sup> Surprisingly, some OOC cases presented the same alteration. LOH of the *PTCH* gene was previously reported in dentigerous cyst<sup>24,27</sup> and recently, mutations of *PTCH* gene were also reported in calcifying epithelial odontogenic tumor.<sup>28</sup> Additionally, a previous study identifies similar expression of the SHH pathway proteins SHH, PTCH, SMO and GLI in OKCs, OOCs, dentigerous cysts, radicular cysts and ameloblastoma.<sup>12</sup> Therefore,

*PTCH* gene alterations may be a common genetic alteration shared by some odontogenic cysts and tumors, which is in contrast to the initial thought that it is a molecular hallmark of OKC.

SHH pathway was reported to have roles in early odontogenesis.<sup>13-15</sup> SHH is expressed in the early stage of tooth germ<sup>16</sup> as well as in the enamel knot.<sup>29</sup> The importance of SHH in odontogenesis underlies the role of its alterations in the genesis of odontogenic lesions.

Other molecular alterations, such as LOH and methylation have been demonstrated in other chromosomal regions/genes in OKC.<sup>22,30,31</sup> All the evidence is toward OKC multigene tumorigenesis model while *PTCH* gene alterations seem to represent one of multiple molecular alterations.

It is important to note that three OOC samples with LOH at the *PTCH* gene region were associated with impacted tooth, and previous evidence also showed LOH at markers D9S287 and D9S127 in dentigerous cyst.<sup>24,27</sup> Whether some of our OOC samples with LOH associated with impacted tooth were dentigerous cysts that suffered orthokeratinization is a matter of debate.

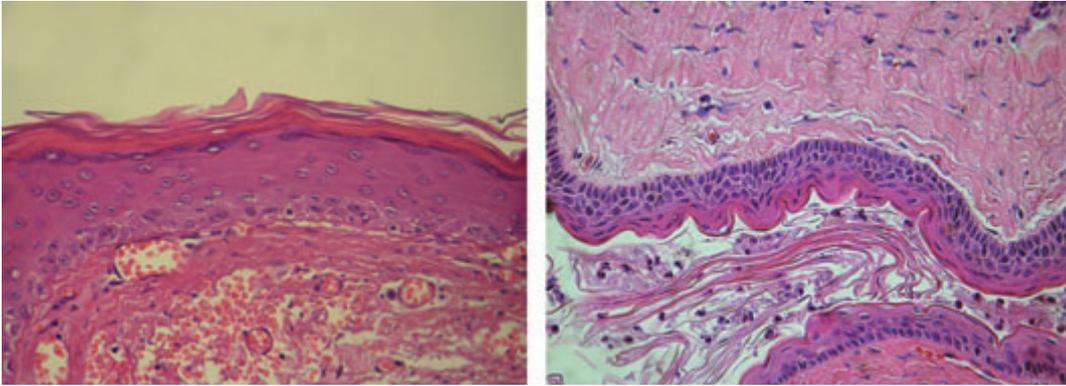
In conclusion, the present study shows LOH at chromosome 9q, flanking *PTCH* gene, in OOC. This fact suggests that *PTCH* gene alterations might not represent a true OKC signature and that some odontogenic lesions may share this genetic alteration during their development.

### **Conflicts of interest statement**

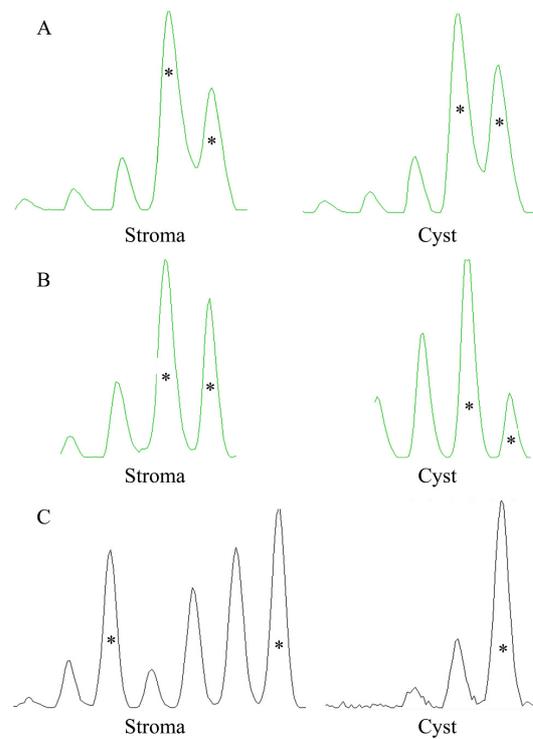
None declared.

### **Acknowledgements**

This study was supported by grants from Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. Dr. RS Gomez is research fellow of CNPq.



**Figure 1** Photomicrograph of a orthokeratinized odontogenic cyst (A) and keratocystic odontogenic tumor (B) included in the study.



**Figure 2** Representative analysis of loss of heterozygosity (LOH) assay in *PTCH* gene region of orthokeratinized odontogenic cyst (OOC). (A) Sample # 3 was heterozygous for marker D9S287, as indicated by the presence of two alleles and no LOH was detected. (B) Cystic DNA of sample # 6 shows loss of the minor allele compared to normal cells (stroma) with marker D9S287 (LOH). (C) The cystic epithelium cells of sample # 3 did not retain one allele of the marker D9S127 compared to normal cells (stroma) (LOH). \* Allele.

**Table 1** Primers pairs used to study polymorphic microsatellite markers for multiple genetic loci encompassing 9q22-31 chromosome region.

Polimorphic marker	Locus	Primer sequences	Type of repetition	Gene involved
D9S287	9q22.3	GCTATGACTTGTTCTGTGACAA CACTACATTGTTCAAGGGTCA	Dinucleotide	<i>PTCH</i>
D9S196	9q22.3	GGTTTTAGTTTGCATTTC CAAACCTGGAATTACAGCACTG	Dinucleotide	<i>PTCH</i>
D9S127	9q31	CCCTCAAATTGCTGTCTAT AGATTGATTGATACAAGGATTTG	Dinucleotide	<i>PTCH</i>

**Table 2** Clinical data and results of LOH in the *PTCH* gene region of seven orthokeratinized odontogenic cyst (OOC) and sporadic odontogenic keratocyst (OKC).

Samples	Diagnosis	Age (Years)	Gender	Site	Marker		
					D9S287	D9S196	D9S127
1	OOC	18	M	Ant Max	Het	NI	NI
2	OOC	19	M	Post Man	Het	NI	NI
3	OOC	42	M	-	Het	NI	LOH
4	OOC	26	M	Post Max	Het	LOH	NI
5	OOC	28	F	Max	Het	NI	Het
6	OOC	35	M	Post Man	LOH	NI	NI
7	OOC	38	M	Post Man	Het	LOH	Het
8	OKC	31	M	Ant Man	NI	NI	LOH
9	OKC	15	M	Post Max	Het	LOH	NI
10	OKC	25	M	Post Man	NI	NI	NI
11	OKC	46	M	Post Man	NI	NI	LOH
12	OKC	17	M	Post Man	LOH	NI	Het
13	OKC	15	M	Post Max	Het	NI	NI
14	OKC	56	F	Post Man	LOH	NI	NI

Abbreviations: M, male; F, female; Ant, anterior; Post, posterior; Man, mandible; Max, maxilla; LOH, loss of heterozygosity; NI, non informative; Het, heterozygote. Samples # 2, 3, 4, 6 and 12 were associated with impacted tooth.

## References

1. Schultz L. Cysts of the maxillae and mandible. *J Am Dent Assoc* 1927; **14**:1395-1402.
2. Philipsen HP. Om keratocyster (Kolesteatom); Kaeberne. *Tandlaegebladet* 1956;**60**:963-81.
3. Wright JM. The odontogenic keratocyst: orthokeratinized variant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1981;**51**:609-18.
4. Cohen MA, Shear M. Comparison of parakeratinized and orthokeratinized primordial cysts (keratocysts). *J Dent Assoc S Afr* 1980;**35**(3):161-5.
5. Vuhahula E, Nikai H, Ijuhin N, Ogawa I, Takata T, Koseki T et al. Jaw cysts with orthokeratinization: analysis of 12 cases. *J Oral Pathol Med* 1993;**22**(1):35-40
6. da Silva MJ, de Souza SO, Corrêa L, Carvalhosa AA, de Araújo VC. Immunohistochemical study of the orthokeratinized odontogenic cyst: A comparison with the odontogenic keratocyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2002;**94**(6):732-7.
7. Thosaporn W, Iamaroon A, Pongsiriwet S, Ng KH. A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma. *Oral Dis* 2004;**10**(1):22-6
8. Li TJ, Kitano M, Chen XM, Itoh T, Kawashima K, Sugihara K et al. Orthokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathological and immunocytochemical study of 15 cases. *Histopathology* 1998;**32**(3):242-51.
9. Vered M, Shohat I, Buchner A, Dayan D. Myofibroblasts in stroma of odontogenic cysts and tumors can contribute to variations in the biological behavior of lesions. *Oral Oncol* 2005;**41**(10):1028-33.
10. Dong Q, Pan S, Sun LS, Li TJ. Orthokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathologic study of 61 cases. *Arch Pathol Lab Med* 2010;**134**(2):271-5.

11. Rangiani A, Motahary P. Evaluation of bax and bcl-2 expression in odontogenic keratocysts and orthokeratinized odontogenic cysts: A comparison of two cysts. *Oral Oncol* 2009;**45**(7):41-4.
12. Vered M, Peleg O, Taicher S, Buchner A. The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts. *J Oral Pathol Med* 2009;**38**(7):597-604.
13. Cobourne MT, Hardcastle Z, Sharpe PT. Sonic hedgehog regulates epithelial proliferation and cell survival in the developing tooth germ. *J Dent Res* 2001;**80**(11):1974-9.
14. Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000;**127**(22):4775-85.
15. Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development* 1998;**125**(15):2803-11.
16. Koyama E, Yamaai T, Iseki S, Ohuchi H, Nohno T, Yoshioka H et al. Polarizing activity, Sonic hedgehog, and tooth development in embryonic and postnatal mouse. *Dev Dyn* 1996;**206**(1):59-72.
17. Von Ohlen T, Lessing D, Nusse R, Hooper JE. Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;**94**(6):2404-9.
18. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;**6**(4):306-17
- 19 Wang Y, McMahon AP, Allen BL. Shifting paradigms in Hedgehog signaling. *Curr Opin Cell Biol* 2007;**19**(2):159-65.

20. Barreto DC, Gomez RS, Bale AE, Boson WL, de Marco L. PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts. *J Dent Res* 2000;**79**(6):1418-22.
21. Pan S, Dong Q, Sun LS, Li TJ. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: modification of the two-hit hypothesis. *Clin Cancer Res* 2010;**16**(2):442-50.
22. Agaram NP, Collins B, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P et al. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocyst are neoplastic. *Arch Pathol Lab Med* 2004;**128**(3):313-7.
23. Levanat S, Gorlin RJ, Fallet S, Johnson DR, Fantasia JE, Bale AE. A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome. *Nat Genet* 1996;**12**(1):85-7.
24. Levanat S, Pavelić B, Crnić I, Oresković S, Manojlović S. Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts. *J Mol Med* 2000;**78**(3):140-6.
25. Neville BW, Damm DD, Allen CM, *Bouquot* JE. Oral and Maxillofacial Pathology. 3th edition Saunders: St Louis. 2009.
26. van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW, Denkers F, Wishaupt RG, Kummer JA et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res* 2000;**6**(10):3803-16.
27. Pavelić B, Levanat S, Crnić I, Kobler P, Anić I, Manojlović S et al. PTCH gene altered in dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med* 2001;**30**(9):569-76.
28. Peacock ZS, Cox D, Schmidt BL. Involvement of PTCH1 mutations in the calcifying epithelial odontogenic tumor. *Oral Oncol* 2010;**46**(5):387-92.
29. Vaahtokari A, Åberg T, Jernvall J, Thesleff I. The enamel knot as a signaling center in the developing mouse tooth. *Mech Dev* 1995;**54**:39-43. Van Den

30. Moreira PR, Guimarães MM, Guimarães ALS, Diniz MG, Gomes CC, Brito JAR et al. Methylation of P16, P21, P27, RB1 and P53 genes in odontogenic keratocysts. *J Oral Pathol Med* 2009;**38**(1):99-103.

31. Henley J, Summerlin DJ, Tomich C, Zhang S, Cheng L. Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases. *Histopathology* 2005;**47**(6):582-6.

## 2. ARTIGO 2

### miR-15a/16-1 influences *BCL2* expression in keratocystic odontogenic tumors

Marina Gonçalves Diniz<sup>1</sup>

Carolina Cavaliéri Gomes<sup>2</sup>

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

André Luiz Sena Guimarães<sup>3</sup>

Alfredo Maurício Batista De Paula<sup>3</sup>

Hope Amm<sup>4</sup>

Chanchung Ren<sup>4</sup>

Mary MacDougall<sup>4</sup>

Ricardo Santiago Gomez<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, <sup>2</sup> Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil.

<sup>3</sup> Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, MG, Brazil.

<sup>4</sup> University of Alabama at Birmingham, School of Dentistry, Institute of Oral Health Research, Birmingham, AL, USA

\*Corresponding author:

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Department of Oral Surgery and Pathology/School of Dentistry - Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos, 6627 - Belo Horizonte - MG - Brasil CEP 31270 901

Tel: +55 31 34092477 Fax: +55 31 34092430 [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br)

## Abstract

*Background:* A keratocystic odontogenic tumor (KCOT) is a benign destructive recurrent odontogenic cystic neoplasm. The microRNAs (miRNAs) miR-15a and miR-16-1 function as negative regulators of the anti-apoptotic gene *BCL2* at the post-transcriptional level. Notably, high Bcl-2 immunoexpression is found in the epithelial lining of KCOTs, while the loss of Bcl-2 immunopositive cells is observed in marsupialized cysts. The purpose of this study was to investigate whether the transcription of miR-15a and miR-16-1 is altered in KCOTs and whether it is associated with *BCL2* gene expression in such lesions.

*Methods:* Using qRT-PCR and immunohistochemical analyses, we examined miR-15a/16-1 and *BCL2* gene expression in KCOTs. The impact of miR-15a/16-1 expression on *BCL2* gene translation was investigated by *in vitro* studies using primary KCOT culture cells.

*Results:* Using qRT-PCR, we observed miR-15a and/or miR-16-1 downregulation in the majority of the KCOT samples (24 of 28). We also observed higher *BCL2* mRNA expression in 19 of 20 KCOT frozen samples and moderate to high Bcl-2 immunopositivity in the basal layer cells of 16 of 18 paraffin embedded KCOTs (median: 42.6%). *In vitro* over-expression of miR-15a/16-1 in human KCOT-1 primary cell cultures resulted in a decrease in Bcl-2 protein expression. Furthermore, all five paired KCOTs collected before and after marsupialization treatment exhibited an increase in miR-15a after the procedure.

*Conclusions:* Our results suggest that KCOT neoplastic cells demonstrate an anti-apoptotic profile that may be related to lower miR-15a/16-1 expression. Additionally, we demonstrated that miRNA expression increases after marsupialization, implicating an etiological and therapeutic role of miRNAs in KCOT.

**Key words:** odontogenic keratocyst, keratocystic odontogenic tumor, *BCL2*, microRNA, miR15a/16-1

## 1 Introduction

A keratocystic odontogenic tumor (KCOT) is an aggressive benign neoplasm with a putative high recurrence rate and extensive local invasion [1]. KCOTs may occur in isolation or in association with nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS). The sporadic KCOT incidence rate was estimated to be 0.61 to 3.50 per million per year depending on sex and race [2], and the frequency in different studies over 26 years varies from 1.5 to 21.8% of the total number of odontogenic cysts [3]. The estimated NBCCS prevalence varies from 1/57,000 to 1/256,000, and 90% of the affected individuals develop KCOTs [4]. KCOT treatment includes marginal resection, enucleation with peripheral ostectomy or the use of Carnoy's solution, and marsupialization, a procedure that converts the cyst into a pouch, thereby exposing the lining to the oral environment. Marsupialization is effective as a preliminary treatment for large KCOTs because it is highly successful in decreasing the size of the tumor before definitive surgery [5,6].

KCOTs are thought to arise from the dental lamina epithelium. Genetic and epigenetic alterations have been reported in this disease [7]. Increased expression of the anti-apoptotic protein Bcl-2 has been described in KCOTs [8,9]; however, the relevance of this finding has not been appropriately addressed. The *BCL2* gene is an important proto-oncogene located on chromosome 18q21.3 that encodes for a protein capable of halting apoptosis, thus facilitating cell survival independently of cell division [10,11]. The Bcl-2 protein is thought to be involved in resistance to conventional anti-cancer drugs treatments [12], and its increased expression has been implicated in a number of malignancies [13]. Several mechanisms that can lead to increased *BCL2* gene expression have been identified, including chromosomal translocations, hypermethylation, and the loss of miRNAs that normally downregulate *BCL2* gene expression [14,15,16].

miRNAs regulate the expression of complementary messenger RNAs (mRNAs) and have been linked to human tumorigenesis [17,18]. In animals, single-stranded miRNAs bind to specific mRNAs through imperfect complementary sequences. The bound mRNAs remain untranslated, resulting in reduced levels of the corresponding protein, or are degraded, resulting in reduced levels of the corresponding mRNAs. The miR-15a/16-1 miRNA cluster was shown to induce apoptosis by targeting the important anti-apoptotic gene *BCL2* at the post-transcriptional level [14]. Therefore, miR-15a and miR-16-1 are natural antisense *BCL2* interactors that act as tumor suppressors.

Given the role of miR-15a/16-1 in *BCL2* gene expression modulation, we hypothesized that altered miRNA expression may act to regulate *BCL2* gene expression in KCOTs. To date, no study has addressed the pathogenesis of KCOTs at the miRNA level.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Human KCOT

This study was approved by the appropriate ethics committee on human research, and informed written consent was obtained from all subjects. A total of 28 KCOTs were retrieved from 15 patients (8 with sporadic KCOT and 7 with NBCCS). The lesions included 18 marsupialized KCOT cases (7 sporadic and 11 NBCCS-associated) and 10 cases with primary lesions (1 sporadic and 9 NBCCS-associated) (Table 1). The age of the patients ranged from 14 to 50 years, and the male to female ratio was 2.75:1. The posterior mandible was the most commonly affected area (50%), followed by the posterior maxilla (27%). In all cases, a portion of the lesion was resected, immediately snap frozen, and stored at -80°C. For the immunohistochemistry and histopathological analyses, surgical samples were fixed in formalin and paraffin embedded. Some fragments were too small to perform all the experiments, resulting in different sample numbers for each method employed (Table 1).

### 2.2 Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on tissue sections from 18 of the KCOTs. Five dental follicles were used as control tissues for comparison. Briefly, 4 µm paraffin-embedded sections were dewaxed in xylene and hydrated with a graded ethanol series, followed by antigen retrieval in 10 mM citrate buffer, pH 6.0, and inhibition of endogenous peroxidase activity. The tissue sections were incubated with primary mouse anti-human Bcl-2 (1:50) (Clone 124; Dako, Carpinteria, CA) for 30 min, followed by incubation in Envision System (Dako). The immunostain was developed using DAB (Sigma, St Louis, MO) and counterstained with hematoxylin. Formalin-fixed, paraffin-embedded tonsils served as positive controls. Negative controls, in which the primary antibody was omitted, were included in each reaction. The immunohistochemical expression of the Bcl-2 was evaluated using an ocular lattice (area 0.092 mm<sup>2</sup>), with 100 fields composed of 10 horizontal and 10 vertical test lines superimposed on the test field to be measured. Fifteen random fields were

selected in the tissue sections obtained for each specimen, and the percentage of positively stained epithelial cells was calculated to obtain the final score. The immunostaining scoring method was semi-quantitative and was defined as follows: negative (0%), mild (10-20% positive cells), moderate (>20-50%), and high positivity (>50%) [8]. Nuclear and cytoplasmic staining was considered regardless of the intensity.

### 2.3 RNA isolation and quantitative reverse transcription (qRT-PCR)

To perform RNA extractions, frozen tumors were dissected using cryostat sections to ensure that the samples were enriched with epithelial cells. The total RNA was isolated from the samples using the Tri-Phasis Reagent (BioAgency, São Paulo, Brazil) and treated with DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). Twenty-eight KCOT samples were subjected to miRNA quantification using the TaqMan® MicroRNA Assay Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) (Assays ID: miR-15a: 000389; miR-16-1: 000391). The miRNA expression was normalized to RNU44. For *BCL2* mRNA quantification, the cDNA of 20 frozen samples was synthesized using the Superscript First-Strand Synthesis System kit (Invitrogen Life Technologies), and qRT-PCR analyses were performed using the TaqMan® Gene Expression Assay kit (Applied Biosystems) (Assay ID *BCL2*: Hs00153350\_m1). The *ACTB* gene was used as internal control (P/N 4326315E). Relative quantification was calculated by the  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  method, and dental follicle samples were used for calibration. To isolate RNA from the confluent primary cell cultures, the RNeasy Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) was used. Total DNase-treated RNA was reverse transcribed into cDNA using the iScript™cDNA Synthesis Kit (Bio-Rad, Hercules, CA). To quantify *BCL2* mRNA expression, the RT<sup>2</sup> qPCR Primer Assay for human *BCL2* (SABiosciences, Frederick, MD) and SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) were used. The *ACTB* gene was used as an internal control (SABiosciences). All qRT-PCR reactions were performed in duplicate and run on a Step One machine (Applied Biosystems)

### 2.4 KCOT-1 Cell Population and *In vitro* study

The KCOT-1 primary cell culture line that we used was derived from an epithelial tumor component and had been previously established [19]. The pRS-15a/16-1 plasmid, which was created by ligating the miR-15a/16-1 sequence into the pSR-GFP-Neo vector [14], was transfected into KCOT-1 cells using FuGENE HD at a 3:2 ratio (Roche Applied Science,

Mannheim, Germany) according to the manufacturer's protocol. Direct sequencing plus GFP expression was used to confirm pSR-miR-15-16 plasmid expression in the cells. KCOT-1 cells that were transfected with mutant pRS-15a/16-1, thus expressing reduced miR-15a/16-1 levels, were used as a control [14]. The experiments were conducted 48 hours after transfection. *In vitro* studies were performed in two independent experiments.

## 2.5 Western blotting

Total protein was isolated using RIPA buffer, and its concentration was determined using the BCA protein assay (Pierce Biotechnology, Rockford, IL). The protein was electrophoresed using a NuPAGE Novex Bis-Tris gel (Invitrogen, Carlsbad, CA) and transferred to a PVDF membrane (Millipore, Bedford, MA). The membrane was blocked in Odyssey blocking buffer (LI-COR, Lincoln, NE) and incubated with a Bcl-2-specific antibody (1:500) (Cell Signaling, Danvers, MA) overnight. Secondary antibodies that were conjugated to IRDye680 and IRDye800CW (1:20,000) (LI-COR) were used to probe the Bcl-2 and  $\beta$ -actin primary antibodies. Blotted proteins were detected using the Odyssey infrared imaging system (LI-COR). The anti- $\beta$ -actin antibody (1:1000) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) was used as a normalizer. The band intensity was quantified using image analysis software, and the ratio was used to compare relative expression.

## 2.6 Statistical analysis

Non-parametric Mann-Whitney U and Wilcoxon's tests were performed to compare miRNA, mRNA and immunostaining profiles in unpaired and paired samples, respectively. Correlations between the variables were analyzed using Spearman's rank test.  $P < 0.05$  was considered statistically significant. These tests were performed using the BioEstat software, version 4.0 (Belém, Brazil).

# 3 Results

## 3.1 miR-15a and miR-16-1 had lower expression in KCOTs

To verify the expression of miR-16-1 and miR-15a, the natural antisense regulators of the *BCL2* gene, in KCOTs, cDNA from 28 samples were analyzed by qRT-PCR. The

expression levels of the miRNAs in KCOT were correlated ( $p = 0.009$ ; Spearman's coefficient = 0.48), confirming that miR-15a and miR-16-1 are located in a cluster. Our data show that 22 and 11 out of 28 KCOT samples showed lower miR-16-1 and miR-15a expression, respectively. Taken together, 85% of the KCOT samples (24/28; 9/10 primary, 15/18 marsupialized, 7/8 sporadic and 17/20 NBCCS-associated KCOTs) exhibited lower miR-16-1 and/or miR-15a expression compared to dental follicles (Fig. 1). The fold-change decrease of miR-16-1 and miR-15a expression (log RQ) ranged from -1.4 to -0.003 and -1.6 to -0.001 respectively. No statistically significant differences were found for the miRNA expression in sporadic tumors when compared with those associated with NBCCS.

### 3.2 miRNAs are differentially expressed in KCOTs treated with the marsupialization procedure

Five KCOT sample pairs were collected before (primary) and after the marsupialization procedure (Table 1). The expression of miR-15a and miR-16-1 was investigated in each paired sample. All cases exhibited increased levels of miR-15a expression after marsupialization ( $p = 0.04$ ) (Fig. 1), while 4 of those cases exhibited increased levels of miR-16-1 expression ( $p = 0.22$ ). The expression of Bcl-2 in the only paired case with available tissue demonstrated a reduction in protein expression after marsupialization (Bcl-2 positive cells: primary cyst = 45.01%; marsupialized cyst = 37.24%).

### 3.3 The *BCL2* gene is highly expressed in KCOT tissue samples

Because the *BCL2* gene is a putative target of miR-16-1 and miR-15a, we investigated its expression in KCOTs and compared it to that in dental follicle tissue. We performed qRT-PCR on 20 frozen KCOT samples and immunohistochemistry on 18 paraffin-embedded KCOT tissues. All but one KCOT sample exhibited higher levels of *BCL2* mRNA expression compared to the dental follicles (Fig. 2). Additionally, all but two KCOTs showed moderate to high Bcl-2 positivity, particularly in the basal layer (median: 42.6%), while no dental follicle samples showed Bcl-2 immunostaining (Fig. 2). Differences in the *BCL2* gene expression among the distinct clinical groups (sporadic versus NBCCS-associated; primary versus marsupialized) were not statistically significant. No statistical correlation was found between the mRNA *BCL2* and immunohistochemical expression of Bcl-2 ( $p = 0.49$ ).

### 3.4 The over-expression of miR15a/16-1 leads to a decrease in Bcl-2 protein expression in KCOT-1 cells

To assess whether miR-15a/16-1 regulate the *BCL2* gene in KCOT-1 cells, we transfected a pSR-GFP-Neo vector expressing wild type miR-15a/16-1 (pSR-15a/16-1) into a primary KCOT-1 cell culture line. After a 48 h incubation in two independent experiments, a lower expression of Bcl-2 protein in KCOT-1 cells expressing wild-type miRNAs was observed (mean OD ratio =  $0.73 \pm 0.14$ ) (Fig. 3). Nonetheless, equal *BCL2* mRNA levels were found in both groups of KCOT-1-transfected cells (Ct ratio = 1.3) (Fig. 3). A transfection with a mutant vector was used as control.

## 4 Discussion

The inhibition of apoptosis is regarded as one of the most important steps in tumorigenesis because it allows genetically unstable cells to survive and accumulate additional mutations that eventually lead to neoplasias. The miR-15a/16-1 cluster, which targets the *BCL2* gene, demonstrates that miRNA genes play an important role in regulating apoptosis [20]. In this study, we examined, for the first time, the miR-15a and miR-16-1 miRNAs in a series of KCOTs. We also assessed *BCL2* gene expression at the mRNA and protein levels. We demonstrated a lower miRNA expression in KCOTs together with a higher Bcl-2 immunoexpression compared with the miRNA and Bcl-2 expression in dental follicle tissue. We also showed lower miRNA expression in cysts after the marsupialization procedure. Moreover, we provided evidence showing that miR-15a/16-1 expression in KCOT-1 primary cultures promoted down-regulation of the *BCL2* gene at the post-transcriptional level. Our study is the first to show an epigenetic mechanism (miRNAs) that might lead to the regulation of *BCL2* gene expression in KCOTs, implying an etiological and therapeutic role for miRNAs.

In our study, we demonstrated low miR-15a and/or miR-16-1 expression in frozen KCOT samples and high *BCL2* gene expression in sporadic and NBCCS-associated KCOTs. Abundant Bcl-2 immunoexpression has been reported in the epithelial lining of sporadic KCOTs [9, 21]. A previous report found a similar pattern of Bcl-2 immunoexpression in NBCCS-associated and sporadic KCOTs; however, this previous study relied only on immunohistochemical assays [8]. In this study, we presented similar *BCL2* mRNA and miR-15a/16-1 transcription levels in NBCCS-associated KCOTs compared to sporadic KCOTs. It

is important to note that we found no statistical correlation between *BCL2* mRNA and protein expression, which may suggest that post-transcriptional mechanisms, such as those mediated by miRNAs, could be potential *BCL2* gene expression regulators in KCOTs. It was first noted in *C. elegans* that miRNAs have the capacity to inhibit the translation of their target mRNA at a post-initiation step without reducing mRNA abundance [22], which results in discrepancies between mRNA and protein expression. Other miRNAs, such as miR-195, miR-24-2 and miR-365-2, were also reported to be able to negatively regulate the anti-apoptotic protein Bcl-2 by directly binding to their respective binding sites in the 3'-UTR of the mRNA *BCL2* [23].

Next, we tested whether miR-15a/16-1 is capable of modulating *BCL2* gene expression in the primary KCOT-1 cell population. To express miR-15/16-1 in KCOT-1 cells, we used the pSR-15a/16-1 vector expressing wild type miRNA or mutant miRNA. The wild type pSR-15a/16-1 vector was previously described and shown to considerably reduce the *BCL2* mRNA levels in a leukemia-derived cell line in comparison with cells transfected with an empty vector and the mutant form of pSR-15a/16-1 [14]. Compared to the control, we observed, in two independent experiments, a slight reduction in Bcl-2 expression in KCOT-1 cells over-expressing wild type miR-15a/16-1. Our results imply that miR-15a/16-1 is able to modulate *BCL2* gene expression in KCOT-1 cells and may be an important therapeutic molecule; however, other mechanisms in addition to miR-15a/16-1 miRNA misregulation may also be related to the *BCL2* over-expression frequently observed in KCOTs and need to be investigated. miR-15a/16-1 down-regulation was also reported in B cell chronic lymphocytic leukemia, chronic lymphocytic lymphoma, pituitary adenoma, prostate cancer and non-small cell lung cancer [20, 24-26]. Other genes in addition to *BCL2* were also shown to be targets of miR-15a/16-1, including *CCND1*, *WNT3A*, *CCNE1*, *CCND3*, *CDK4* and *CDK6* [25, 26, 27, 28].

Marsupialization is a procedure that converts the cyst into a pouch, thereby exposing the lining to the oral environment. Such a technique is commonly used at least as an initial step in KCOT treatment and frequently results in cyst regression, capsule thickening and, in some cases, resolution of the KCOT [5,6]. Studies of the mechanism behind the influence of marsupialization on the cyst capsule could provide molecular tools for KCOT treatment. In our study, we compared all of the marsupialized KCOTs collected with all of the primary tumors and noticed an overall reduction in Bcl-2 immunoexpression after marsupialization (median: primary = 47%; marsupialized = 39%), although the medians were not significantly different. Decreased Bcl-2 protein expression in marsupialized KCOTs has been previously reported [29]. We also compared the miRNA expression in five paired KCOT samples

collected before and after marsupialization and observed increased expression of miR-15a (5 of 5) and miR-16-1 (4 of 5) after the marsupialization procedure. From our data, one exciting hypothesis is that the apparent reduction in Bcl-2 expression observed in marsupialized cysts is due to the increased expression of Bcl-2 antisense miRNAs.

In conclusion, our results suggest an anti-apoptotic profile for KCOT epithelial cells and that the lower miR-15a/16-1 expression may be related to this characteristic. We also demonstrated that miRNA expression increases after marsupialization.

### **Acknowledgements**

Grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil, and the Institute of Oral Health Research at the University of Alabama at Birmingham (UAB-SOD/IOHR), USA, funded this study. We thank Dr. George Calin who provided the pSR-15/16 vectors.

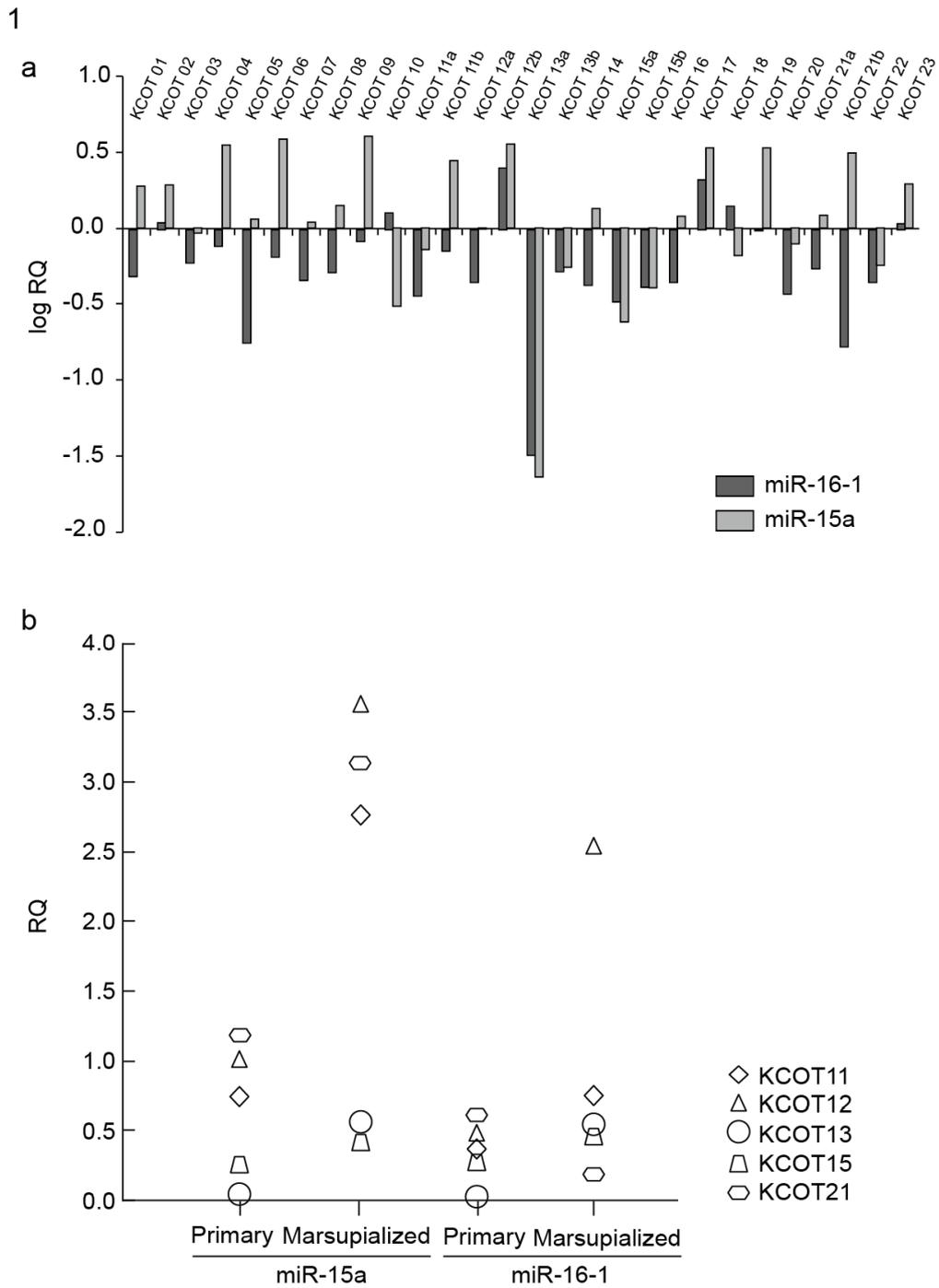
### **Conflict of interests**

The authors declare that they have no conflict of interests.

Table 1. Patients, clinical features and methods used in each case.

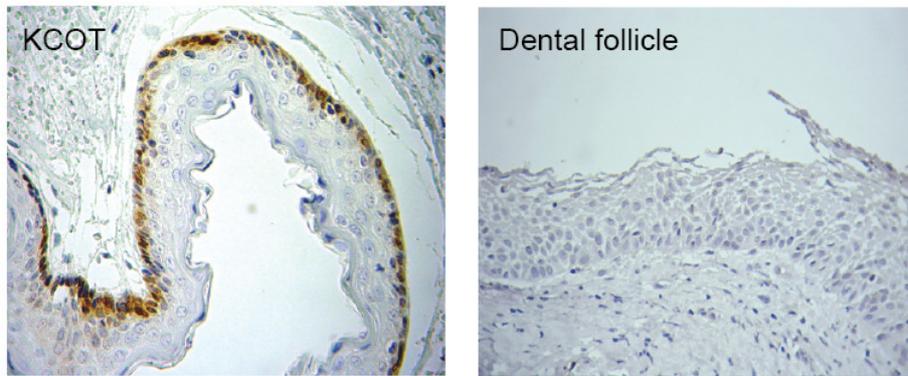
Case/ Patient #	Nature	Samples	Clinical feature	qRT- PCR miRNAs	qRT- PCR BCL2	IHC
1	Sporadic	KCOT01	Marsupialized	+	+	
2	Sporadic	KCOT02	Marsupialized	+		
3	Sporadic	KCOT03	Marsupialized	+	+	
4	Sporadic	KCOT04	Marsupialized	+	+	+
5	Sporadic	KCOT05	Primary	+	+	
6	Sporadic	KCOT06	Marsupialized	+	+	
7	Sporadic	KCOT07	Marsupialized	+	+	+
8	Sporadic	KCOT08	Marsupialized	+	+	
9	NBCCS	KCOT09	Primary	+	+	+
		KCOT10	Primary	+	+	+
10	NBCCS	KCOT11 <sup>a</sup>	Primary	+		+
		KCOT11 <sup>b</sup>	Marsupialized	+		+
		KCOT12 <sup>a</sup>	Primary	+	+	
		KCOT12 <sup>b</sup>	Marsupialized	+		+
		KCOT13 <sup>a</sup>	Marsupialized	+	+	+
		KCOT13 <sup>b</sup>	Primary	+	+	
		KCOT14	Marsupialized	+		+
11	NBCCS	KCOT15 <sup>a</sup>	Primary	+		
		KCOT15 <sup>b</sup>	Marsupialized	+	+	+
12	NBCCS	KCOT16	Primary	+	+	+
		KCOT17	Primary	+		+
13	NBCCS	KCOT18	Marsupialized	+	+	+
		KCOT19	Marsupialized	+	+	+
		KCOT20	Marsupialized	+	+	+
14	NBCCS	KCOT21 <sup>a</sup>	Primary	+	+	+
		KCOT21 <sup>b</sup>	Marsupialized	+		
15	NBCCS	KCOT22	Marsupialized	+	+	+
		KCOT23	Marsupialized	+	+	+

<sup>a,b</sup>, Samples collected before and after the marsupialization procedure; NBCCS: patients diagnosed with nevoid basal cell carcinoma syndrome; IHC: immunohistochemistry.

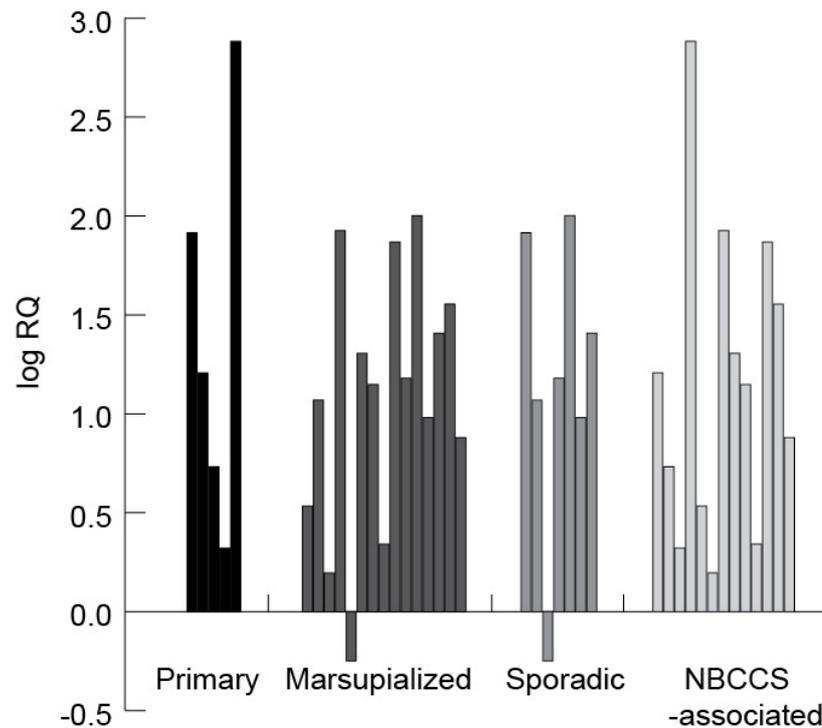


**Fig. 1** qRT-PCR showing miR-15a/16-1 expression. (a) Twenty-four of the 28 investigated KCOT samples showed lower miR15a and/or miR16-1 expression levels compared with those of dental follicles (x-axis). Every two bars correspond to the miR-16-1 and miR-15a expression in a single sample. (b) All cases exhibited increased levels of miR-15a expression after the marsupialization procedure ( $p = 0.04$ ), while four of the cases exhibited increased of miR-16-1 expression levels ( $p = 0.22$ ). Each paired sample (before and after marsupialization) is represented by different shapes. RQ: relative quantification.

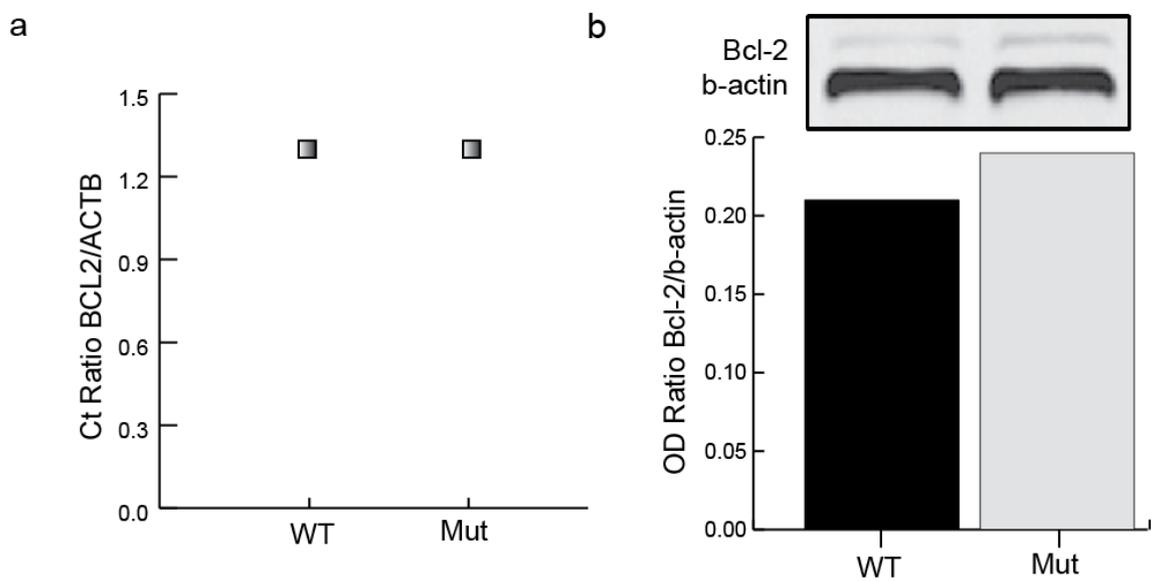
a



b



**Fig. 2** Analysis of *BCL2* mRNA and protein expression in KCOT samples. (a) Strong Bcl-2 immunopositivity was observed in the basal layer cells of the KCOT lining, while dental follicles exhibited no Bcl-2 immunopositivity. (The slides were stained with diaminobenzidine and counterstained with Mayer's hematoxylin, magnification 400x). (b) All but one of the KCOTs showed high *BCL2* mRNA expression levels compared with the dental follicles (calibrator). RQ: relative quantification



**Fig. 3** Bcl-2 protein expression in primary KCOT-1 cells expressing a wild-type or mutant miR-15a/16-1 vector. (a) KCOT-1 cells transfected with vectors encoding wild-type (WT) and mutant (Mut) miRNAs demonstrated equal *BCL2* mRNA levels. (b) The over-expression of wild-type miRNAs in KCOT-1 cells decreased Bcl-2 protein translation.

## References

1. H.P. Philipsen, in World Health Organization classification of tumours Pathology and genetics of head and neck tumours, ed. By L. Barnes et al (IARC Press, Lyon, 2005), p. 306
2. C.C. Rachanis, M. Shear, Age-standardized incidence rates of primordial cyst (keratocyst) on the Witwatersrand. *Community Dent Oral Epidemiol.* **6**, 296-9 (1978)
3. M. Shear & P.M. Speight in *Cysts of the Oral and Maxillofacial Regions* (Blackwell Munksgaard, Oxford, 2007), p. 8
4. L. Lo Muzio L. Nevoid basal cell carcinoma syndrome (Gorlin syndrome). *Orphanet J Rare Dis.* **3**:32 (2008)
5. N. Nakamura, T. Mitsuyasu, Y. Mitsuyasu, T. Taketomi, Y. Higuchi, M. Ohishi, Marsupialization for odontogenic keratocysts: long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* **5**, 543-53 (2002)
6. M.A. Pogrel, Decompression and marsupialization as a treatment for the odontogenic keratocyst. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* **3**, 415-27 (2003)
7. C.C. Gomes, M.G. Diniz, R.S. Gomez, Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol.* **12**, 1011-4 (2009)
8. L. Lo Muzio, S. Staibano, G. Pannone, P. Bucci, P.F. Nocini, E. Bucci, G. De Rosa, Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *J Dent Res.* **7**, 1345-53 (1999)
9. A. Piattelli, M. Fioroni, C. Rubini, Differentiation of odontogenic keratocysts from other odontogenic cysts by the expression of bcl-2 immunoreactivity. *Oral Oncol.* **5**, 404-7 (1998)
10. D. Hockenbery, G. Nuñez, C. Milliman, R.D. Schreiber, S.J. Korsmeyer, Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* **6299**, 334-6 (1990)

11. D.L. Vaux, S. Cory, J.M. Adams, Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. **6189**, 440-2 (1988)
12. Y. Pommier, O. Sordet, S. Antony, R.L. Hayward, K.W. Kohn. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*. **16**, 2934-49 (2004)
13. T.G. Cotter, Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. **7**, 501-7 (2009)
14. A. Cimmino, G.A. Calin, M. Fabbri, M.V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S.E. Wojcik et al., miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **39**, 13944-9 (2005). Erratum in: *Proc Natl Acad Sci U S A*. **103**, 2464 (2006)
15. M. Hanada, D. Delia, A. Aiello, E. Stadtmauer, J.C. Reed, bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. **6**, 1820-8 (1993)
16. Y. Tsujimoto, L.R. Finger, J. Yunis, Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. *Science*. **4678**, 1097-9 (1984)
17. V. Ambros, The functions of animal microRNAs. *Nature*. **7006**, 350-5 (2004)
18. C.C. Gomes, R.S. Gomez RS, MicroRNA and oral cancer: Future perspectives. *Oral Oncol*. **10**, 910-914 (2008)
19. C. Ren, M.G. Diniz, C. Piazza, H.M. Amm, D.L. Rollins, H. Rivera, P. Devilliers et al., Differential enamel and osteogenic gene expression profiles in odontogenic tumors. *Cells Tissues Organs*. **194**, 296-301 (2011)
20. R.I. Aqeilan, miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death and Differ*. **17**, 215–220 (2010)
21. K. Kimi, H. Kumamoto, K. Ooya, K. Moteg, Analysis of apoptosis-related factors and apoptotic cells in lining epithelium of odontogenic keratocysts. *Oral Med Pathol*. **5**, 35-40 (2000)

22. P.H. Olsen, V. Ambros. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol.* **2**:671-80 (1999)
23. R. Singh, N. Saini. Downregulation of BCL2 by miRNAs augments drug-induced apoptosis - a combined computational and experimental approach. *J Cell Sci.* **6**:1568-78 (2012)
24. G.A. Calin, C.D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler et al., Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **24**, 15524-9 (2002)
25. D. Bonci, V. Coppola, M. Musumeci, A. Addario, R. Giuffrida, L. Memeo, L. D'Urso et al., The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat Med.* **11**, 1271-7 (2008)
26. N. Bandi, S. Zbinden, M. Gugger, M. Arnold, V. Kocher, L. Hasan, A. Kappeler, T. Brunner, E. Vassella. miR-15a and miR-16 are implicated in cell cycle regulation in a Rb-dependent manner and are frequently deleted or down-regulated in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* **13**:5553-9 (2009)
27. P. S. Linsley, J. Schelter, J. Burchard, M. Kibukawa, M.M. Martin, S.R. Bartz, J.M. Johnson, J.M. Cummins, C.K. Raymond, H. Dai, N. Chau, M. Cleary, A.L. Jackson, M. Carleton, L. Lim. Transcripts targeted by the microRNA-16 family cooperatively regulate cell cycle progression. *Mol Cell Biol.* **6**:2240-52 (2007)
28. Q. Liu, H. Fu, F. Sun, H. Zhang, Y. Tie, J. Zhu, R. Xing, Z. Sun, X. Zheng. miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **16**:5391-404 (2008)
29. M.A. Pogrel, Treatment of keratocysts: the case for decompression and marsupialization. *J Oral Maxillofac Surg.* **11**, 1667-73 (2005)

## VI. Considerações finais

## VI. CONSIDERAÇÕES FINAIS:

Em uma célula normal, o equilíbrio fisiológico entre a expressão de genes supressores de tumor e proto-oncogenes mantém a homeostase e permite a proliferação celular cuidadosamente regulada ao não permitir o crescimento desordenado de células que leva a formação de neoplasmas. De acordo com o modelo *two-hits*, de Knudson, para genes supressores de tumores, uma mutação ocorrer em um dos alelos supressores de tumor (primeiro “hit”), acompanhada por PA do alelo selvagem remanescente (segundo “hit”), seria necessária para disparar a formação do neoplasma (KNUDSON,1971). Inicialmente, essa hipótese sugeria que duas modificações em alelos diferentes do gene supressor de tumor fossem suficientes para a iniciação de alguns tumores - como cânceres pediátricos, mas mutações adicionais em outros genes seriam necessárias para outras neoplasias. Acredita-se que muitos cânceres não-hereditários necessitam de aproximadamente quatro ou mais eventos distintos de mutação para resultar na perturbação de vias de sinalização celular críticas, como PI3K, p53 ou RB (VOGELSTEIN & KINZLER,1993).

No contexto das síndromes e dos cânceres hereditários, a inativação do gene da doença em questão pode ser o passo limitante para a iniciação do tumor. Entretanto, outros eventos podem ocorrer, especialmente para promover ou aumentar a progressão do tumor. A este respeito, a hipótese *two-hits*, de Kudson, deve ser aplicada diretamente para genes supressores de tumor, com ‘dois hits’ representando o número de eventos necessários para a inativação do gene, porém, não necessariamente para tumorigênese. Contudo, é crescente o número de estudos que descrevem candidatos a gene supressor de tumor que não confirmam o modelo padrão *two-hits*. A função de alguns desses genes candidatos a gene supressor de tumor associados ao câncer pode ser de fato abolida pela inativação de apenas um alelo (FODDE & SMITS,2002), sendo que essa inativação pode ocorrer não somente por mutação (ou PA), mas, inclusive, por hipermetilação de promotores gênicos (JONES & LAIRD,1999).

Neste estudo apresentado, encontramos alteração na região contendo o *PTCH* em COO e em TOQ e, apesar de não termos investigado mutação no alelo remanescente, estudos anteriores vêm demonstrando que a haploinsuficiência do *PTCH* pode possuir relevância patogênica no desenvolvimento neoplásico. Um exemplo disso foi revelado em análises de tumores retirados de camundongos *PTCH+/-*, que, embora retivessem um alelo selvagem do gene e apresentavam ausência do segundo *hit*, apresentavam também super-expressão do fator de transcrição GLI e assim, conseqüentemente, notava-se uma maior ativação da via HH

(ZURAWEL ET AL.,2000; CALZADA-WACK ET AL.,2002). Em outros dois estudos com TOQ, foi também demonstrado que essa lesão pode carregar modificação de apenas um alelo do gene *PTCH*. No estudo mais antigo, a avaliação imuno-histoquímica de *PTCH* demonstrou a expressão da proteína selvagem em duas amostras de TOQ que, sabidamente, carregavam uma mutação que levava a um *stop-condon* prematuro (BARRETO ET AL.,2002). No estudo mais recente, 44 amostras de TOQ foram analisadas quanto a presença de mutação e/ou PA de ambos os alelos do *PTCH*, porém, apenas 13 casos apresentaram comportamento coerente com o modelo *two-hit* enquanto em 14 amostras a alteração do *PTCH* foi encontrada em apenas um alelo (PAN ET AL.,2010).

Já atualmente, está claro que a ativação constitutiva da via HH por alteração de alguns de seus componentes pode lavar a neoplasia. O aumento da expressão de GLI-1 e *PTCH* foi observado em carcinomas basocelular que carregavam mutações no gene *PTCH*. Adicionalmente, inúmeros estudos têm demonstrado superexpressão consistente do *PTCH* em carcinomas basocelular, além de formação de lesões tipo meduloblastoma em modelos animais “knockout” para *PTCH* (GOODRICH ET AL.,1997; DAYA-GROSJEAN & COUVE-PRIVAT,2005). No entanto, apesar do nosso estudo e de estudos prévios terem reportado evidências da alteração do gene *PTCH* em COO e TOQ, ainda permanece bastante obscuro o papel da sinalização HH no desenvolvimento e progressão dessas lesões.

Até o momento, poucos estudos abordaram a nível molecular a via HH e sua relação com a patogênese de cistos e tumores odontogênicos. Em um estudo realizado em 2004, a expressão de Sonic HH, de *PTCH*, de SMO e de GLI-1 foi detectada em amostras de TOQ e gengivas por transcriptase-reversa-PCR e imunohistoquímica. Tal estudo demonstrou a expressão dos componentes da via HH em TOQ por qRT-PCR e imuno-histoquímica nas camadas epiteliais e subepiteliais da lesão (OHKI ET AL.,2004). Em um outro estudo, através da imunomarcagem de Ki67, foi demonstrado um maior nível de proliferação celular em TOQ, que carregava mutação no gene *PTCH*, em comparação com aqueles TOQs nos quais não foram encontradas mutações (PAN & LI,2009). Ao revisar a literatura, torna-se bastante evidente de que estudos mais aprofundados devem ser desenvolvidos no intuito de melhor compreender a atividade oncogênica da via HH em TOQ e também em COO e outros cistos e tumores odontogênicos.

Alteração do gene *PTCH* também foi reportada em outras lesões odontogênicas, além do COO e TOQ, como o cisto dentígero, cisto odontogênico calcificante e ameloblastoma (LEVANAT ET AL.,2000; PAVELIC ET AL.,2001; PEACOCK ET AL.,2010). Esses dados indicam que essa é uma alteração inicial, ou pelo menos uma das iniciais, no desenvolvimento de

algumas lesões odontogênicas e levantam um grande questionamento sobre quais mecanismos são importantes para o desenvolvimento e comportamento diferencial de cada uma dessas lesões. Mais intrigante é a questão do porquê pacientes com a SCBN, que sabidamente carregam alteração no gene *PTCH*, não são suscetíveis para o desenvolvimento de outros tipos de cistos e tumores odontogênicos, além do TOQ. São essas questões que nos impulsionam a identificar outros mecanismos moleculares que possam explicar melhor a patogênese dos cistos e tumores odontogênicos e a descobrir novos mecanismos que elucidam melhor as diferenças e semelhanças patogênicas dessas lesões.

A identificação dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 como candidato a gene de câncer levou ao questionamento de como é o envolvimento geral dos miRNAs em cânceres humanos. Desde então, numerosos estudos tem usado “microarrays” para identificar assinaturas de miRNAs em cada tipo de câncer analisado, incluindo mama (IORIO ET AL.,2005), fígado (MURAKAMI ET AL.,2006; WANG ET AL.,2008), pulmão (HAYASHITA ET AL.,2005), dentre outros. Tais estudos mostram claramente que o espectro de miRNAs, expresso em células malignas, é significativamente diferente da contraparte saudável, sugerindo que alterações em genes de miRNAs executam uma função crítica na patofisiologia de muitos, e talvez todos, cânceres humanos.

Os miRNAs, que tem como alvo genes do câncer, adicionaram outra dimensão ao considerar o genótipo/fenótipo para prevenção e/ou terapia. A superexpressão de um ou mais destes miRNAs pode conferir suscetibilidade ao câncer. Adicionalmente, tumores que não apresentam alterações genéticas em proto-oncogenes, mas que apresentam níveis anormais em sua expressão devido à desregulação de miRNAs, podem se comportar de forma semelhante aos tumores com deleção genética ou mutação genética. Mapear as interações entre miRNAs e genes supressor de tumor pode ser bastante útil para a definição e previsão da resposta do tumor ao tratamento.

A regulação, para menos, do cluster miR-15a/16-1 em leucemia linfocítica crônica, em adenoma da pituitária e em câncer de próstata foi demonstrada ser uma consequência da deleção do sítio de fragilidade em 13q14 contendo este cluster (CALIN ET AL.,2002). A deleção em 13q14 ainda não foi investigada em TOQ até agora e estudos futuros serão necessários para responder a questão se a regulação para menos de miR-15a/16-1, observada por nós, em TOQ, está relacionada ou não com a mutação e/ou PA no lócus destes miRNAs.

Além do *BCL2*, foram demonstrados que outros genes são regulados por miRNA-15a/16-1, como o *CCND1* e *WNT3A* (BONCI ET AL.,2008). A proteína codificada por *CCND1* pertence à família de ciclinas altamente conservada e regulam as quinases CDK.4 ou CDK6,

cuja atividade é necessária para a transição do ciclo celular G1/S. A família de genes WNT é composta por genes que codificam proteínas sinalizadoras implicadas na oncogênese e em processos do desenvolvimento, incluindo determinação e diferenciação celular. Considerando que a alta imunopositividade para *CCND1* é reportada em TOQ, principalmente naqueles associados à SCBN (LO MUZIO ET AL.,1999; KIMI ET AL.,2001), e que a via WNT é importante para a odontogênese (MILLAR ET AL.,2003; CHEN ET AL.,2009), esses genes seriam alvos interessantes para estudos futuros em TOQ, uma vez que regulação para menos de seus miRNAs reguladores foi encontrada por nós nesta lesão.

A perda da expressão de miR-15a e miR-16-1 pode desempenhar um papel preponderante em vários tipos de tumores através da desregulação do gene *BCL2*, *WNT3A* ou *CCND1*. No entanto, ainda podem existir milhares de outros possíveis alvos para estes miRNAs que podem afetar o processo da carcinogênese, o que os tornaria úteis para serem usados na supressão do crescimento tumoral.

Super expressão do *BCL2* em TOQ devido a regulação para menos de miRNAs é uma proposição plausível, no entanto, outros fatores importantes que podem contribuir para a desregulação da expressão desse importante gene anti-apoptótico nessa lesão devem ser analisados. Um desses fatores é a própria via HH, cuja relação com a tumorigênese do TOQ já foi evidenciada. Em 2004, dois grupos de pesquisa distintos relataram um achado interessante: a transcrição do *BCL2* pode ser regulada pelo efetor da via HH, GLI, através da interação direta com a região promotora do *BCL2* (BIGELOW ET AL.,2004; REGL ET AL.,2004). De fato, a super expressão de *BCL2* foi associada com a alta atividade GLI em tumores frequentemente associados à SCBN e altamente conectados a distúrbios da via HH (FAN ET AL.,1997; HUTCHIN ET AL.,2005; BAR ET AL.,2007; ELAMIN ET AL.,2010). O papel da via HH na superexpressão do *BCL2* ainda não foi investigado em TOQ, no entanto, levando em consideração que essa via está ativa nessa lesão e *BCL2* superexpresso, uma interessante hipótese a ser testada é que, em colaboração com regulação para menos de miR-15a/16-1, a atividade HH resulta na alta expressão de *BCL2* observada em TOQ.

Por fim, os trabalhos apresentados nesta tese são exemplos de quão complexo pode ser a patogenia dos cistos e tumores odontogênicos – que podem envolver eventos genéticos, como PA na região associada ao gene *PTCH*, e eventos epigenéticos, como alteração da expressão de miRNAs – e incentivam o delineamento de estudos moleculares mais específicos e elaborados, que levarão à compreensão mais aprofundada dos mecanismos patológicos do TOQ, COO, além de outros cistos e tumores odontogênicos.

## VII. Conclusões

## VII. CONCLUSÕES:

- COO apresenta PA na região associada ao gene *PTCH*, 9q22–9q31. Essa alteração foi confirmada também em TOQ.
- As células epiteliais do TOQ apresentam baixa expressão dos miRNAs miR-15a e/ou miR-16-1 e alta expressão de *BCL2* quando comparado aos folículos pericoronários.
- A expressão dos miRNAs miR-15a e miR-16-1 é similar em TOQs esporádicos e associados à SCBN.
- A expressão de miR-15a e miR-16-1 aumenta após o procedimento de marsupialização.
- A expressão transiente de miR-15/miR-16-1 influencia negativamente a tradução de *BCL2* em células primárias de TOQ, mas não a transcrição.

## VIII. Referências

## VII. REFERÊNCIAS:

- Abdel-Rahman, W. M., K. Katsura, et al. (2001). "Spectral karyotyping suggests additional subsets of colorectal cancers characterized by pattern of chromosome rearrangement." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2538-2543.
- Agaram, N. P., B. M. Collins, et al. (2004). "Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic." Arch Pathol Lab Med **128**(3): 313-317.
- Agren, M., P. Kogerman, et al. (2004). "Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site." Gene **330**: 101-114.
- Akao, Y., Y. Otsuki, et al. (1994). "Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes." Cancer Res **54**(9): 2468-2471.
- Ambros, V. (2004). "The functions of animal microRNAs." Nature **431**(7006): 350-355.
- Aragaki, T., Y. Michi, et al. (2010). "Comprehensive keratin profiling reveals different histopathogenesis of keratocystic odontogenic tumor and orthokeratinized odontogenic cyst." Hum Pathol **41**(12): 1718-1725.
- Aszterbaum, M., A. Rothman, et al. (1998). "Identification of mutations in the human PATCHED gene in sporadic basal cell carcinomas and in patients with the basal cell nevus syndrome." J Invest Dermatol **110**(6): 885-888.
- Bagga, S., J. Bracht, et al. (2005). "Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation." Cell **122**(4): 553-563.
- Balsara, B. R., D. W. Bell, et al. (1999). "Comparative genomic hybridization and loss of heterozygosity analyses identify a common region of deletion at 15q11.1-15 in human malignant mesothelioma." Cancer Res **59**(2): 450-454.
- Bar, E. E., A. Chaudhry, et al. (2007). "Hedgehog signaling promotes medulloblastoma survival via Bc/II." Am J Pathol **170**(1): 347-355.
- Barreto, D. C., A. E. Bale, et al. (2002). "Immunolocalization of PTCH protein in odontogenic cysts and tumors." J Dent Res **81**(11): 757-760.
- Barreto, D. C., R. S. Gomez, et al. (2000). "PTCH gene mutations in odontogenic keratocysts." J Dent Res **79**(6): 1418-1422.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." Cell **116**(2): 281-297.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, et al. (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." Genes Dev **20**(14): 1885-1898.
- Berezikov, E., W. J. Chung, et al. (2007). "Mammalian mirtron genes." Mol Cell **28**(2): 328-336.
- Bigelow, R. L., N. S. Chari, et al. (2004). "Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1." J Biol Chem **279**(2): 1197-1205.
- Bohnsack, M. T., K. Czaplinski, et al. (2004). "Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs." RNA **10**(2): 185-191.
- Bonci, D., V. Coppola, et al. (2008). "The miR-15a-miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities." Nat Med **14**(11): 1271-1277.
- Bottoni, A., D. Piccin, et al. (2005). "miR-15a and miR-16-1 down-regulation in pituitary adenomas." J Cell Physiol **204**(1): 280-285.
- Boutet, N., Y. J. Bignon, et al. (2003). "Spectrum of PTCH1 mutations in French patients with Gorlin syndrome." J Invest Dermatol **121**(3): 478-481.

- Brondum, N. and V. J. Jensen (1991). "Recurrence of keratocysts and decompression treatment. A long-term follow-up of forty-four cases." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **72**(3): 265-269.
- Calin, G. A., A. Cimmino, et al. (2008). "MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(13): 5166-5171.
- Calin, G. A., C. D. Dumitru, et al. (2002). "Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(24): 15524-15529.
- Calin, G. A., M. Ferracin, et al. (2005). "A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia." N Engl J Med **353**(17): 1793-1801.
- Calzada-Wack, J., R. Kappler, et al. (2002). "Unbalanced overexpression of the mutant allele in murine Patched mutants." Carcinogenesis **23**(5): 727-733.
- Cavenee, W. K., T. P. Dryja, et al. (1983). "Expression of recessive alleles by chromosomal mechanisms in retinoblastoma." Nature **305**(5937): 779-784.
- Chen, J., Y. Lan, et al. (2009). "Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development." Dev Biol **334**(1): 174-185.
- Chenevix-Trench, G., C. Wicking, et al. (1993). "Further localization of the gene for nevoid basal cell carcinoma syndrome (NBCCS) in 15 Australasian families: linkage and loss of heterozygosity." Am J Hum Genet **53**(3): 760-767.
- Chiang, C., Y. Litingtung, et al. (1996). "Cyclopia and defective axial patterning in mice lacking Sonic hedgehog gene function." Nature **383**(6599): 407-413.
- Chiang, C., R. Z. Swan, et al. (1999). "Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis." Dev Biol **205**(1): 1-9.
- Chidambaram, A. and M. Dean (1996). "Genetics of the nevoid basal cell carcinoma syndrome." Adv Cancer Res **70**: 49-61.
- Chirapathomsakul, D., P. Sastravaha, et al. (2006). "A review of odontogenic keratocysts and the behavior of recurrences." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **101**(1): 5-9; discussion 10.
- Cimmino, A., G. A. Calin, et al. (2005). "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(39): 13944-13949.
- Cotter, T. G. (2009). "Apoptosis and cancer: the genesis of a research field." Nat Rev Cancer **9**(7): 501-507.
- Cox, C., G. Bignell, et al. (2005). "A survey of homozygous deletions in human cancer genomes." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(12): 4542-4547.
- Cranin, A. N., S. Madan, et al. (1994). "Novel method of treating large cysts of jaws in children." N Y State Dent J **60**(2): 41-44.
- Crowley, T. E., G. E. Kaugars, et al. (1992). "Odontogenic keratocysts: a clinical and histologic comparison of the parakeratin and orthokeratin variants." J Oral Maxillofac Surg **50**(1): 22-26.
- da Silva, M. J., S. O. de Sousa, et al. (2002). "Immunohistochemical study of the orthokeratinized odontogenic cyst: a comparison with the odontogenic keratocyst." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **94**(6): 732-737.
- Dahmane, N., J. Lee, et al. (1997). "Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours." Nature **389**(6653): 876-881.
- Danaee, H., M. R. Karagas, et al. (2006). "Allelic loss at Drosophila patched gene is highly prevalent in Basal and squamous cell carcinomas of the skin." J Invest Dermatol **126**(5): 1152-1158.

- Dassule, H. R., P. Lewis, et al. (2000). "Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth." *Development* **127**(22): 4775-4785.
- Davies, J. L., Y. Kawaguchi, et al. (1994). "A genome-wide search for human type 1 diabetes susceptibility genes." *Nature* **371**(6493): 130-136.
- Daya-Grosjean, L. and S. Couve-Privat (2005). "Sonic hedgehog signaling in basal cell carcinomas." *Cancer Lett* **225**(2): 181-192.
- de Paula, A. M., J. N. Carvalhais, et al. (2000). "Cell proliferation markers in the odontogenic keratocyst: effect of inflammation." *J Oral Pathol Med* **29**(10): 477-482.
- Denli, A. M., B. B. Tops, et al. (2004). "Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex." *Nature* **432**(7014): 231-235.
- Diniz, M. G., E. R. Borges, et al. (2009). "PTCH1 isoforms in odontogenic keratocysts." *Oral Oncol* **45**(3): 291-295.
- Dong, J., M. R. Gailani, et al. (2000). "Identification of PATCHED mutations in medulloblastomas by direct sequencing." *Hum Mutat* **16**(1): 89-90.
- Dong, Q., S. Pan, et al. (2010). "Orthokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathologic study of 61 cases." *Arch Pathol Lab Med* **134**(2): 271-275.
- Elamin, M. H., Z. Shinwari, et al. (2010). "Curcumin inhibits the Sonic Hedgehog signaling pathway and triggers apoptosis in medulloblastoma cells." *Mol Carcinog* **49**(3): 302-314.
- Ender, C., A. Krek, et al. (2008). "A human snoRNA with microRNA-like functions." *Mol Cell* **32**(4): 519-528.
- Eyre, J. and J. M. Zakrzewska (1985). "The conservative management of large odontogenic keratocysts." *Br J Oral Maxillofac Surg* **23**(3): 195-203.
- Fan, H., A. E. Oro, et al. (1997). "Induction of basal cell carcinoma features in transgenic human skin expressing Sonic Hedgehog." *Nat Med* **3**(7): 788-792.
- Farias, L. C., C. C. Gomes, et al. (2012). "Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma." *Hum Pathol*.
- Farndon, P. A., R. G. Del Mastro, et al. (1992). "Location of gene for Gorlin syndrome." *Lancet* **339**(8793): 581-582.
- Fodde, R. and R. Smits (2002). "Cancer biology. A matter of dosage." *Science* **298**(5594): 761-763.
- Gailani, M. R., M. Stahle-Backdahl, et al. (1996). "The role of the human homologue of Drosophila patched in sporadic basal cell carcinomas." *Nat Genet* **14**(1): 78-81.
- Goldberg, E. K., J. M. Glendening, et al. (2000). "Localization of multiple melanoma tumor-suppressor genes on chromosome 11 by use of homozygosity mapping-of-deletions analysis." *Am J Hum Genet* **67**(2): 417-431.
- Goldstein, A. M., C. Stewart, et al. (1994). "Localization of the gene for the nevoid basal cell carcinoma syndrome." *Am J Hum Genet* **54**(5): 765-773.
- Gomes, C. C. and R. S. Gomez (2008). "MicroRNA and oral cancer: future perspectives." *Oral Oncol* **44**(10): 910-914.
- Goodrich, L. V., L. Milenkovic, et al. (1997). "Altered neural cell fates and medulloblastoma in mouse patched mutants." *Science* **277**(5329): 1109-1113.
- Gregory, R. I., K. P. Yan, et al. (2004). "The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs." *Nature* **432**(7014): 235-240.
- Gyapay, G., J. Morissette, et al. (1994). "The 1993-94 Genethon human genetic linkage map." *Nat Genet* **7**(2 Spec No): 246-339.
- Hahn, H., C. Wicking, et al. (1996). "Mutations of the human homolog of Drosophila patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome." *Cell* **85**(6): 841-851.
- Han, J., Y. Lee, et al. (2004). "The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing." *Genes Dev* **18**(24): 3016-3027.

- Han, J., Y. Lee, et al. (2006). "Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex." Cell **125**(5): 887-901.
- Hanada, M., D. Delia, et al. (1993). "bcl-2 gene hypomethylation and high-level expression in B-cell chronic lymphocytic leukemia." Blood **82**(6): 1820-1828.
- Hardcastle, Z., R. Mo, et al. (1998). "The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants." Development **125**(15): 2803-2811.
- Hauge, X. Y. and M. Litt (1993). "A study of the origin of 'shadow bands' seen when typing dinucleotide repeat polymorphisms by the PCR." Hum Mol Genet **2**(4): 411-415.
- Hayashita, Y., H. Osada, et al. (2005). "A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation." Cancer Res **65**(21): 9628-9632.
- Hebrok, M., S. K. Kim, et al. (2000). "Regulation of pancreas development by hedgehog signaling." Development **127**(22): 4905-4913.
- Henley, J., D. J. Summerlin, et al. (2005). "Molecular evidence supporting the neoplastic nature of odontogenic keratocyst: a laser capture microdissection study of 15 cases." Histopathology **47**(6): 582-586.
- Hockenbery, D., G. Nunez, et al. (1990). "Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death." Nature **348**(6299): 334-336.
- Hodgkinson, D. J., J. E. Woods, et al. (1978). "Keratocysts of the jaw. Clinicopathologic study of 79 patients." Cancer **41**(3): 803-813.
- Holmberg, E., B. L. Rozell, et al. (1996). "Differential allele loss on chromosome 9q22.3 in human non-melanoma skin cancer." Br J Cancer **74**(2): 246-250.
- Humphreys, D. T., B. J. Westman, et al. (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." Proc Natl Acad Sci U S A **102**(47): 16961-16966.
- Hutchin, M. E., M. S. Kariapper, et al. (2005). "Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle." Genes Dev **19**(2): 214-223.
- Hutvagner, G. and P. D. Zamore (2002). "A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex." Science **297**(5589): 2056-2060.
- Hutzinger, R., R. Feederle, et al. (2009). "Expression and processing of a small nucleolar RNA from the Epstein-Barr virus genome." PLoS Pathog **5**(8): e1000547.
- Ingham, P. W., A. M. Taylor, et al. (1991). "Role of the Drosophila patched gene in positional signalling." Nature **353**(6340): 184-187.
- Iorio, M. V., M. Ferracin, et al. (2005). "MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer." Cancer Res **65**(16): 7065-7070.
- Joerger, A. C. and A. R. Fersht (2008). "Structural biology of the tumor suppressor p53." Annu Rev Biochem **77**: 557-582.
- Johann, A. C., P. C. Caldeira, et al. (2011). "Metallothionein in the radicular, dentigerous, orthokeratinized odontogenic cysts and in keratocystic odontogenic tumor." J Oral Pathol Med **40**(3): 270-276.
- Johnson, R. L., A. L. Rothman, et al. (1996). "Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome." Science **272**(5268): 1668-1671.
- Jones, M. H. and Y. Nakamura (1992). "Deletion mapping of chromosome 3p in female genital tract malignancies using microsatellite polymorphisms." Oncogene **7**(8): 1631-1634.
- Jones, M. H. and Y. Nakamura (1992). "Detection of loss of heterozygosity at the human TP53 locus using a dinucleotide repeat polymorphism." Genes Chromosomes Cancer **5**(1): 89-90.

- Jones, P. A. and P. W. Laird (1999). "Cancer epigenetics comes of age." Nat Genet **21**(2): 163-167.
- Kakarantza-Angelopoulou, E. and O. Nicolatou (1990). "Odontogenic keratocysts: clinicopathologic study of 87 cases." J Oral Maxillofac Surg **48**(6): 593-599; discussion 599-600.
- Kimi, K., H. Kumamoto, et al. (2001). "Immunohistochemical analysis of cell-cycle- and apoptosis-related factors in lining epithelium of odontogenic keratocysts." J Oral Pathol Med **30**(7): 434-442.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Kolar, Z., M. Geierova, et al. (2006). "Immunohistochemical analysis of the biological potential of odontogenic keratocysts." J Oral Pathol Med **35**(2): 75-80.
- Lasko, D., W. Cavenee, et al. (1991). "Loss of constitutional heterozygosity in human cancer." Annu Rev Genet **25**: 281-314.
- Lee, Y., C. Ahn, et al. (2003). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." Nature **425**(6956): 415-419.
- Lench, N. J., A. S. High, et al. (1996). "Investigation of chromosome 9q22.3-q31 DNA marker loss in odontogenic keratocysts." Eur J Cancer B Oral Oncol **32B**(3): 202-206.
- Levanat, S., R. J. Gorlin, et al. (1996). "A two-hit model for developmental defects in Gorlin syndrome." Nat Genet **12**(1): 85-87.
- Levanat, S., B. Pavelic, et al. (2000). "Involvement of PTCH gene in various noninflammatory cysts." J Mol Med (Berl) **78**(3): 140-146.
- Li, T. J., R. M. Browne, et al. (1994). "Quantification of PCNA+ cells within odontogenic jaw cyst epithelium." J Oral Pathol Med **23**(4): 184-189.
- Li, T. J., M. Kitano, et al. (1998). "Orthokeratinized odontogenic cyst: a clinicopathological and immunocytochemical study of 15 cases." Histopathology **32**(3): 242-251.
- Lo Muzio, L., A. Santarelli, et al. (2005). "p63 expression in odontogenic cysts." Int J Oral Maxillofac Surg **34**(6): 668-673.
- Lo Muzio, L., S. Staibano, et al. (1999). "Expression of cell cycle and apoptosis-related proteins in sporadic odontogenic keratocysts and odontogenic keratocysts associated with the nevoid basal cell carcinoma syndrome." J Dent Res **78**(7): 1345-1353.
- Lund, E., S. Guttinger, et al. (2004). "Nuclear export of microRNA precursors." Science **303**(5654): 95-98.
- MacDougall, M., J. K. Selden, et al. (1998). "Immortalized mouse odontoblast cell line MO6-G3 application for in vitro biocompatibility testing." Am J Dent **11 Spec No**: S11-16.
- Maesawa, C., G. Tamura, et al. (1998). "Mutations in the human homologue of the Drosophila patched gene in esophageal squamous cell carcinoma." Genes Chromosomes Cancer **21**(3): 276-279.
- Malcic, A., S. Jukic, et al. (2008). "Alterations of FHIT and P53 genes in keratocystic odontogenic tumor, dentigerous and radicular cyst." J Oral Pathol Med **37**(5): 294-301.
- Manfredi, M., P. Vescovi, et al. (2004). "Nevoid basal cell carcinoma syndrome: a review of the literature." Int J Oral Maxillofac Surg **33**(2): 117-124.
- Marker, P., N. Brondum, et al. (1996). "Treatment of large odontogenic keratocysts by decompression and later cystectomy: a long-term follow-up and a histologic study of 23 cases." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **82**(2): 122-131.
- Mathonnet, G., M. R. Fabian, et al. (2007). "MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F." Science **317**(5845): 1764-1767.
- McGarvey, T. W., Y. Maruta, et al. (1998). "PTCH gene mutations in invasive transitional cell carcinoma of the bladder." Oncogene **17**(9): 1167-1172.

- Meister, G., M. Landthaler, et al. (2004). "Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs." *Mol Cell* **15**(2): 185-197.
- Millar, S. E., E. Koyama, et al. (2003). "Over- and ectopic expression of Wnt3 causes progressive loss of ameloblasts in postnatal mouse incisor teeth." *Connect Tissue Res* **44 Suppl 1**: 124-129.
- Murakami, Y., T. Yasuda, et al. (2006). "Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues." *Oncogene* **25**(17): 2537-2545.
- Nakamura, N., T. Mitsuyasu, et al. (2002). "Marsupialization for odontogenic keratocysts: long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics." *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **94**(5): 543-553.
- Neville, B. W., D. D. Damm, et al. (2009). *Patologia Oral e Maxilofacial - Cistos e Tumores Odontogênicos*. Rio de Janeiro, Elsevier.
- O'Connell, R. M., D. S. Rao, et al. (2008). "Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder." *J Exp Med* **205**(3): 585-594.
- Ogiwara, H., T. Kohno, et al. (2008). "Unbalanced translocation, a major chromosome alteration causing loss of heterozygosity in human lung cancer." *Oncogene* **27**(35): 4788-4797.
- Ohki, K., H. Kumamoto, et al. (2004). "PTC gene mutations and expression of SHH, PTC, SMO, and GLI-1 in odontogenic keratocysts." *Int J Oral Maxillofac Surg* **33**(6): 584-592.
- Olsen, P. H. and V. Ambros (1999). "The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation." *Dev Biol* **216**(2): 671-680.
- Osorio, A., M. de la Hoya, et al. (2002). "Loss of heterozygosity analysis at the BRCA loci in tumor samples from patients with familial breast cancer." *Int J Cancer* **99**(2): 305-309.
- Pan, S., Q. Dong, et al. (2010). "Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: modification of the two-hit hypothesis." *Clin Cancer Res* **16**(2): 442-450.
- Pan, S. and T. J. Li (2009). "PTCH1 mutations in odontogenic keratocysts: are they related to epithelial cell proliferation?" *Oral Oncol* **45**(10): 861-865.
- Panders, A. K. and H. N. Haddlers (1969). "Solitary keratocysts of the jaws." *J Oral Surg* **27**(12): 931-938.
- Pavelic, B., S. Levanat, et al. (2001). "PTCH gene altered in dentigerous cysts." *J Oral Pathol Med* **30**(9): 569-576.
- Peacock, Z. S., D. Cox, et al. (2010). "Involvement of PTCH1 mutations in the calcifying epithelial odontogenic tumor." *Oral Oncol* **46**(5): 387-392.
- Phillipsen, H. P. (1956). "Om Keratocyster (Kolesteatomer) I Kaeberne." *Tandlaegebladet* **60**: 963-980.
- Piattelli, A., M. Fioroni, et al. (1998). "Expression of proliferating cell nuclear antigen in ameloblastomas and odontogenic cysts." *Oral Oncol* **34**(5): 408-412.
- Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, et al. (2005). "Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells." *Science* **309**(5740): 1573-1576.
- Pogrel, M. A. (2007). "Decompression and marsupialization as definitive treatment for keratocysts--a partial retraction." *J Oral Maxillofac Surg* **65**(2): 362-363.
- Pogrel, M. A. and R. C. Jordan (2004). "Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst." *J Oral Maxillofac Surg* **62**(6): 651-655; discussion 655-656.

- Prayson, R. A., E. A. Castilla, et al. (2002). "Chromosome 1p allelic loss by fluorescence in situ hybridization is not observed in dysembryoplastic neuroepithelial tumors." Am J Clin Pathol **118**(4): 512-517.
- Raffel, C., R. B. Jenkins, et al. (1997). "Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations." Cancer Res **57**(5): 842-845.
- Rangiani, A. and P. Motahary (2009). "Evaluation of bax and bcl-2 expression in odontogenic keratocysts and orthokeratinized odontogenic cysts: A comparison of two cysts." Oral Oncol **45**(7): e41-44.
- Reed, P. W., J. L. Davies, et al. (1994). "Chromosome-specific microsatellite sets for fluorescence-based, semi-automated genome mapping." Nat Genet **7**(3): 390-395.
- Regl, G., M. Kasper, et al. (2004). "Activation of the BCL2 promoter in response to Hedgehog/GLI signal transduction is predominantly mediated by GLI2." Cancer Res **64**(21): 7724-7731.
- Ren, C., M. G. Diniz, et al. (2011). "Differential enamel and osteogenic gene expression profiles in odontogenic tumors." Cells Tissues Organs **194**(2-4): 296-301.
- Ruby, J. G., C. H. Jan, et al. (2007). "Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing." Nature **448**(7149): 83-86.
- Sanchez, P., A. M. Hernandez, et al. (2004). "Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(34): 12561-12566.
- Saraiya, A. A. and C. C. Wang (2008). "snoRNA, a novel precursor of microRNA in *Giardia lamblia*." PLoS Pathog **4**(11): e1000224.
- Sayed, D. and M. Abdellatif (2011). "MicroRNAs in development and disease." Physiol Rev **91**(3): 827-887.
- Schofield, D., D. C. West, et al. (1995). "Correlation of loss of heterozygosity at chromosome 9q with histological subtype in medulloblastomas." Am J Pathol **146**(2): 472-480.
- Schultz, L. (1927). "Cysts of the maxilla and mandible." J Am Dent Assoc **14**: 1395.
- Shen, T., W. S. Park, et al. (1999). "Detection of loss of heterozygosity on chromosome 9q22.3 in microdissected sporadic basal cell carcinoma." Hum Pathol **30**(3): 284-287.
- Soskolne, W. A. and M. Shear (1967). "Observations on the pathogenesis of primordial cysts." Br Dent J **123**(7): 321-326.
- Stoelinga, P. J. (2001). "Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol." Int J Oral Maxillofac Surg **30**(1): 14-25.
- Stoelinga, P. J., M. M. Cohen, Jr., et al. (1975). "The origin of keratocysts in the basal cell nevus syndrome." J Oral Surg **33**(9): 659-663.
- Taft, R. J., E. A. Glazov, et al. (2009). "Small RNAs derived from snoRNAs." RNA **15**(7): 1233-1240.
- Teglund, S. and R. Toftgard (2010). "Hedgehog beyond medulloblastoma and basal cell carcinoma." Biochim Biophys Acta **1805**(2): 181-208.
- Thayer, S. P., M. P. di Magliano, et al. (2003). "Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis." Nature **425**(6960): 851-856.
- Thermann, R. and M. W. Hentze (2007). "Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation." Nature **447**(7146): 875-878.
- Thosaporn, W., A. Iamaroon, et al. (2004). "A comparative study of epithelial cell proliferation between the odontogenic keratocyst, orthokeratinized odontogenic cyst, dentigerous cyst, and ameloblastoma." Oral Dis **10**(1): 22-26.
- Toller, P. (1967). "Origin and growth of cysts of the jaws." Ann R Coll Surg Engl **40**(5): 306-336.

- Tostar, U., C. J. Malm, et al. (2006). "Deregulation of the hedgehog signalling pathway: a possible role for the PTCH and SUFU genes in human rhabdomyoma and rhabdomyosarcoma development." *J Pathol* **208**(1): 17-25.
- Tsuji, T., L. Catusus, et al. (2005). "Is loss of heterozygosity at 9q22.3 (PTCH gene) and 19p13.3 (STK11 gene) involved in the pathogenesis of ovarian stromal tumors?" *Hum Pathol* **36**(7): 792-796.
- Tsujimoto, Y., L. R. Finger, et al. (1984). "Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation." *Science* **226**(4678): 1097-1099.
- Tsujimoto, Y., J. Yunis, et al. (1984). "Molecular cloning of the chromosomal breakpoint of B-cell lymphomas and leukemias with the t(11;14) chromosome translocation." *Science* **224**(4656): 1403-1406.
- Ulukaya, E., C. Acilan, et al. (2011). "Apoptosis: why and how does it occur in biology?" *Cell Biochem Funct* **29**(6): 468-480.
- Uden, A. B., E. Holmberg, et al. (1996). "Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation." *Cancer Res* **56**(20): 4562-4565.
- van Houten, V. M., M. P. Tabor, et al. (2000). "Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions." *Clin Cancer Res* **6**(10): 3803-3816.
- Vaux, D. L., S. Cory, et al. (1988). "Bcl-2 gene promotes haemopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells." *Nature* **335**(6189): 440-442.
- Vedtofte, P., P. Holmstrup, et al. (1982). "Human odontogenic keratocyst transplants in nude mice." *Scand J Dent Res* **90**(4): 306-314.
- Vered, M., O. Peleg, et al. (2009). "The immunoprofile of odontogenic keratocyst (keratocystic odontogenic tumor) that includes expression of PTCH, SMO, GLI-1 and bcl-2 is similar to ameloblastoma but different from odontogenic cysts." *J Oral Pathol Med* **38**(7): 597-604.
- Vogelstein, B., E. R. Fearon, et al. (1989). "Allelotype of colorectal carcinomas." *Science* **244**(4901): 207-211.
- Vogelstein, B. and K. W. Kinzler (1993). "The multistep nature of cancer." *Trends Genet* **9**(4): 138-141.
- Wakiyama, M., K. Takimoto, et al. (2007). "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system." *Genes Dev* **21**(15): 1857-1862.
- Wang, Y., A. T. Lee, et al. (2008). "Profiling microRNA expression in hepatocellular carcinoma reveals microRNA-224 up-regulation and apoptosis inhibitor-5 as a microRNA-224-specific target." *J Biol Chem* **283**(19): 13205-13215.
- Watkins, D. N., D. M. Berman, et al. (2003). "Hedgehog signaling: progenitor phenotype in small-cell lung cancer." *Cell Cycle* **2**(3): 196-198.
- Weissenbach, J. (1993). "Microsatellite polymorphisms and the genetic linkage map of the human genome." *Curr Opin Genet Dev* **3**(3): 414-417.
- Wicking, C., S. Shanley, et al. (1997). "Most germ-line mutations in the nevoid basal cell carcinoma syndrome lead to a premature termination of the PATCHED protein, and no genotype-phenotype correlations are evident." *Am J Hum Genet* **60**(1): 21-26.
- Wolter, M., J. Reifenberger, et al. (1997). "Mutations in the human homologue of the Drosophila segment polarity gene patched (PTCH) in sporadic basal cell carcinomas of the skin and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system." *Cancer Res* **57**(13): 2581-2585.

- Wright, J. M. (1981). "The odontogenic keratocyst: orthokeratinized variant." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **51**(6): 609-618.
- Wu, L., J. Fan, et al. (2006). "MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(11): 4034-4039.
- Xie, J., R. L. Johnson, et al. (1997). "Mutations of the PATCHED gene in several types of sporadic extracutaneous tumors." Cancer Res **57**(12): 2369-2372.
- Yang, H. C., L. C. Chang, et al. (2011). "LOHAS: loss-of-heterozygosity analysis suite." Genet Epidemiol.
- Yi, R., Y. Qin, et al. (2003). "Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs." Genes Dev **17**(24): 3011-3016.
- Yokota, J., M. Wada, et al. (1987). "Loss of heterozygosity on chromosomes 3, 13, and 17 in small-cell carcinoma and on chromosome 3 in adenocarcinoma of the lung." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9252-9256.
- Zhang, J. Y., Q. Dong, et al. (2011). "Differences in collagen fibres in the capsule walls of parakeratinized and orthokeratinized odontogenic cysts." Int J Oral Maxillofac Surg **40**(11): 1296-1300.
- Zurawel, R. H., C. Allen, et al. (2000). "Evidence that haploinsufficiency of Ptc1 leads to medulloblastoma in mice." Genes Chromosomes Cancer **28**(1): 77-81.

Apêndices

## APÊNDICE A – SEQUÊNCIA DO ENXERTO CONTENDO OS MIRNAS MIR-15A/16-1

```

1  tttaaaaaaa cttgatggca ttcaatacaa ttatttaaatt gcaattacag
   aaatTTTTTT gaactaccgt aagttatggt aataatttaa cgTTaatgTc

51  tattttaaga gatgatacat ctgaaaaatt agtattaatt catttttaca
   ataaaaattct ctactatgta gactTTTTTaa tcataattaa gtaaaaaatgt

101  gaatcatact aaaaataaca agattatcaa taatactgaa aagactatca
   cttagtagatga tttttattgt tctaataggt attatgactt ttctgatagt

                                           SfcI
                                           --+-----

151  ataaaactga aaacacatta gtaacattaa tatacattaa aacacaactg
   tatttttgact tttgtgtaat cattgtaatt atatgtaatt ttgtgttgac

                                           BpmI
                                           -----

201  tagagtatgg tcaaccttac ttcagcagca cagttaatac tggagataat
   atctcatacc agttggaatg aagtcgtcgt gtcaattatg acctctatta

                                           BsaAI
                                           ----+---
                                           BtsI
                                           -----

251  tttagaatct taacgccaat atttacgtgc tgctaaggca ctgctgacat
   aaatccttaga attgcggtta taaatgcacg acgattccgt gacgactgta
   miR-16-1 (c)

BsrDI
-----

301  tgctatcata agagctatga ataaaaagaa atatattttc ttcagaagat
   acgatagtat tctcgatact tatttttctt tatataaaag aagtcttcta

XhoII
--+---
                                           BsgI
                                           -----

351  cagatccttg tattttttgag gcagcacaat atggcctgca ctttttcaaa
   gtctaggaac ataaaaactc cgtcgtgtta taccggacgt ggaaaagttt

                                           StyI
                                           --+-----

401  atccacaaac cattatgtgc tgctacttta ctccaagggt ttattttttt
   taggtgtttg gtaatacacg acgatgaaat gaggttccaa aataaaaaaa
   miR-15a (c)

451  taaacacaca ttcgcgcta aagaatataa aaaatatttt ctttcaggaa
   atttgtgtgt aagcgcggat ttcttatatt tttataaaa gaaagtcctt

                                           PmeI
                                           -----+-----

501  aaaaagaatg catgtaaaaa aatctatggt taaacattat aacattgatg
   tttttcttac gtacattttt ttagatacaa atttgtaata ttgtaactac

551  taatatgcat aattattttt aaggagattt taagtagaat aataaaacat
   attatacgtg ttaataaaaa ttcctctaaa attcatctta ttattttgta

                                           Bme1580I
                                           -----+
                                           Bsp1286I
                                           -----+

601  ttctacatca aaaacttaac tgaagtccat tctgtgcccc gcaca
   aagatgtagt ttttgaattg acttcaggta agacacgggt cgtgt

```

## APÊNDICE B – MICRODISSECÇÃO MANUAL

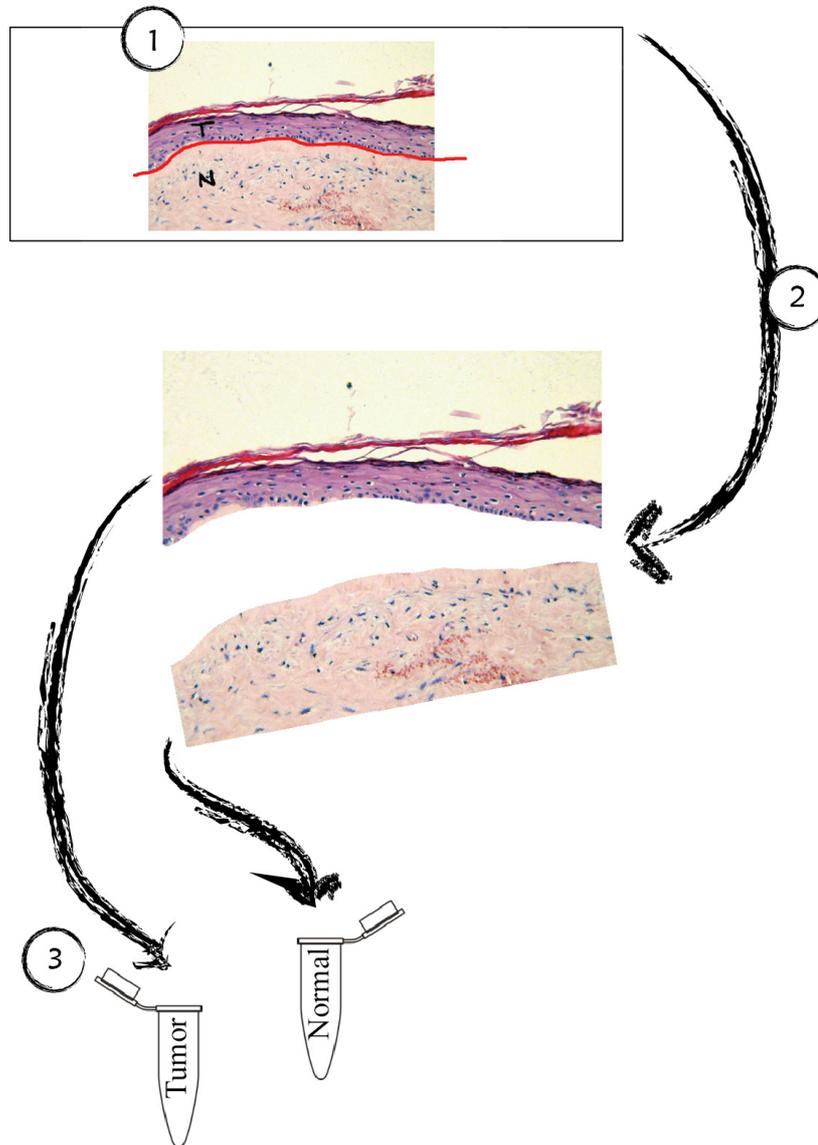


Figura 9 – Microdissecção manual. Com a ajuda de um microscópio óptico, regiões ricas em tecido normal e tumoral são marcadas em uma lâmina mestre contendo um corte histológico da amostra parafinada corado com H&E (1). Posteriormente, seguindo as marcações da lâmina mestre, as regiões de interesse do bloco da amostra que originou a lâmina mestre são delimitadas com a ajuda de uma navalha e este é cortado em seções sucessivas em um micrótomo (2). Por fim, os fragmentos ricos em tecido normal e tumoral são armazenados em tubos distintos para os procedimentos subsequentes (3).

**APÊNDICE C – BANDAS DOS FRAGMENTOS ORIGINADAS A PARTIR DA DIGESTÃO DO VETOR PSR-MIR-15/16 CONTENDO ENXERTO DOS GENES MIRNA 15A/16-1**

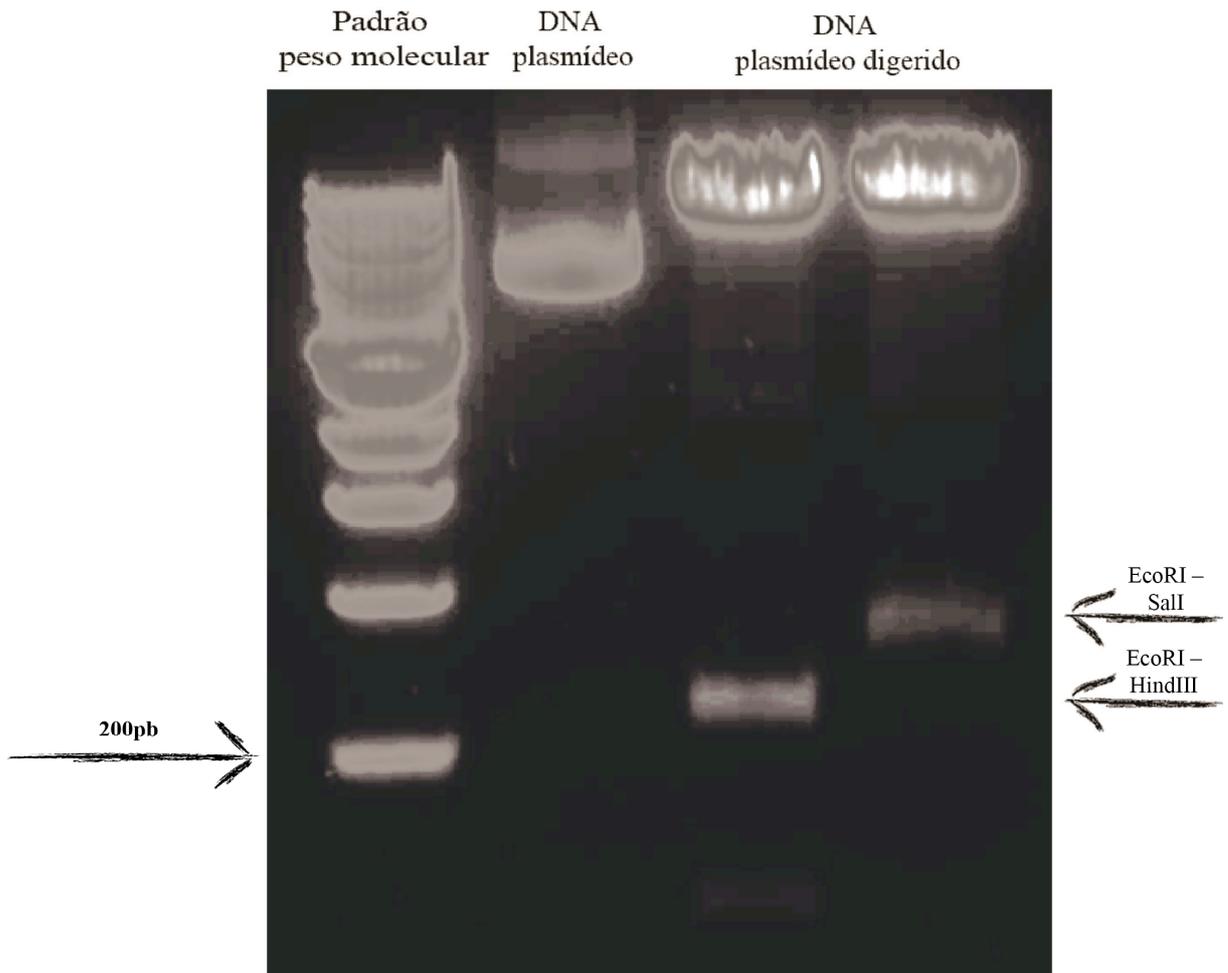


Figura 10 – Bandas resultantes da digestão do DNA com enzimas específicas para o sítio de clonagem. A digestão do DNA com as enzimas EcoRI – HindIII e EcoRI – SalI geram fragmentos de 287 bp e 302pb, respectivamente, para clones positivos.

**APÊNDICE D – ELETROFEROGRAMA EXIBINDO AS SEQUÊNCIAS DOS miRNAs miR-16-1 E miR-15a CONTIDAS NO PLASMÍDEO pSR-miR-15/16-WT**

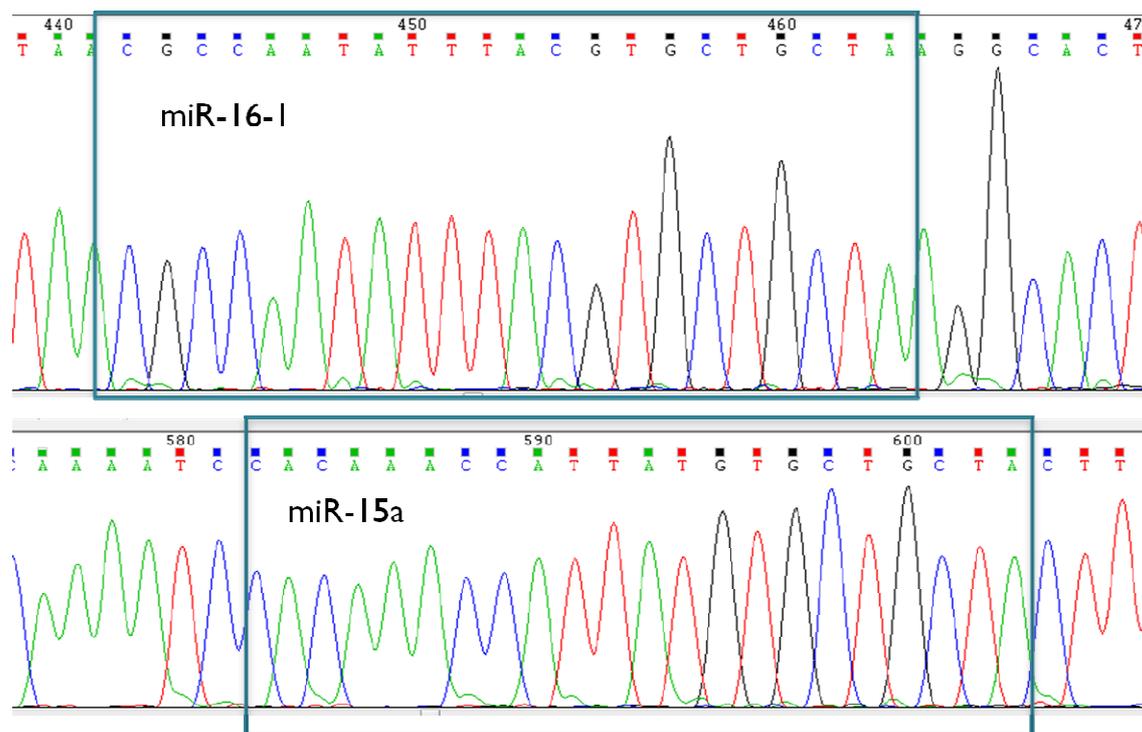


Figura 11 – Eletroferograma exibindo sequência dos miRNAs miR-15a e miR-16-1. Sequenciamento direto do DNA plasmidial pSR-miR-15a/16-1 confirmou a presença do enxerto contendo os miRNAs.

Anexo

## ANEXO A –CÓPIA DA CARTA DE APROVAÇÃO DO COEP



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

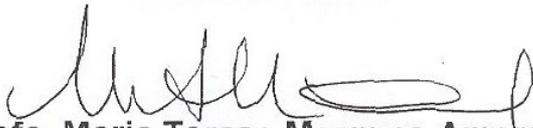
Parecer nº. ETIC 0214.0.203.000-10

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

### DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de fevereiro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da via celular PATCHED1/HEDGEHOG em ceratocisto odontogênico**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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



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