

SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *PRKAR1A* NA ODONTOGÊNESE E
NOS TUMORES ODONTOGÊNICOS MISTOS**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
BELO HORIZONTE
2014**

SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *PRKAR1A* NA ODONTOGÊNESE
E NOS TUMORES ODONTOGÊNICOS MISTOS**

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadores: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Dr.^a Marina Gonçalves Diniz

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE MEDICINA

BELO HORIZONTE

2014

S725a Sousa, Sílvia Ferreira de.
Análise molecular do gene PRKAR1A na odontogênese e nos tumores odontogênicos mistos [manuscrito]. / Sílvia Ferreira de Sousa. - - Belo Horizonte: 2014.
174f.: il.
Orientador: Carolina Cavaliéri Gomes.
Coorientador: Ricardo Santiago Gomez; Marina Gonçalves Diniz.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.
1. Tumores Odontogênicos. 2. Odontogênese. 3. Hibridização In Situ. 4. Patologia Molecular. 5. Subunidade R1alfa da Proteína Quinase Dependente de AMP Cíclico. 6. Dissertações Acadêmicas. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Gomez, Ricardo Santiago. III. Diniz, Marina Gonçalves. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: WU 280

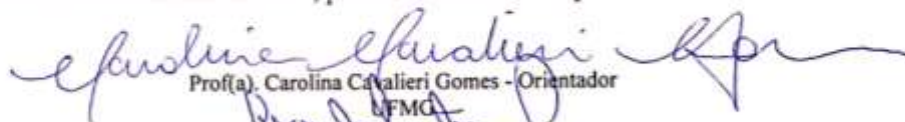
Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca J. Baeta Vianna – Campus Saúde UFMG

ANÁLISE MOLECULAR DO GENE PRKAR1A NA ODONTOGÊNESE E NOS TUMORES ODONTOGÊNICOS MISTOS

SILVIA FERREIRA DE SOUSA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

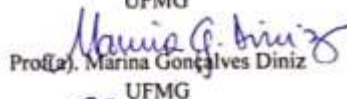
Aprovada em 28 de novembro de 2014, pela banca constituída pelos membros:



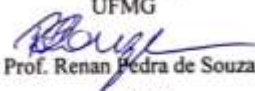
Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador
UFMG



Prof. Ricardo Santiago Gomez
UFMG



Prof(a). Marina Gonçalves Diniz
UFMG




Prof. Renan Pedra de Souza
UFMG



Prof. Geraldo Brasileiro Filho
UFMG



Prof. Fabricio Rezende Amaral
FEAD



Prof. Jean Nunes dos Santos
UFBA

Belo Horizonte, 28 de novembro de 2014.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA SILVIA FERREIRA DE SOUSA - 2011720510

Realizou-se, no dia 28 de novembro de 2014, às 14:00 horas, Sala 3403, Faculdade de Odontologia UFMG, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **ANÁLISE MOLECULAR DO GENE PRKAR1A NA ODONTOGÊNESE E NOS TUMORES ODONTOGÊNICOS MISTOS**, apresentada por SILVIA FERREIRA DE SOUSA, número de registro 2011720510, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carolina Cavaliari Gomes - Orientadora (UFMG), Prof. Ricardo Santiago Gomez (UFMG) coorientador, Prof(a). Marina Gonçalves Diniz (UFMG) coorientadora, Prof. Renan Pedra de Souza (UFMG), Prof. Geraldo Brasileiro Filho (UFMG), Prof. Fabricio Rezende Amaral (FEAD), Prof. Jean Nunes dos Santos (UFBA).

A Comissão considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.
Belo Horizonte, 28 de novembro de 2014.

Prof(a). Carolina Cavaliari Gomes (Doutora)

Prof. Ricardo Santiago Gomez (Doutor)

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz (Doutora)

Prof. Renan Pedra de Souza (Doutora)

Prof. Geraldo Brasileiro Filho (Doutor)

Prof. Fabricio Rezende Amaral (Doutor)

Prof. Jean Nunes dos Santos (Doutor)

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser a força e o refúgio necessários.

À minha mãe, por tantos elogios, incentivos, dedicação, esforço e por me permitir caminhar com segurança.

Ao meu pai, por seu esforço e dedicação para me proporcionar o melhor.

Ao meu marido Marcos, se esforçando há tantos anos comigo nesta longa caminhada.

À minha querida vovó Lena, por suas orações e fé.

Ao Léo, pelo apoio, convivência e amizade.

À Elizete e às minhas pequenas Ana Clara, Júlia e Maria Fernanda, por construírem um novo capítulo na minha vida.

Aos familiares e amigos, sempre presentes, embora eu muitas vezes tão ausente.

À Professora Carolina, pelas oportunidades, incentivos, orientação, momentos partilhados e por ter acreditado no meu trabalho.

Ao Professor Ricardo, pelas oportunidades, profissionalismo e ensinamentos.

À Doutora Marina, pelos ensinamentos e contribuição neste trabalho.

À Professora Vanessa, pela boa convivência e por sua participação essencial neste trabalho.

Aos Professores do *King's College London*: Paul T. Sharpe e Atsushi Ohazama, pelos ensinamentos, orientação e a oportunidade do doutorado sanduíche.

Às amigas do *King's College London*: Lucyene Miguita, Felipe Perozzo, Guilherme Xavier, Maiko Kawasaki, Katsushige Kawasaki, Livia Katanova, Shelly Oommen, Dalea Bukhary, Sandra Gonzalez, Takashi Matsuura,

Leonidas Panousopoulous, Jeya Pratha e Angela Gates, pela diversidade cultural e respeito.

Aos Professores Dawidson Assis Gomes, Martinho Campolina Rebello Horta e Fabrício Rezende do Amaral, pela avaliação e considerações no exame de qualificação.

À aluna de iniciação científica Flávia Soares, pela participação e ajuda na pesquisa, além dos bons momentos partilhados.

Aos amigos e companheiros de Doutorado: Gefter Correa, Fabrício Tinôco e Kelma Campos, pela amizade, conversas, risadas e muitos bons momentos juntos.

Aos amigos do Laboratório de BioMol que por aqui passaram nos últimos 3 anos: Lucyana Farias, Ana Carolina Netto, João Artur Ricieri, Thiago Fonseca, Renata Rezende, Jeane Correia, Clarice Galvão, Bruno Benevenuto e Prof. Adriano Loyola, pelos bons momentos partilhados.

Aos atuais amigos do Laboratório de BioMol: Alessandra, Bruna, Thaís, Elisa, Léo, Josiane, Sara, Núbia, Ana Carolina, Nathália e Grazielle, pela convivência.

Ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina pelos serviços prestados.

Ao Professor e Coordenador do Programa em Medicina Molecular, Luiz Armando De Marco, pelas aulas e auxílios concedidos.

À CAPES, pela concessão de bolsa de estudos.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por proporcionar minha qualificação profissional.

“Há nela, com efeito, um espírito inteligente, santo, único, múltiplo, sutil, móvel, penetrante, puro, claro, inofensivo, inclinado ao bem, agudo, livre, benéfico, benévolo, estável, seguro, livre de inquietação, que pode tudo, que cuida de tudo, que penetra em todos os espíritos, os inteligentes, os puros, os mais sutis. Mais ágil que todo o movimento é a Sabedoria, ela atravessa e penetra tudo, graças à sua pureza. Sou, com efeito, vosso servo e filho de vossa serva, um homem fraco, cuja existência é breve, incapaz de compreender vosso julgamento e vossas leis; porque qualquer homem, mesmo perfeito, entre os homens, não será nada se lhe falta a Sabedoria que vem de Vós.”

Sabedoria 7, 22-24; 9, 5-6.

RESUMO

Os tumores odontogênicos constituem um grupo raro e heterogêneo que guardam muitas similaridades com os germes dentários. Os tumores derivados do epitélio e ectomesênquima odontogênicos com ou sem a formação de tecido duro são classificados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como tumores odontogênicos mistos (TOM). Neste grupo de tumores se encontram o fibroma ameloblástico (FA), no qual é descrita a transformação da contraparte ectomesenquimal em fibrossarcoma ameloblástico (FSA), o fibrodentinoma ameloblástico (FDA) e o fibroodontoma ameloblástico (FOA). A proteína quinase A dependente de AMPc (PKA) é o principal mediador de AMPc em mamíferos e é um tetrâmero composto por duas subunidades reguladoras e duas catalíticas. Dos genes que codificam as subunidades de PKA, o único em que já foi descrito mutações em neoplasias humanas é o *PRKAR1A*. O gene *PRKAR1A* é um gene supressor de tumor que codifica a subunidade reguladora 1 α (R1 α) da PKA. *PRKAR1A* está envolvido na patogênese dos mixomas odontogênicos, um tumor derivado do ectomesênquima do germe dentário, que exhibe perda de expressão da proteína PRKAR1A e presença de mutações. Como os TOM compartilham dessa origem ectomesenquimal, juntamente com a participação do epitélio odontogênico, é possível que possuam similaridades com os mixomas odontogênicos em sua patogênese molecular. Este estudo objetivou investigar o padrão de expressão do gene *PRKAR1A* na odontogênese murina e humana, além de investigar a ocorrência de alterações moleculares deste gene nos FA, FDA, FOA e FSA. Investigamos ainda, se camundongos *Prkar1a*^{+/-} desenvolvem tumores odontogênicos. Para o estudo da odontogênese, embriões humanos e de camundongos em diferentes estágios do desenvolvimento foram processados para análise de expressão do RNAm do *PRKAR1A/Prkar1a* e *PRKAR2A/Prkar2a* por hibridização *in situ whole-mount* e radioativa. Expressão dos transcritos dos genes foi também verificada por qRT-PCR em germe dentário humano. Para investigar as alterações moleculares do *PRKAR1A* nos tumores odontogênicos, foram utilizadas 13 amostras de TOM e as técnicas de qRT-PCR, imunoistoquímica, perda de heterozigosidade (LOH) e sequenciamento direto. Os TOM foram microdissecados e o componente epitelial foi separado do mesenquimal por microdissecção à laser em 7/13 casos. Cabeças de camundongos *Prkar1a*^{+/-} foram incluídas em parafina e coradas por HE. Os genes das subunidades R1 α e R2 α mostraram expressão nos germes dentários de murinos e humanos nas fases da odontogênese avaliadas por hibridização *in situ* ou qRT-PCR. A análise dos tumores odontogênicos mostrou um decréscimo significativo nos níveis de expressão do RNAm de *PRKAR1A* em comparação à mucosa oral normal, enquanto que a expressão de *PRKAR2A* não mostrou diferença entre os grupos. Os TOM exibiram também um padrão variável na imunoexpressão da PRKAR1A, apresentando perda de imunoexpressão em ambos os componentes do tumor e principalmente no ectomesênquima dos FA. Houve LOH na maior parte dos tumores avaliados, sendo que, em todos os tumores benignos que exibiram perda de imunoexpressão, observamos também LOH no locus de *PRKAR1A*. Mutações ainda não descritas foram identificadas em quatro amostras, sendo uma missense, duas silenciosas, além de duas mutações em 5'UTR e quatro mutações intrônicas. Os camundongos *Prkar1a*^{+/-} não mostraram evidência de

formação de tumor odontogênico. Conclui-se que os genes *PRKAR1A/Prkar1a* e *PRKAR2A/Prkar2a* estão expressos durante a odontogênese normal e que a expressão do *PRKAR1A* nos TOM está diminuída. A diminuição na expressão do RNAm e proteína do gene *PRKAR1A* ocorreu juntamente com LOH no locus do gene. Embora a haploinsuficiência de *Prkar1a* em camundongo não tenha sido suficiente para causar tumores odontogênicos, alterações moleculares neste gene estão presentes nos TOM, participando da patogênese molecular destes tumores.

Palavras-chave: odontogênese, tumores odontogênicos mistos, hibridização *in situ*, patologia molecular, *PRKAR1A*.

ABSTRACT

Molecular analysis of *PRKAR1A* gene in odontogenesis and mixed odontogenic tumours.

Odontogenic tumours constitute a rare and heterogenous group which share similarities with the tooth germs. The tumors derived from odontogenic epithelium and odontogenic ectomesenchyme with or without hard tissue formation, were classified by the World Health Organization (WHO) as the mixed odontogenic tumours (MOT). Belong to this group of MOT, ameloblastic fibroma (AF), which is reported the malignant transformation of the ectomesenchymal counterpart into ameloblastic fibrosarcoma (AFS), besides ameloblastic fibrodentinoma (AFD) and ameloblastic fibroodontoma (AFO). cAMP-dependent protein kinase (PKA) is the main mediator of cAMP in mammalian cells, and is a tetramer composed of two regulatory subunits and two catalytic. From genes codifying PKA subunits, the only one associated with human neoplasias is *PRKAR1A*. *PRKAR1A* is a tumour-suppressor gene encoding PKA regulatory subunit 1 α (R1 α). *PRKAR1A* is involved in the pathogenesis of odontogenic myxomas, an odontogenic tumour probably derived from the ectomesenchymal tissue, which revealed decreased *PRKAR1A* protein expression and mutations. As the MOT share this ectomesenchymal origin, together with the participation of the odontogenic epithelium, it is possible that these tumours share similarities with the odontogenic myxomas in their molecular pathogenesis. The aim of this study was to investigate the pattern of expression of *PRKAR1A* in murine and human odontogenesis as well as investigate the occurrence of molecular alterations of *PRKAR1A* in AF, AFO, AFD and AFS. We further investigated if *Prkar1a*^{+/-} mice develop odontogenic tumours. To odontogenesis investigation, mouse and human embryos of different stages of development were processed to analysis of *PRKAR1A/Prkar1a* and *PRKAR2A/Prkar2a* mRNA expression by whole-mount *in situ* and radioactive *in situ* hybridization. The expression of human genes transcripts were also verified by qRT-PCR in human dental germ. To investigate the *PRKAR1A* molecular alterations in odontogenic tumours, 13 samples of TOM were assessed by qRT-PCR, immunohistochemistry, LOH analysis and direct sequencing. The MOT were laser microdissected and the epithelial component was separated from the mesenchymal part by laser microdissection in 7/13 of cases. Mice *Prkar1a*^{+/-} heads were paraffin embedded and stained with HE. The genes of R1 α and R2 α subunits showed expression in stages of odontogenesis in murine and human tooth germs evaluated by *in situ* or qRT-PCR. The odontogenic tumours analysis demonstrated a significantly decreased *PRKAR1A* mRNA levels of expression comparing with normal oral mucosa, while the *PRKAR2A* expression did not show difference between groups. The MOT exhibited a variable immunoexpression pattern of *PRKAR1A* protein, demonstrating loss of immunoexpression in both components of tumour, mainly in the ectomesenchyme of AF. LOH was seen in most tumours evaluated, in which all benign tumours with loss of immunoexpression we still observed presence of LOH in *PRKAR1A* locus. Mutations underreported were identified in four samples, being one missense, two synonymous, besides two mutations in 5'UTR and four intronic

mutations. *Prkar1a* heterozygous mice did not show evidence of odontogenic tumour formation. We conclude *PRKAR1A/Prkar1a* and *PRKAR2A/Prkar2a* are expressed during odontogenesis and the expression of *PRKAR1A* is decreased in MOT. The decreased in expression of mRNA and protein of *PRKAR1A* gene occurred together with LOH in gene locus. Although *Prkar1a* haploinsufficiency in mouse has not been sufficient to cause odontogenic tumours, molecular alterations in *PRKAR1A* are present in MOT, participating of molecular pathogenesis of these tumours.

Key words: odontogenesis, mixed odontogenic tumours, *in situ* hybridization, molecular pathology, *PRKAR1A*

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

μl	Microlitro (s)
μm	Micrômetro (s)
^{32}P	Fósforo radioativo
^{35}S	Enxofre radioativo
^3H	Hidrogênio radioativo
A	Adenina
AA	Anidro acético
AMPc	Monofosfato de adenosina cíclico
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Do inglês: <i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BMP	Do inglês: <i>Bone Morphogenetic protein</i>
BSA	Do inglês: <i>Bovine serum albumin</i>
C	Citosina
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
cDNA	DNA complementar
CNC	Complexo de Carney
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CREB	Do inglês: <i>cAMP response element-binding</i>
CT	Do inglês: <i>Threshold cycle</i>
CTP	Citidina trifosfato
DEPC	Dietilpirocarbonato
dH ₂ O	Água destilada
DIG	Digoxigenina
Dlx	Do inglês: <i>Distal-less homeobox</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease

dNTPs	Desoxinucleotídeos
DTT	Do inglês <i>Dithiothreitol</i>
EDTA	Do inglês: <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
F	Do inglês: <i>Forward</i>
FA	Fibroma ameloblástico
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FDA	Fibrodentínoma ameloblástico
FFPE	Do inglês: <i>Formalin fixed paraffin embedded</i>
FGF	Do inglês: <i>Fibroblast growth factor</i>
FOA	Fibroodontoma ameloblástico
FSA	Fibrossarcoma ameloblástico
g	Força Gravitacional
g/l	Gramas por litro
G	Guanina
GTP	Guanidina trifosfato
h	Hora (s)
Hh	Do inglês: <i>Hedgehog</i>
IHC	Do inglês: <i>Immunohistochemistry</i>
ISH	Do inglês: <i>In situ hybridization</i>
Kb	Quilo pares de base
LB	Luria-Bertani
LOH	Do inglês: <i>Loss of heterozygosity</i>
M	Molar
MAB	Do inglês: <i>Maleic acid buffer</i>
mg/mL	Miligrama por mililitro
MgCl ₂	Cloreto de magnésio

min	Minuto (s)
mL	Mililitro (s)
mM	Milimolar
MOT	Do inglês: <i>mixed odontogenic tumours</i>
MOPS	Do inglês: <i>3-(N-morpholino)propanesulfonic acid</i>
Msx	Do inglês: <i>Muscle segment Box</i>
NaCl	Cloreto de sódio
NaOAc	Acetato de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
Pax	Do inglês: <i>Paired Box</i>
pb	Par (es) de bases
PBS	Do inglês: <i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Do inglês: <i>Polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldeído
PKA	Do inglês: <i>cAMP-dependent protein kinase</i>
<i>PRKAR1A</i>	Do inglês: <i>human Protein kinase cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha</i>
<i>Prkar1a</i>	Do inglês: <i>mouse Protein kinase cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha</i>
<i>PRKAR2A</i>	Do inglês: <i>human Protein kinase cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha</i>
<i>Prkar2a</i>	Do inglês: <i>mouse Protein kinase cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha</i>
qRT-PCR	Do inglês: <i>Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction</i>
R	Do inglês: <i>Reverse</i>
rcf	Força centrífuga relativa
RNA	Ácido ribonucleico
RNAm	RNA mensageiro
Rnase	Ribonuclease
RNasin	Do inglês: <i>Ribonuclease Inhibitor</i>

RNAr	RNA ribossômico
tRNA	Do inglês: <i>Transfer RNA</i>
rpm	Rotações por minuto
s	Segundo (s)
SDS	Do inglês: <i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SHH	Do inglês: <i>Sonic hedgehog</i>
SSC	Do inglês: <i>Saline sodium cytrate</i>
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
TEA	Trietanolamina hidrocloreto
TOM	Tumores odontogênicos mistos
Tris HCl	Do inglês: <i>Tris(hydroxymethyl)aminomethane hydrochloride</i>
TSG	Do inglês: <i>Tumor supressor gene</i>
U/μl	Unidades por microlitro
UK	Reino Unido
UTP	Uridina Trifosfato
UV	Ultravioleta
V	Volts
Wnt	Do inglês: <i>Wingless</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estágios do desenvolvimento dentário de murino e componentes teciduais.	17
Figura 2: Similaridades dos estágios iniciais do desenvolvimento de um molar em embriões humano e de camundongo.	26
Figura 3: Aspectos radiográfico e histopatológico de fibroma ameloblástico.	29
Figura 4: Aspecto histopatológico de fibrossarcoma ameloblástico.	30
Figura 5: Aspecto histopatológico de fibrodentinoma ameloblástico.	32
Figura 6: Aspecto histopatológico de fibroodontoma ameloblástico.	33
Figura 7: Via de ativação da proteína kinase A.	38
Figura 8: Organização éxon-íntron do gene <i>PRKAR1A</i> humano.	40
Figura 9: Representação esquemática dos domínios funcional e estrutural da proteína PRKAR1A e da organização dos éxons (2 – 10) do gene na formação do RNAm maduro do <i>PRKAR1A</i> .	40
Figura 10: Cromossoma 17, locus 24.	83
Figura 11: Secção das cabeças de camundongo <i>Prkar1a</i> ^{+/-} antes da inclusão em parafina.	87

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Descrição dos clones de cDNA dos genes estudados	50
Tabela 2: Dados clinicopatológicos e procedência dos tumores odontogênicos mistos e fibrossarcoma ameloblástico incluídos no estudo	68
Tabela 3: Informações do anticorpo utilizado	79
Tabela 4: Marcadores microssatélites utilizados no estudo	82
Tabela 5: Sequência dos primers dos éxons do gene <i>PRKAR1A</i> e temperaturas de anelamento para os tecidos fresco e parafina	85

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1. Odontogênese	16
2.2. Tumores odontogênicos mistos	27
2.3. PKA/AMPC e o gene <i>PRKAR1A</i>	36
3. OBJETIVOS	46
3.1. Objetivo geral	46
3.2. Objetivos específicos	46
4. METODOLOGIA	47
4.1. Estudo da odontogênese	47
4.1.1. Aspectos éticos	47
4.1.2. Coleta das amostras	48
4.1.2.1. Embriões animais	48
4.1.2.2. Embriões humanos	48
4.1.3. Hibridização <i>in situ</i>	49
4.1.3.1. Preparação das sondas de RNAm	50
4.1.3.2. Hibridização <i>in situ whole mount</i>	57
4.1.3.3. Hibridização <i>in situ</i> radioativa	60
4.1.4. Quantificação relativa dos genes <i>PRKAR1A</i> e <i>PRKAR2A</i> em germe decíduo humano	63
4.2. Estudo dos tumores odontogênicos	65
4.2.1. Primeira parte: qRT-PCR , IHC, LOH e sequenciamento	65
4.2.1.1. Aspectos éticos	65
4.2.1.2. Coleta das amostras	66
4.2.1.3. Descrição das amostras	67

4.2.1.4. Processamento das amostras	69
4.2.1.4.1. Material fresco	69
4.2.1.4.1.1. Extração do DNA do tecido fresco	69
4.2.1.4.1.2. Extração do RNA do tecido fresco	70
4.2.1.4.1.3. Síntese do cDNA e transcrição reversa	71
4.2.1.4.2. Material Parafinado	72
4.2.1.4.2.1. Microdissecção	72
4.2.1.4.2.2. Extração do DNA de tecido parafinado submetido à microdissecção a laser	74
4.2.1.4.2.3. Extração do DNA de tecido submetido à microdissecção manual	75
4.2.1.5. Quantificação relativa dos genes <i>PRKAR1A</i> e <i>PRKAR2A</i>	76
4.2.1.6. Imunoistoquímica para a proteína PRKAR1A	78
4.2.1.7. Perda de heterozigosidade	80
4.2.1.8. Sequenciamento direto	83
4.2.2. Segunda parte: histologia dos animais <i>Prkar1a</i>^{+/-}	86
4.2.2.1. Aspectos éticos	86
4.2.2.2. Descrição das amostras	86
4.2.2.3. Processamento das amostras	86
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	88
5.1. ARTIGO I: “PKA regulatory subunit expression in tooth development”	88
5.2. ARTIGO II: Molecular analysis of <i>PRKAR1A</i> and its locus in odontogenic tumors with epithelium and ectomesenchyme reveals 17q LOH, mutations and loss of PRKAR1A expression	111
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	142
7. CONCLUSÕES	145

REFERÊNCIAS	146
ANEXOS	162
ANEXO I: Carta de Concessão de Bolsa CAPES de Doutorado Sanduíche no exterior	162
ANEXO II – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG	163
ANEXO III – Carta de Anuência da Coordenação da Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas - Faculdade de Odontologia da UFMG	164
APÊNDICES	165
APÊNDICE I.A – Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos	165
APÊNDICE I.B – Termo de consentimento destinado a adolescentes de 13 a 18 anos	166
APÊNDICE I.C – Termo de consentimento destinado a crianças de 7 a 12 anos	168
APÊNDICE I.D – Termo de consentimento destinado a crianças menores de 6 anos	169

1. INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos compreendem um grupo complexo de lesões com comportamento clínico diverso, podendo ser lesões agressivas e destrutivas. Têm sua origem nos tecidos dentais como o epitélio dental, a papila dental e o folículo pericoronário, apresentando assim, tipos histológicos diversos (BARNES *et al.*, 2005). O grupo de tumores composto por epitélio e ectomesênquima odontogênicos é conhecido como tumores odontogênicos mistos (TOM), os quais, histologicamente, lembram vários estágios da formação dentária (TOMICH, 1999).

Constituem o grupo dos TOM, o fibroma ameloblástico (FA), um tumor odontogênico benigno raro, descrito como uma lesão neoplásica verdadeira, na qual é descrita a transformação da contraparte ectomesenquimal em fibrossarcoma ameloblástico (FSA), o fibrodentinoma ameloblástico (FDA), o fibroodontoma ameloblástico (FOA), além do odontoameloblastoma, do tumor dentinogênico de células fantasmas, do tumor odontogênico cístico calcificante e dos odontomas (BARNES *et al.*, 2005).

Devido à origem e similaridade dos tumores odontogênicos com os tecidos dentais em desenvolvimento, estudos moleculares envolvendo o desenvolvimento e a progressão desses tumores, têm focado nos genes da odontogênese e nos genes supressores de tumor, que atuam normalmente como reguladores do crescimento celular (BARRETO *et al.*, 2000; PERDIGÃO *et al.*, 2004; KUMAMOTO, 2006; GOMES E GOMEZ, 2011; FARIAS *et al.*, 2012).

O gene *PRKAR1A* é um gene supressor de tumor que codifica uma subunidade reguladora da principal proteína responsável pelos efeitos do monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) nas células eucarióticas, a proteína quinase dependente de AMPc (PKA) (HORVATH *et al.*, 2010). Redução nos níveis celulares da subunidade reguladora I alfa (RI α) resulta em aumento da via de sinalização PKA/ AMPc e ativação dos processos de proliferação e diferenciação celular (ROBINSON-WHITE *et al.*, 2006).

Mutações em *PRKAR1A* foram vistas em mixomas cardíacos isolados e (MALESZEWSKI *et al.*, 2014) e em mixomas cardíacos componentes da síndrome endócrina múltipla Complexo de Carney (KIRSCHNER *et al.*, 2000a). Devido às similaridades histológicas entre os mixomas cardíacos e os mixomas odontogênicos (um tumor derivado do ectomesênquima do germe dentário), um estudo prévio, conduzido por nosso grupo, investigou alterações neste gene e demonstrou pela primeira vez, a existência de mutações no gene *PRKAR1A* em mixomas esporádicos do tipo odontogênico (PERDIGÃO *et al.*, 2005), levantando a possibilidade do papel deste gene na patogênese molecular deste tumor.

Como os tumores odontogênicos mistos são raros, escassos estudos envolvendo sua patogênese e mecanismos moleculares são encontrados, não sendo ainda, portanto, sua etiopatogênese totalmente elucidada. Acrescenta-se ainda que, a única evidência da participação do *PRKAR1A* na odontogênese até o presente momento, havia sido vista em um único estudo em ratos (YAO E WISE, 2003), em que a subunidade RI α foi a subunidade predominantemente expressa nos folículos de dentes em erupção.

Assim, nosso estudo objetivou investigar o padrão de expressão do gene *PRKAR1A* na odontogênese normal, bem como se as alterações moleculares deste gene encontradas no ectomesênquima dos mixomas odontogênicos são compartilhadas pelo componente ectomesenquimal de FA, FDA, FOA e FSA. Além disso, através de um modelo animal investigamos também a ocorrência de tumores odontogênicos em camundongos heterozigotos para o *Prkar1a*.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Odontogênese

A odontogênese é o resultado de uma série de complexas interações entre dois tecidos adjacentes de origens embriológicas distintas, um epitélio e um mesênquima. A histologia básica do desenvolvimento dentário demonstra que esse processo deriva de dois tipos celulares principais: o ectoderma de revestimento da futura cavidade oral e o ectomesênquima derivado das células da crista neural (COBOURNE E SHARPE, 2003).

O fator indutor inicial está presente no epitélio oral primitivo, que por volta da sexta semana de vida intrauterina começa a proliferar, invadindo o ectomesênquima subjacente com a formação de um espessamento localizado no epitélio do primeiro arco branquial, a banda epitelial primária. Esta banda sofre uma bifurcação e as margens livres desse espessamento dão origem a dois processos, os quais invaginam para o mesênquima subjacente, sendo eles, a lâmina vestibular, ou banda externa, que formará o vestíbulo bucal, demarcado por mucosas jugal e labial. E a banda interna, ou lâmina dentária, processo interno que originará os germes dentários (COBOURNE, 1999). Assim, o primeiro sinal morfológico de desenvolvimento dentário é a formação

da lâmina dentária, que nos camundongos, aparece em torno do dia embrionário 11.5 e nos embriões humanos na sétima semana (TUCKER E SHARPE, 2004) (Figura 1A). Experimentos de recombinação confirmaram que nesse estágio, o potencial de induzir morfogênese dentária reside no epitélio (MINA E KOLLAR, 1987).

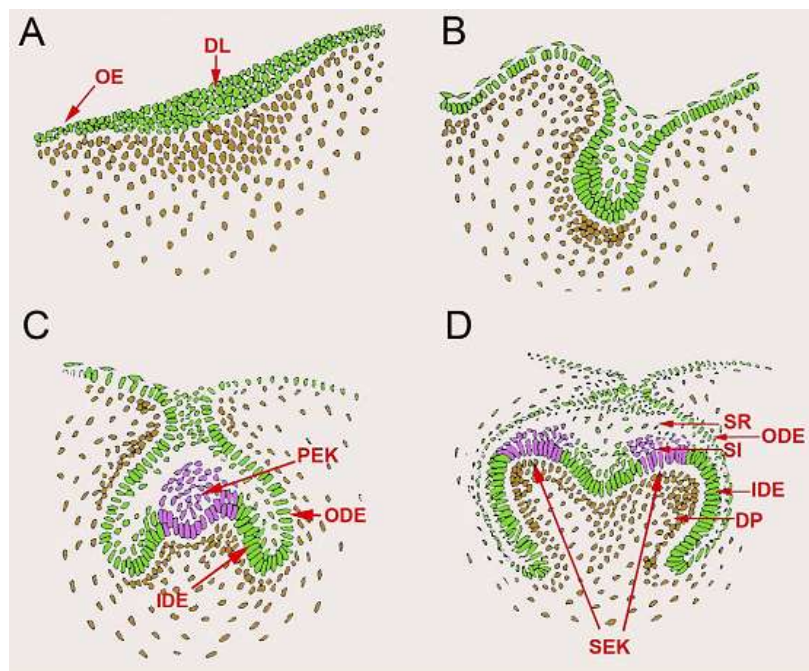


Figura 1: Estágios do desenvolvimento dentário de murino e componentes teciduais. (A) Lâmina dentária; (B) Botão; (C) Capuz; (D) Campânula. Lâmina dentária, *dental lamina* (DL); epitélio oral, *oral epithelium* (OE); epitélio dental externo, *outer dental epithelium* (ODE); epitélio dental interno, *inner dental epithelium* (IDE); nó do esmalte primário, *primary enamel knot* (PEK); nó do esmalte secundário, *secondary enamel knot* (SEK); retículo estrelado, *stellate reticulum* (SR); estrato intermediário, *stratum intermedium* (SI); papila dental, *dental papilla* (DP). Fonte: LESOT E BROOK, 2009

Por volta da sétima semana de gestação humana, e dia embrionário 13.5 nos camundongos, a lâmina dentária sofre então uma invaginação para o mesênquima subjacente dos processos maxilar e mandibular, formando, portanto, botões epiteliais (KAPADIA *et al.*, 2007) (Figura 1B). Nessa fase de botão, dois tipos celulares distintos podem ser distinguidos no epitélio dental: células alongadas em contato com a membrana basal e células internas arredondadas (LESOT E BROOK, 2009). Como o botão dentário invagina para o mesênquima do primeiro arco branquial, ocorre uma condensação localizada de células ectomesenquimais derivadas da crista neural em torno do botão dentário (YEN E SHARPE, 2008; GOVORKO *et al.*, 2010). Proliferações adicionais do botão dental começam a delinear a forma da futura coroa dentária, com um dobramento das extremidades, resultando na formação de um capuz epitelial, por volta da 10ª semana nos humanos e dia embrionário 14.5 nos camundongos (KAPADIA *et al.*, 2007; NANJI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012) (Figura 1C).

Do estágio de botão ao de capuz, o potencial indutivo migra para o mesênquima (KOLLAR E BAIRD, 1970), a complexidade do epitélio dental aumenta e este passa a ser o órgão do esmalte, situado sobre uma grande condensação esférica das células ectomesenquimais ou papila dental (LESOT E BROOK, 2009). Condensações adicionais produzem o folículo dental, o qual começa a encapsular o órgão do esmalte. Juntos, o órgão do esmalte, a papila dental e o folículo dental constituem o germe dentário e irão dar origem às estruturas essenciais dos dentes; o esmalte, o complexo dentino-pulpar e as estruturas periodontais, respectivamente. Ao final desta fase, o órgão do esmalte é composto pelo epitélio externo (células pavimentosas, na região da

convexidade), epitélio interno (células cilíndricas baixas, na região de concavidade) e entre os dois grupos celulares, se encontram as células epiteliais de morfologia estrelada que sintetizam grande quantidade de glicosaminoglicanas, as células do retículo estrelado (NANCI, 2008; LESOT E BROOK, 2009; KATCHBURIAN E ARANA, 2012). Ainda neste estágio, observa-se uma região de células epiteliais não divididas e densamente agrupadas, conhecida como nó do esmalte (THESLEFF *et al.*, 2001) (Figura 1C). Esta região tem importância por ser conhecida como um centro de sinalização embriônico, pela expressão de várias moléculas de sinalização e có-expressão de vários sinais, orquestrando a morfogênese das cúspides (THESLEFF *et al.*, 2001).

Na transição da fase de capuz para a fase de campânula, por volta da 14ª semana de gestação humana e dia embrionário 16.5 nos murinos, importantes alterações denominadas de histodiferenciação, farão com que as células epiteliais semelhantes assumam morfologia e funções distintas (KAPADIA *et al.*, 2007; NANCI, 2008) (Figura 1D). Durante a fase de campânula, o órgão do esmalte progressivamente delimita a papila dental, as cúspides começam a se formar, o tamanho da coroa aumenta e as células que irão produzir os tecidos duros da coroa (ameloblastos e odontoblastos) adquirem seu fenótipo distinto. As células do epitélio externo do órgão do esmalte tornam-se pavimentosas; as do epitélio interno deixam de apresentar os núcleos próximos à papila dentária com morfologia cilíndrica baixa, para diferenciarem-se em pré-ameloblastos, tornando-se cilíndricas altas e com polaridade invertida, ficando os núcleos localizados do lado oposto à lamina basal. Após essa transformação, estimulada pelos pré-ameloblastos inicia-se a

diferenciação das células da papila dentária adjacentes ao epitélio interno em odontoblastos. Os odontoblastos diferenciados invertem a polaridade de seus núcleos e sintetizam a primeira camada de matriz de dentina (dentina do manto). Nesta fase, ainda aparecem entre o epitélio interno e o retículo estrelado, duas ou três camadas de células pavimentosas que constituem o estrato intermediário (KAPADIA *et al.*, 2007; NANCI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012). Experimentos demonstraram que a diferenciação terminal dos ameloblastos requer a interação de pré-ameloblastos com pré-dentina/dentina (ZEICHNER-DAVID *et al.*, 1995) e que o estrato intermediário deva também exercer um papel importante e complementar (GAUNT, 1956). Assim, a presença de dentina do manto, leva à diferenciação dos pré-ameloblastos em ameloblastos, os quais iniciam a síntese da matriz orgânica do esmalte (NANCI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012).

Inicia-se em seguida, o estágio de coroa, cujos principais eventos são a continuação do processo de dentinogênese e amelogênese. A deposição do esmalte e dentina ocorre em sentidos distintos: a do esmalte ocorre de forma centrífuga e da dentina, de forma centrípeta; sendo que, na região mais próxima da cúspide observa-se em estágios mais avançados a diferenciação das células da papila dentária em odontoblastos e de pré-ameloblastos em ameloblastos. (NANCI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012; MAFRA *et al.*, 2012). Durante a dentinogênese, a matriz orgânica secretada pelos odontoblastos inicialmente é composta principalmente por colágeno tipo I, sofrendo posteriormente mineralização. Na amelogênese, o esmalte depositado pelos ameloblastos, é constituído principalmente por proteínas como amelogenina, ameloblastina, enamelina e tufulina (BLUTEAU *et al.*,

2008). Posteriormente, eventos celulares e moleculares levam a uma maturação do tecido, o qual se torna altamente mineralizado, com composição predominantemente inorgânica (cristais de hidroxiapatita) (NANCI, 2008; MAFRA *et al* 2012).

Com o término da deposição do esmalte e da dentina na coroa, o dente inicia a fase de formação da raiz, que coincide com o processo de erupção dentária. Com a proliferação dos epitélios interno e externo do órgão do esmalte, na região da alça cervical (região de encontro dos epitélios interno e externo) são originados o diafragma epitelial e a bainha epitelial radicular de Hertwig, a qual possui a importância de contribuir com a formação da dentina radicular. Uma vez que a bainha radicular tenha se formado, através de estímulos provenientes da bainha de Hertwig, células ectomesenquimais da papila dentária diferenciam-se em odontoblastos, os quais depositam dentina radicular, levando ao crescimento da raiz. As células da bainha de Hertwig, após estimularem a diferenciação dos odontoblastos, cessam sua proliferação, e tornam-se mais distendidas à medida que o comprimento da raiz aumenta. Essa distensão na bainha gera o fenômeno conhecido como fragmentação da bainha de Hertwig (NANCI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012; MAFRA *et al.*, 2012). Após a fragmentação da bainha, grupos isolados de células, conhecidos como restos epiteliais de Malassez, permanecem (NANCI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012; MAFRA *et al.*, 2012). Em adultos, esses restos de células epiteliais persistem próximo à superfície radicular, no ligamento periodontal (NANCI, 2008). A fragmentação da bainha epitelial radicular de Hertwig permite o contato das células ectomesenquimais do folículo dentário com a superfície da dentina radicular, levando à diferenciação

das células formadoras de cimento, os cementoblastos, resultando na deposição da primeira camada de cimento (OHSHIMA *et al.*, 2008). Fibroblastos formadores do ligamento periodontal, e osteoblastos formadores do osso alveolar, também se originam do folículo dentário (OHSHIMA *et al.*, 2008; YEN E SHARPE, 2008). Ao final da formação do dente, o órgão do esmalte se atrofia, com o desaparecimento do retículo estrelado. Os epitélios interno e externo do órgão do esmalte, em conjunto, formam um revestimento (epitélio reduzido do órgão do esmalte) que recobre a coroa dentária até o término do processo de erupção. À medida que o dente erupciona e a coroa penetra o epitélio de revestimento oral, uma fusão ocorre entre o epitélio reduzido do órgão do esmalte e o epitélio oral, contribuindo com a formação do epitélio juncional da gengiva (NANCI, 2008; KATCHBURIAN E ARANA, 2012; MAFRA *et al.*, 2012).

Assim, os dentes representam um órgão que se desenvolve como o resultado de complexas interações epitélio-ectomesênquima. A nível molecular, essas interações envolvem complexas vias de sinalização, compostas de moléculas de sinalização, seus receptores e um sistema de controle de transcrição. Dentre as moléculas envolvidas na transmissão dos sinais na interação dos dois tecidos estão fatores de crescimento (membros da família *Fibroblast growth factors – FGF*, da família *hedgehog*, *Sonic hedgehog – SHH*, da família *Bone Morphogenetic protein – BMP* e da família *Wingless – Wnt*) além de fatores de transcrição (grupos *Distal-less homeobox – Dlx*, *Muscle segment Box – Msx*, *Paired Box – Pax*) (THESLEFF, 2003).

Estudos verificando os padrões de expressão gênica durante a odontogênese têm permitido a caracterização da função de várias dessas

moléculas sinalizadoras envolvidas em regular e direcionar a odontogênese. A expressão de *BMP4* exerce importante função nas interações epitélio-ectomesênquima na odontogênese (COBOURNE, 1999), uma vez que a migração da expressão de *Bmp4* no epitélio dental para o mesênquima subjacente coincide com a mudança do potencial indutivo do epitélio para o mesênquima dental (COBOURNE, 1999). *FGFs* induzem a proliferação do epitélio e do ectomesênquima, sendo várias de suas funções executadas em conjunto com *BMPs*. *Fgfs* foram observados expressos nos estágios iniciais do desenvolvimento dentário, atuando desde o início da odontogênese à formação da última cúspide (ZHANG *et al.*, 2005). *Shh* é o único ligante *Hh* expresso nos dentes, sendo sua expressão restrita ao epitélio nos estágios iniciais. Diversos genes *Wnt* (*Wnt1*, *Wnt2*, *Wnt3*, *Wnt3a*, *Wnt4*) estão expressos na odontogênese somente no epitélio dentário, em contraste com *Wnt5a*, o qual se encontra-se restrito ao mesênquima dental (ZHANG *et al.*, 2005).

Dentre as técnicas de biologia molecular utilizadas nesses estudos de verificação do padrão de expressão gênica do desenvolvimento embrionário, a reação de hibridização *in situ* (ISH – *In situ hybridization*) possui como grande vantagem, a possibilidade de localizar com precisão no tecido parafinado ou fresco, um gene específico ou seus transcritos, permitindo assim, observar a distribuição destes ou do DNA em um tipo de população celular ou em áreas de tecidos adultos ou em desenvolvimento (SILVA-VALENZUELA *et al.* 2006). A determinação dos padrões de expressão temporal e espacial de uma variedade de genes tem contribuído na elucidação da importância desses genes no desenvolvimento e a correlação de sua expressão com a função biológica

(ABRAHAM, 2001). Assim, a visualização de um gene ou seus transcritos é interessante para a análise da sua função (SILVA-VALENZUELA *et al.*, 2006).

As sondas utilizadas na reação de ISH podem ser marcadas com radioisótopos como ^3H , ^{35}S , ^{32}P ; ou com materiais não radioativos, como biotina, digoxigenina, fluoresceína (ABRAHAM, 2001; CHOTTEAU-LELIÈVRE *et al.*, 2006; SILVA-VALENZUELA *et al.* 2006). A técnica radioativa é muito usada em cortes histológicos na investigação de expressão gênica em embriões de camundongos (NIE, 2006; OHAZAMA E SHARPE, 2007; POPP *et al.*, 2009; PORNTAVEETUS *et al.*, 2011; PORNTAVEETUS *et al.*, 2012; CASSIDY E JONES, 2014), apresenta a vantagem de ser mais sensível, enquanto a marcação não-radioativa apresenta-se com maior estabilidade e melhor resolução (ABRAHAM, 2001). Avanços nas técnicas de biologia molecular, permitiram a ISH não-radioativa ser aplicada em *whole-mounts*, que permite a localização da expressão de genes, em embriões inteiros, de tamanho bastante reduzido, sendo, portanto, muito usada nos estudos de padrão de expressão gênica nos estágios iniciais da odontogênese (KYRYACHENKO *et al.*, 2012).

Os camundongos se tornaram o principal organismo para se estudar a odontogênese. Isto se deve, principalmente, a sua disponibilidade para manipulação genética e embriológica (IGNELZI *et al.*, 1995). Além disso, com a capacidade de cultura dos germes dentários em laboratório, o camundongo provou ser um sistema versátil e poderoso para investigações de desenvolvimento dentário (COBOURNE, 1999). Entretanto, a extrapolação de dados nos estudos com murinos para o desenvolvimento da dentição humana, deve ser interpretada com cautela. Isto se deve em parte, às diferenças

fundamentais entre as duas dentições. Camundongos possuem apenas um incisivo e três molares em cada quadrante, sendo incisivos separados dos molares por um diastema (PORNTAVEETUS *et al.*, 2012). Os incisivos possuem erupção contínua por toda a vida e não possuem ameloblastos na superfície lingual, portanto, seu desenvolvimento, particularmente durante os estágios finais, diferem dos incisivos humanos. Além disso, camundongos apenas desenvolvem uma única dentição, diferentemente dos humanos que possuem duas dentições, decídua e permanente (TUCKER E SHARPE, 2004). Desta forma, embora os achados histológicos, particularmente durante os estágios iniciais do desenvolvimento dentário, sejam essencialmente os mesmos (FERGUSON, 1990) (Figura 2) e muitos dos genes que estão envolvidos na odontogênese de camundongos estejam conservados entre as duas espécies, diferenças consideráveis entre os dois sistemas devem existir (COBOURNE, 1999).

Mais de 300 genes foram identificados no desenvolvimento dentário em mamíferos (NIEMINEN *et al.*, 1998), entretanto, enquanto o padrão de expressão de vários genes reguladores e suas funções começaram a ser reveladas no desenvolvimento dentário de camundongos, pouco ainda se sabe sobre a expressão e função dos genes no desenvolvimento dentário humano (DONG *et al.*, 2014).

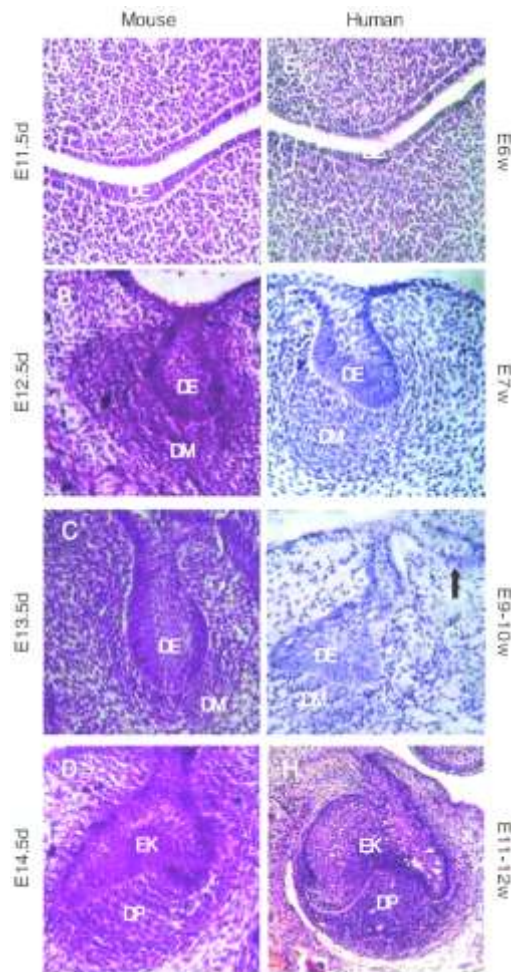


Figura 2: Similaridades dos estágios iniciais do desenvolvimento de um molar em embriões humano e de camundongo. A-D: fases de lâmina dentária (A), botão inicial (B), botão final (C) e capuz (D) em germe dentário de camundongo. E-H: fases de lâmina dentária (E), botão inicial (F), botão final (G) e capuz (H) em germe dentário humano. DE, epitélio dental, *dental epithelium*; DM, mesênquima dental, *dental mesenchyme*; DP, papila dental, *dental papilla*; EK, nó do esmalte, *enamel knot*; d, dia, *day*; w, semana, *week*. Fonte: ZHANG *et al.*, 2005.

2.2 Tumores odontogênicos mistos

Finalizada a odontogênese, resíduos de tecido epitelial e mesenquimal do processo de formação dentária permanecem residentes nos tecidos ósseos e moles dos maxilares. Tais tecidos embrionários podem permanecer adormecidos por um longo período, mas podem também, um período depois, assumir um crescimento ativo, resultando na formação de tumores odontogênicos. Assim, tumores odontogênicos são derivados desses tecidos, tanto do epitélio, quanto do ectomesênquima, como de ambos, sendo classificados de forma geral como tumores epiteliais, tumores mesenquimais e tumores mistos (SCIUBBA *et al.*, 2001; REICHART E PHILIPSEN, 2004; PHILIPSEN *ET AL.*, 2005; MASSEY, 2005).

Os tumores odontogênicos mistos são lesões raras contendo epitélio odontogênico com ectomesênquima odontogênico, com ou sem formação de tecido duro (BARNES *et al.*, 2005). Estão incluídos neste grupo de tumores o fibroma ameloblástico (FA), o fibrodentinoma ameloblástico (FDA), o fibroodontoma ameloblástico (FOA), o odontoameloblastoma, o tumor dentinogênico de células fantasmas, o tumor odontogênico cístico calcificante, além dos odontomas. FA, FDA e FOA histopatologicamente lembram vários estágios do desenvolvimento dentário e exibem também achados clínicos e radiográficos similares, resultando em um debate se representam entidades separadas ou estágios cronológicos da mesma lesão (TOMICH, 1999; BARNES *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2005; BUCHNER E VERED, 2013).

O FA é um tumor misto raro, com frequência relativa dentro do grupo dos tumores odontogênicos variando de 0.6 a 3.1% (BUCHNER E VERED, 2013). É mais comumente encontrado em crianças e adolescentes e

aproximadamente 80% dos casos são diagnosticados antes dos pacientes atingirem 22 anos de idade, idade esta na qual a odontogênese está completa (BUCHNER E VERED, 2013). É debatido se as lesões que ocorrem antes desta idade, seriam neoplasias verdadeiras ou lesões não-neoplásicas hamartomatosas representando o estágio inicial do desenvolvimento de odontomas (BUCHNER E VERED, 2013). Homens são discretamente mais afetados (PHILIPSEN *et al.*, 2005). A região posterior de mandíbula é o sítio predominante de ocorrência e dentes impactados ou não erupcionados estão associados em três quartos dos casos (PHILIPSEN *et al.*, 1997). Clinicamente, apresenta-se como uma lesão expansiva, indolor, de crescimento lento, e em até 20% dos casos, descoberta acidentalmente em radiografias. Radiograficamente, o tumor é caracterizado como uma área radiolúcida bem definida, uni ou multilocular, frequentemente com uma borda esclerótica (Figura 3A) (REICHART E PHILIPSEN, 2004; NELSON E FOLKS, 2009). Macroscopicamente, apresentam-se como uma massa sólida de tecido mole, superfície lisa que pode ser encapsulada ou não (NEVILLE *et al.*, 2011). Histopatologicamente, a porção ectomesenquimal é composta de tecido conjuntivo primitivo, caracterizado por fibroblastos arredondados e angulares, permeados por delicadas fibrilas colágenas, semelhante à papila dental. O componente epitelial se assemelha à lâmina dentária nos estágios iniciais do desenvolvimento dentário e está arranjado em padrões variados – finos e longos cordões, ninhos e ilhotas de epitélio odontogênico proliferativo. Os cordões comumente revelam uma dupla ou tripla camada de células cuboidais em contraste aos ninhos, os quais são revestidos por células colunares semelhantes aos ameloblastos envoltas por células mais frouxamente dipostas,

semelhantes às células do retículo estrelado do órgão do esmalte (Figura 3B) (TAKEDA, 1999). O tratamento consiste na maior parte dos casos em cirurgias conservadoras (enucleação, curetagem, excisão simples), sendo uma menor parte dos casos tratados por ressecção marginal ou segmental (BUCHNER E VERED, 2013). Recorrências de FA foram descritas em 16,3% dos casos, ocorrendo principalmente em pacientes mais jovens. Transformações de um FA em fibrossarcoma ameloblástico (FSA) foram descritas em 6,4% dos casos, sendo 81% deles em pacientes mais velhos (BUCHNER E VERED, 2013).

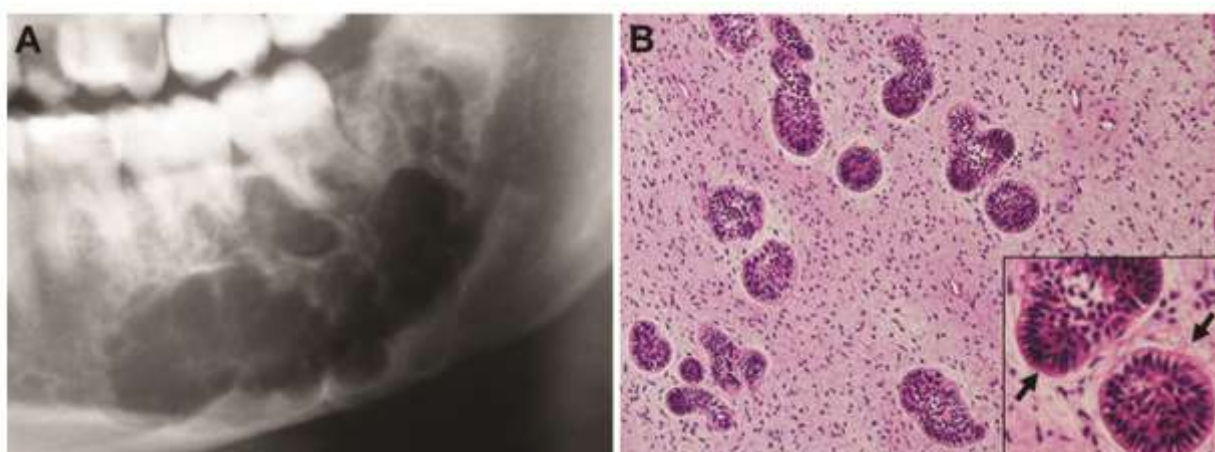


Figura 3: Aspectos radiográfico e histopatológico de fibroma ameloblástico. (A) Imagem radiolúcida multilocular com bordas escleróticas em região posterior de mandíbula. (B) Corte histológico corado em hematoxilina-eosina revela ninhos e folículos de epitélio odontogênico dispersos em um tecido conjuntivo de aspecto imaturo, semelhante ao ectomesênquima da papila dentária. Em uma visão mais aproximada, observa-se que na periferia dos ninhos e folículos, as células apresentavam-se semelhantes aos ameloblastos do órgão do esmalte (setas); e centralmente, notava-se um arranjo mais frouxo. FONTE: Imagem A cedida gentilmente pelo Prof. Ricardo Santiago Gomez. Imagem B, BUCHNER E VERED, 2013.

A contraparte maligna do FA, o FSA, é uma neoplasia rara composta de epitélio ameloblastomatoso benigno e ectomesênquima maligno (REICHART E PHILIPSEN, 2004). Possui predileção pela mandíbula e é mais comumente visto na terceira década de vida, com predominância no gênero masculino

(MULLER *et al.*, 1995; REICHART E PHILIPSEN, 2004). Clinicamente, os pacientes normalmente apresentam-se com aumento de volume doloroso (MULLER *et al.*, 1995; REICHART E PHILIPSEN, 2004) e radiograficamente é visto como lesão radiolúcida multilocular com margens indistintas (MULLER *et al.*, 1995). Microscopicamente, é caracterizado por ilhas de epitélio odontogênico benigno, compostas perifericamente por células colunares ou cubodais dispostas em paliçada e centralmente por células poliédricas semelhantes às do retículo estrelado do órgão do esmalte. Os componentes epiteliais são separados por um estroma ectomesenquimal maligno, que consiste em tecido conjuntivo hipercelularizado com células ora polígono-arredondadas, ora fusiformes, exibindo atipia leve a moderada, além de – numerosas figuras de mitose em uma matriz frouxa (Figura 4). Metastases são raras, mas recorrências têm sido descritas (MULLER *et al.*, 1995; REICHART E PHILIPSEN, 2004). O tratamento de escolha é a excisão cirúrgica com remoção de uma margem de tecido normal (REICHART E PHILIPSEN, 2004).

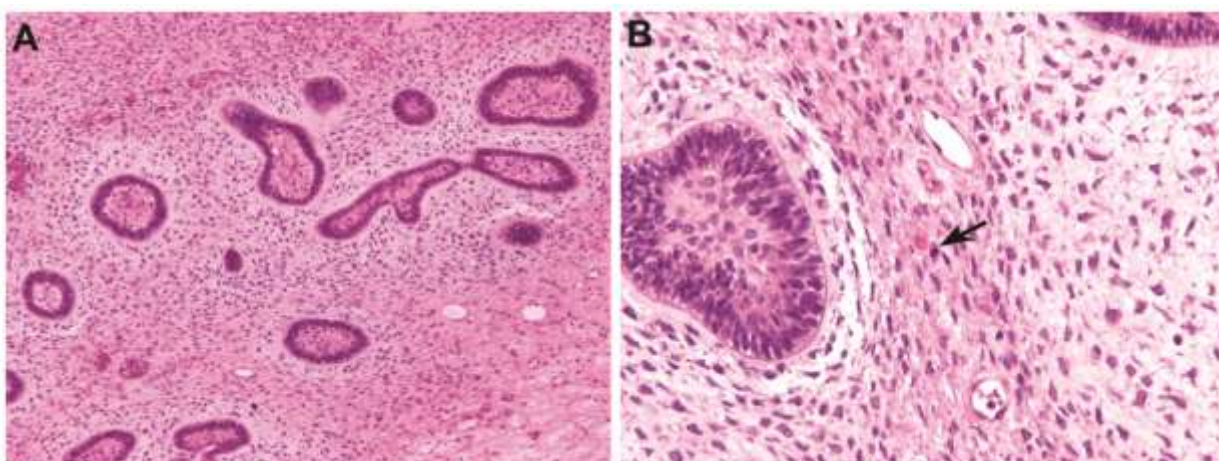


Figura 4: Achados histopatológicos em fibrossarcoma ameloblástico. Os cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina revelam ninhos e folículos de epitélio odontogênico dispostos em um tecido conjuntivo frouxo ricamente celularizado. Nota-se que na periferia dos ninhos e folículos, as células apresentavam-se semelhantes aos ameloblastos do órgão do esmalte e que

centralmente, as células apresentavam-se mais frouxas, semelhante às células do retículo estrelado do órgão do esmalte. (B) Em um maior aumento, observa-se a presença de discreta atipia e figuras de mitose (seta) nas células do ectomesênquima. FONTE: Lâmina cedida gentilmente pelo Prof. Adriano Mota Loyola.

FDA é considerado um tumor extremamente raro, representando menos de 1% de todos os tumores odontogênicos. Para alguns autores representa um estágio intermediário entre FA e FOA (CHEN *et al.*, 2005) e outros, sugeriram que FDA deve sim ser considerado uma entidade separada (REICHART E PHILIPSEN, 2004; PRAETORIUS, 2009). Acomete mais o gênero masculino (PHILIPSEN *et al.*, 1997), sendo mais comum nas primeiras duas décadas de vida (PHILIPSEN *et al.*, 1997). Apresenta-se como um aumento de volume assintomático, de crescimento lento, acometendo principalmente a região posterior de mandíbula e comumente pode estar associado com um dente não erupcionado. Quando associado ao dente decíduo, normalmente acomete a região de incisivo (PHILIPSEN *et al.*, 1997). Radiograficamente, aparece como uma lesão radiolúcida bem delineada com graus variáveis de radiopacidade, devido à formação de dentina. Histopatologicamente, FDA é composto por ectomesênquima odontogênico que se assemelha à papila dentária, permeado por cordões e ninhos de epitélio odontogênico semelhantes à lâmina dentária e ao órgão do esmalte, contando ainda, com a presença de formação de material dentinoide (Figura 5) (BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013). Normalmente, possuem uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso e a cirurgia conservadora como uma simples enucleação é o tratamento de escolha (SANKIREDDY *et al.*, 2013). FDA tem sido descrito sofrer raramente uma transformação maligna como fibrodentinossarcoma ameloblástico, no qual apenas o componente

mesenquimal mostra transformação maligna (TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2011; GIRADDI E GARG, 2012).

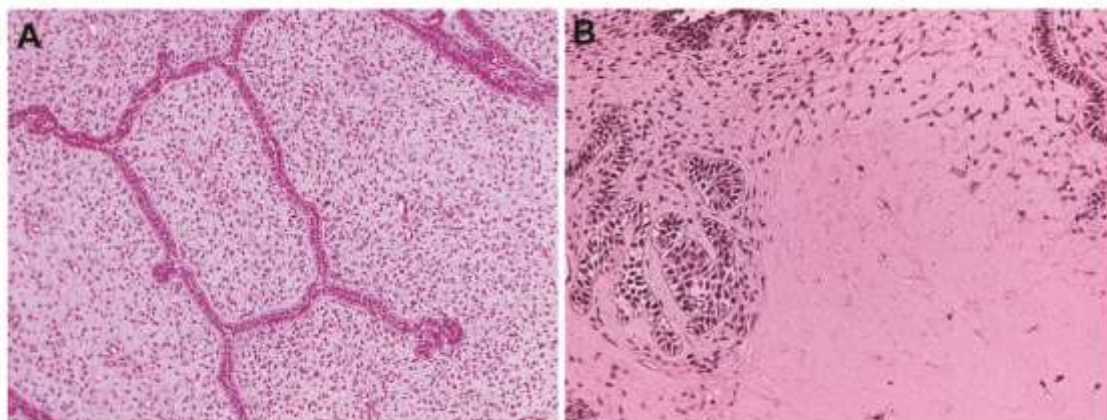


Figura 5: Achados histopatológicos em fibrodentinoma ameloblástico. (A) Os cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina revelam finos e longos cordões de epitélio odontogênico dispostos em um tecido conjuntivo frouxo, ricamente celularizado, semelhantes ao ectomesênquima da papila dentária. Por vezes, nota-se que alguns cordões exibem células da periferia semelhantes aos ameloblastos do órgão do esmalte, além de células centrais mais frouxamente arranjadas. (B) Em uma visão mais aproximada, nota-se a presença de dentina permeando as células ectomesenquimais. FONTE: Arquivo da Faculdade de Odontologia da UFMG.

O FOA é um tumor raro, de crescimento lento com achados histopatológicos similares aos do FA, mas com alterações indutivas que levam à formação de esmalte e dentina (BARNES *et al.*, 2005). Alguns autores o consideraram como um estágio imaturo de um odontoma complexo (SLOOTWEG, 1981). É também usualmente diagnosticado durante a primeira e segunda década de vida, entretanto, acomete com igual frequência maxila e mandíbula e sem predileção significativa por gênero (BARNES *et al.*, 2005). Clinicamente, apresenta-se indolor, de crescimento lento e que usualmente pode mostrar expansão com o tempo (BUCHNER *et al.*, 2013). Radiograficamente, assim como o FDA, exibe uma área radiolúcida bem definida, contendo quantidades variadas de material radiopaco de tamanhos

diversos (BUCHNER *et al.*, 2013). Histopatologicamente, é composto por ilhotas, cordões e ninhos de epitélio odontogênico dispersos em um ectomesênquima primitivo ricamente celularizado que se assemelha à papila dentária, contendo ainda matriz de esmalte e dentina (Figura 6) (KRAMER *et al.*, 1992). Apresenta-se como lesão encapsulada, não invasiva localmente e, portanto, o tratamento de escolha é conservador, a enucleação com curetagem. É um tumor não recorrente, entretanto, as possíveis causas descritas para recorrência, são lesões associadas a gemas dentários, um tumor relativamente grande e enucleação insuficiente (SREENATH *et al.*, 2014). A contraparte maligna do FOA é descrita como o fibroodontossarcoma ameloblástico, no qual apenas o componente mesenquimal sofreria a transformação maligna. Entretanto, os mecanismos dessa e das transformações malignas dos demais tumores descritos, permanece desconhecida (WANG *et al.*, 2011).

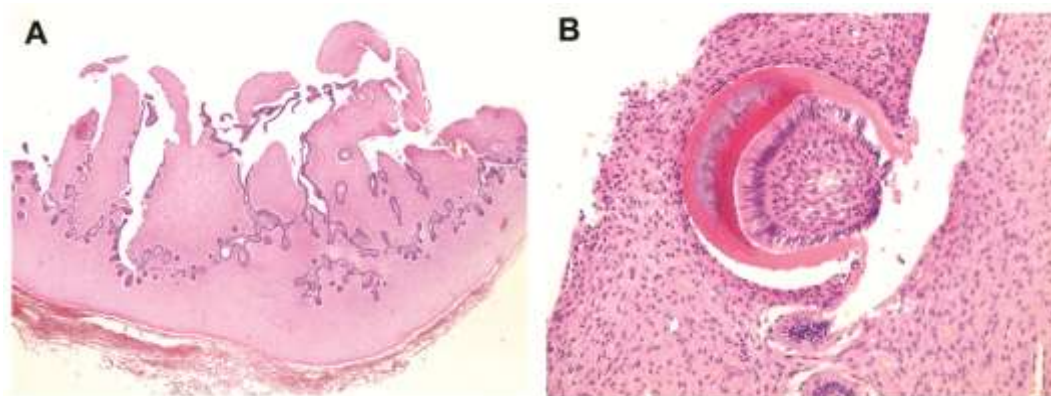


Figura 6: Achados histopatológicos em fibroodontoma ameloblástico. (A) Corte histológico corado em hematoxilina-eosina revela ninhos e folículos de epitélio odontogênico permeados por um tecido conjuntivo de aspecto imaturo, semelhante ao ectomesênquima da papila dentária. Observe-se presença de cápsula de tecido conjuntivo revestindo toda a lesão. Em uma visão mais aproximada, nota-se a presença de matriz de esmalte e dentina justapostas a ilha de epitélio odontogênico com células periféricas semelhantes às células do retículo estrelado do órgão do esmalte, bem como células mais frouxamente

arranjadas na porção central. FONTE: Imagens cedidas gentilmente pelo Prof. Martinho Campolina Rebelo Horta.

Por serem os tumores odontogênicos mistos raros, escassos estudos envolvendo sua patogênese e mecanismos moleculares são encontrados, não sendo ainda, portanto, sua etiopatogênese claramente elucidada. A maior parte dos estudos envolvendo FA, FDA, FOA e FSA são baseados na detecção imunohistoquímica de marcadores tumorais de diagnóstico e prognóstico dessas lesões. Estudos envolvendo FA e FDA foram feitos contemplando a identificação imunohistoquímica de diversas citoqueratinas para caracterização das células tumorais e como forma de explicar a histogênese de algumas lesões (CRIVELINI *et al.*, 2003; PELISSIER *et al.*, 1990; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013). A atividade de proliferação do epitélio e mesênquima dos tumores mistos também tem sido investigada por imunohistoquímica como forma de mensurar a agressividade desses tumores (MARTINS *et al.*, 2001; SANO *et al.*, 1998; PONTES *et al.*, 2010; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013). A atividade apoptótica como mecanismo de crescimento tumoral, também foi avaliada em alguns trabalhos (ALAEDINI *et al.*, 2008; PONTES *et al.*, 2010). Como os tumores odontogênicos frequentemente mostram achados histopatológicos similares às estruturas envolvidas na amelogênese, estudos investigaram também a imunoposição de proteínas odontogênicas associadas aos ameloblastos, como amelotina, ameloblastina e amelogenina (MORI *et al.*, 1999; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013).

Por outro lado, escassas investigações de alterações moleculares em FA, FDA, FOA e FSA são vistas. Um estudo de instabilidade cromossômica avaliando a ploidia do DNA de três FA e cinco FSA por citometria de fluxo

(MULLER *et al.*, 1995), mostrou que os casos de FA eram diplóides, sendo que a análise de DNA no epitélio e mesênquima, mostrou quantidades nucleares de DNA similares. Quatro casos de FSA eram diplóides, entretanto, um caso apresentou análise nuclear diplóide no epitélio, enquanto o componente mesenquimal demonstrou um pico diplóide e outro aneuplóide (MULLER *et al.*, 1995), reforçando a teoria do componente mesenquimal sofrer transformação maligna. Um estudo mais recente investigou a instabilidade genética em tumores odontogênicos mistos (FA, FSA e FOA) através de um painel de marcadores microssatélites para regiões cromossômicas que contêm genes supressores de tumor já encontrados alterados em muitas neoplasias humanas (GALVÃO *et al.*, 2012). A frequência de perda alélica encontrada nos FSA foi maior que a encontrada nos FA e FOA, sendo que o marcador TP53 foi o que mostrou as taxas mais altas, uma vez que 5/8 casos informativos, mostraram perda de heterozigosidade para esse marcador. Em consonância com os achados de GALVÃO *et al.* (2012), recentemente, um estudo investigou por análise citogenética clássica, uma amostra fresca de FOA (MANOR *et al.*, 2012). Após cultura celular e análise de mais de 25 metáfases, o cariótipo citogenético foi descrito como normal (MANOR *et al.*, 2012), em contraste com a LOH da região 9p22-p13 descrita para uma de três amostras de FOA investigada anteriormente (GALVÃO *et al.*, 2012).

Observa-se assim, que são poucos os estudos moleculares que de fato investigaram a patogênese desses tumores. E que mesmo os que se propuseram a estudar, consistem em um pequeno número de casos em função da raridade dessas lesões.

2.3 PKA/AMPC e o gene *PRKAR1A*

Os principais determinantes da morfologia e do funcionamento de uma célula são as proteínas por ela expressas. Dentre essas proteínas, estão as proteínas quinases, que são enzimas que catalisam a fosforilação de proteínas por meio da transferência de um grupo fosfato para resíduos de tirosina, treonina e serina (BUNZ, 2008). A proteína ativada por concentrações de monofosfato de adenosina cíclico (AMPC) e, por isso, conhecida como proteína quinase AMPC dependente (PKA) altera as atividades das proteínas-alvo fosforilando grupos específicos de serina e, em menor quantidade, a treonina (WALSH *et al.*, 1968). PKA é a principal mediadora dos efeitos de AMPC nas células eucarióticas, regulando vários processos celulares como crescimento, metabolismo, expressão gênica, desenvolvimento e memória (ALMEIDA E STRATAKIS, 2011; KOTANI *et al.*, 2010; AMIEUX *et al.*, 2002).

Em seu estado inativo, a PKA é um tetrâmero composto por duas subunidades reguladoras (nem sempre iguais) ligadas cada uma a uma subunidade catalítica. Foram identificadas em humanos quatro subunidades reguladoras codificadas por genes distintos: R1 α (*PRKAR1A*), R2 α (*PRKAR2A*), R1 β (*PRKAR1B*), e R2 β (*PRKAR2B*) e quatro subunidades catalíticas (C α (*PRKACA*), C β (*PRKACB*), C γ (*PRKACG*) e Prkx (*PRKX*). Dessas subunidades, apenas R1 α , R2 α , e C α são descritas como amplamente expressas nos tecidos, sendo as demais restritas a alguns tipos. Duas isoenzimas denominadas PKA tipo I e II foram identificadas. PKA tipo I contem as subunidades R1 α ou R1 β na sua estrutura; PKA tipo II contem as subunidades R2 α ou R2 β . Desta forma, os complexos estruturais possíveis para a PKA são R1 α ₂C₂, R1 β ₂C₂, R2 α ₂C₂, R2 β ₂C₂ e R1 α R1 β C₂ (BOSSIS E STRATAKIS, 2004;

MEOLI *et al.*, 2008; ALMEIDA E STRATAKIS, 2011). Alguns estudos mostraram a PKA I diretamente envolvida em proliferação celular e transformação neoplásica (CHO-CHUNG AND CLAIR, 1993; ROHLFF *et al.*, 1993; TORTORA *et al.*, 1990) e a PKA II, a qual é preferencialmente expressa em tecidos normais, parece estar mais envolvida com inibição do crescimento celular e diferenciação (BOYNTON AND WHITFIELD, 1980; FELICIELLO *et al.*, 2000).

O AMPc é um segundo mensageiro que provoca respostas celulares muito distintas segundo o tipo de célula em que atua. Classicamente, o AMPc intracelular é produzido por meio da ativação da adenilato ciclase ligada a receptores acoplados à proteína G. Uma vez aumentadas as concentrações intracelulares de AMPc, o tetrâmero da PKA é ativado pela ligação de duas moléculas de AMPc cada, a duas subunidades reguladoras, o que leva a dissociação do tetrâmero em dímeros reguladores e duas subunidades catalíticas livres (BOSSIS E STRATAKIS, 2004; HORVATH *et al.*, 2010). Estas subunidades catalíticas livres são enzimaticamente ativas e fosforilam alvos como a proteína ligante de elementos responsivos ao AMPc (*cAMP response element-binding* – CREB) (Figura 7). A proteína alvo CREB irá se unir e ativar a proteína nuclear CBP (do inglês, *CREB binding protein*). O complexo CREB-CBP são fatores de transcrição ativadores de genes envolvidos com a proliferação e a diferenciação celular. (ALMEIDA E STRATAKIS, 2011).

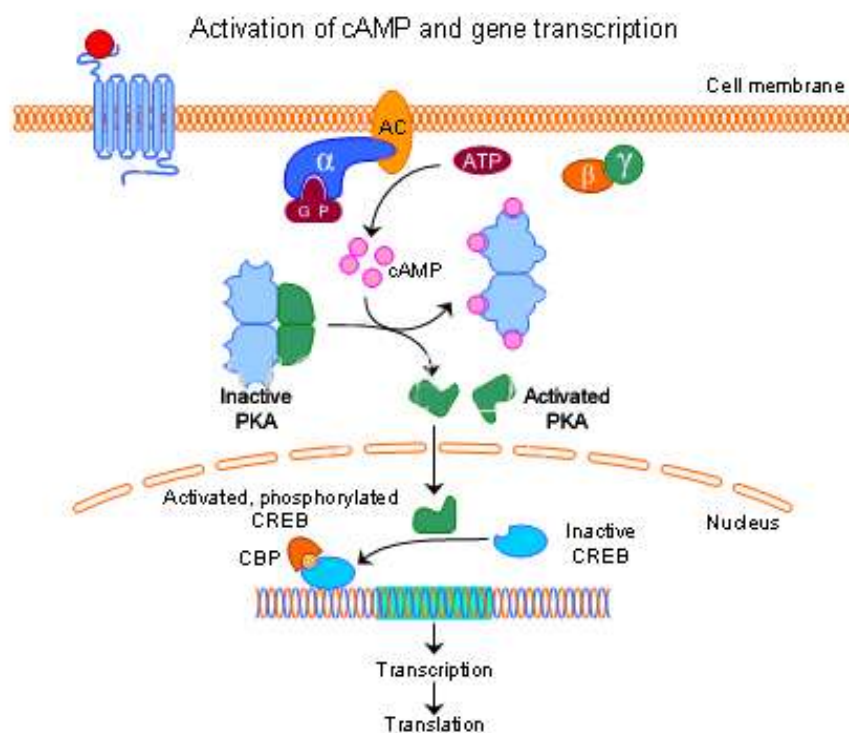


Figura 7: Via de ativação da proteína kinase A (PKA). A PKA inativa é um tetrâmero composto por duas subunidades reguladoras e duas subunidades catalíticas unidas entre si. Uma substância indutora se liga ao receptor transmembrana e induz a ativação da proteína G, que se dissocia nas subunidades α GTP e complexo $\beta\gamma$. A proteína G interage com a enzima adenilato ciclase (AC), que a partir da adenosina trifosfato (ATP) produz a adenosina monofosfato cíclico (AMPc). O aumento do AMPc no citosol, ativa a PKA, fazendo com que a holoenzima se dissocie em um dímero de duas subunidades reguladoras, ligadas a duas moléculas de AMPc e duas subunidades catalíticas (C) ativas. As subunidades C quando ativas, entram no núcleo e fosforilam substratos como a proteína ligante de elementos responsivos ao AMPc (CREB), a qual irá se unir e ativar a proteína nuclear CBP (do inglês, CREB binding protein). O complexo CREB-CBP atua como fatores de transcrição ativadores de genes envolvidos com a proliferação e a diferenciação celular. FONTE: Imagem adaptada de <http://www.motifolio.com/5111139.html>.

A sinalização PKA/AMPc tem sido extensivamente estudada por muitos anos e parece exercer função importante nos estágios iniciais do desenvolvimento embrionário (AMIEUX *et al.*, 2002), principalmente durante os processos de diferenciação do mesoderma e ectoderma embrionários, a

sinalização da PKA é essencial e interage com uma série de outras vias na morfogênese inicial (AMIEUX E MCKNIGHT, 2002, BOSSIS E STRATAKIS, 2004).

A subunidade R1 α foi descrita como a principal subunidade reguladora responsável por manter a subunidade catalítica sobre controle durante os processos fisiológicos (BOSSIS E STRATAKIS, 2004). Estudos de clonagem e de genes *knockout* nas subunidades reguladoras têm confirmado a função essencial da R1 α em manter o controle da atividade da PKA através de mecanismos compensatórios garantindo uma regulação balanceada das subunidades catalíticas livres (AMIEUX E MCKNIGHT, 2002). Estudos em genes da subunidade da PKA em camundongos mostrou que inativações na subunidade R2 α não levaram a nenhum defeito no desenvolvimento e os animais eram saudáveis e férteis, enquanto na subunidade R1 α resultaram em fenótipo alterado, com desenvolvimento insuficiente do mesoderma (BURTON *et al.*, 1997; AMIEUX *et al.*, 2002). É descrito também que na ausência de R1 α normal, parece haver uma estimulação aumentada por AMPc; talvez mediada pela superexpressão de genes codificantes de outras subunidades reguladoras do complexo PKA (KIRSCHNER *et al.*, 2000a). Este tipo de resposta compensatória foi demonstrada em modelos animais com ausência de uma das subunidades da PKA na sua forma holoenzimática (CUMMINGS *et al.*, 1996; AMIEUX *et al.*, 1997).

O gene *PRKAR1A*, que codifica a subunidade R1 α da PKA está localizado no cromossoma 17q24. É composto por 11 éxons, sendo 10 destes com região codificadora de 1146 pares de base, começando a transcrição no exon 2 (HORVATH *et al.*, 2010) (Figura 8). A proteína R1 α é constituída por

381 aminoácidos organizados em um domínio de dimerização na porção amino terminal, seguido de um sítio inibidor de PKA, dois sítios de ligação do AMPc e uma região que contém o principal sítio ligante da subunidade C (ZAWADZKI E TAYLOR, 2004) (Figura 9).

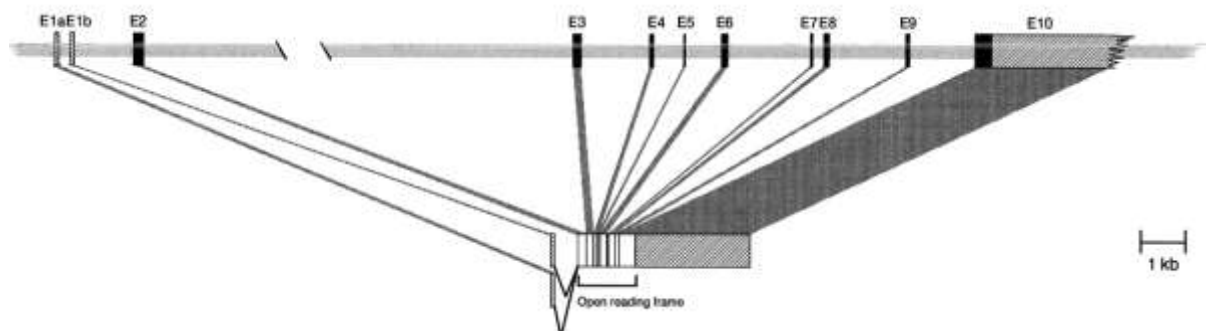


Figura 8: Organização éxon-intron do gene *PRKAR1A* humano. Éxons estão numerados como E1a/b – E10 e são representados nas áreas pretas pelas sequências codificadoras e nas áreas hachuradas pelas sequências não codificadoras. As regiões dos íntrons são representadas pela linha sombreada. Contribuição dos diferentes éxons para o RNAm processado. Éxons alternativos 1a e 1b dão origem a dois RNAm diferentes. Fonte: Adaptada de SOLBERG *et al.*, 1997

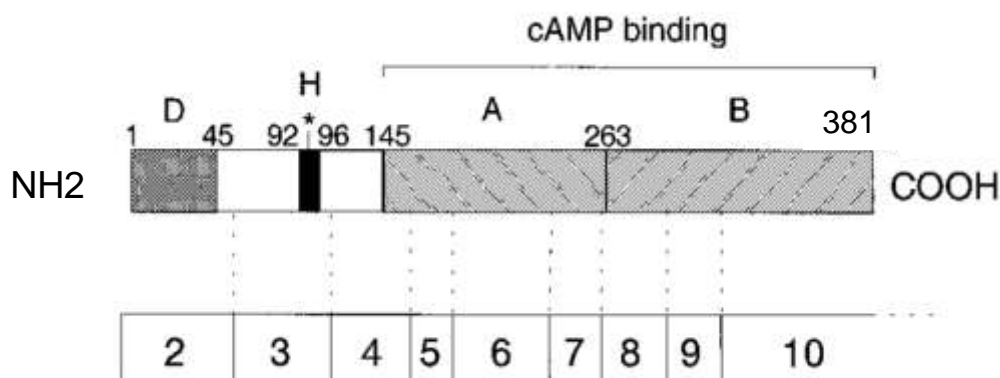


Figura 9: Representação esquemática dos domínios funcional e estrutural da proteína PRKAR1A e da organização dos éxons (2 – 10) do gene na formação do RNAm maduro do *PRKAR1A*. D, domínio de dimerização (resíduos 1 – 45); H, *hinge* (resíduos 92 – 96); * Sítio pseudosubstrato; A e B, domínios de ligação do AMPc, sendo domínio A (resíduos 145 – 262) e domínio B (resíduos

263 – 381). NH₂, extremidade amino- terminal; COOH, extremidade carboxi-terminal. FONTE: Adaptado de SOLBERG *et al.*, 1997

PRKAR1A parece funcionar como um clássico gene supressor de tumor. Genes supressores de tumor (*Tumor suppressor genes* – TSGs) codificam proteínas que normalmente inibem a divisão das células ou causam morte celular, prevenindo a formação de tumores. Mutações nesses genes resultam em perda da sua função, a qual é a habilidade de inibir o crescimento celular (BUNZ, 2008). A primeira demonstração do envolvimento da PKA com doença humana foi o achado de que mutações inativadoras em *PRKAR1A* eram responsáveis pelo complexo de Carney (CNC) na maioria dos pacientes (KIRSCHNER *et al.*, 2000a,b), sendo R1 α até o momento a única subunidade da PKA na qual mutações encontradas levaram a doença humana (HORVATH *et al.*, 2010).

A CNC é uma síndrome autossômica dominante neoplásica endócrina múltipla, relativamente rara, inicialmente descrita por Dr. Carney em 1985 como um “complexo de mixomas, pigmentações irregulares e superatividade endócrina” (CARNEY *et al.*, 1985). Os indivíduos portadores desta condição apresentam frequentemente manifestações cutâneas como o lentigo, o nevus azul e os mixomas cutâneos. Já os mixomas cardíacos são as lesões não-cutâneas mais significativas. Além da presença de tumores endócrinos como doença adrenocortical pigmentar nodulada e Síndrome de Cushing-independente do hormônio adrenocorticotrópico. O diagnóstico é feito se duas ou mais das principais manifestações da síndrome estão presentes, entretanto, o diagnóstico pode ser feito se apenas uma destas principais características

estiver presente e o indivíduo possuir uma conhecida mutação de *PRKAR1A* (STRATAKIS *et al.*, 2001; ROTHENBUHLER *et al.*, 2010).

De acordo com a teoria clássica de Knudson (hipótese *two-hit*), duas alterações genéticas ou *hits*, seriam necessários para a inativação de um TSG (KNUDSON, 1985). O primeiro *hit* seria uma mutação inativadora de um dos alelos, adquirida por mutação somática ou, alternativamente, por mutação na linhagem germinativa. Essas mutações do primeiro *hit* seriam mutações pontuais ou pequenas deleções. Esse alelo inativado por si só não conferiria nenhum fenótipo, mas causaria um risco aumentado do alelo se tornar bialelicamente inativado. O segundo *hit* para a inativação total do gene seria então a perda do alelo normal remanescente decorrente de uma grande deleção de parte do cromossomo (VELASCO *et al.*, 2008).

Um dos achados fundamentais na descoberta da natureza recessiva dos TSG foi a perda de heterozigosidade (*Loss of heterozygosity* – LOH), que representa a redução para a homozigosidade de um locus que era heterozigoto previamente (BUNZ, 2008). A LOH seria o segundo *hit* predito por Knudson e representa a perda do alelo selvagem remanescente de um TSG recessivo. Assim, uma célula contém dois cromossomos homólogos, sendo que um dos cromossomos pode já conter alterações genéticas e durante o processo de tumorigênese, adquirir o segundo *hit* (BUNZ, 2008). A LOH pode ocorrer através de diferentes mecanismos, tais como, perda de todo um cromossomo (por erros de não disjunção na mitose) e conversão gênica ou recombinação mitótica (resultando na perda de uma porção do cromossomo), que são mecanismos que envolvem regiões extensas de DNA, além de serem decorrentes de mutações localizadas (o alelo selvagem remanescente pode ser

perdido por uma segunda mutação). Análises de LOH permitem a identificação de um dos dois *hits*. Diferentes técnicas podem ser utilizadas para avaliar a LOH, sendo mais usada a reação em cadeia da polimerase (PCR) de regiões de microssatélites (VELASCO *et al.*, 2008).

Em pacientes portadores de CNC (STRATAKIS *et al.*, 2001), mutações em *PRKAR1A* estão associadas com perda do alelo normal, como demonstrado por estudos de LOH em lesões causadas por CNC (STRATAKIS *et al.*, 2001), reforçando a sua natureza supressora e recessiva. Mutação somática e LOH no locus 17q *PRKAR1A* foi também demonstrada em tumores adrenocorticais esporádicos benignos e malignos (BERTHERAT *et al.*, 2003).

Os achados de que mutações e LOH não necessariamente coexistem no mesmo tumor, levou a uma reavaliação do clássico modelo *two-hit* de inativação de um TSG proposto por Knudson (QUON E BERNES, 2001; VELASCO *et al.*, 2008). Assim, em certas circunstâncias, *um hit* pode ser suficiente para a inativação de um TSG (teoria da haploinsuficiência) (QUON E BERNES, 2001; VELASCO *et al.*, 2008). Estudos em humanos e camundongos mostraram que a haploinsuficiência do *PRKAR1A* predispõe ao desenvolvimento de neoplasias (KIRSCHNER *et al.*, 2000a; KIRSCHNER *et al.*, 2005). A haploinsuficiência de *Prkar1a* em camundongos levou ao desenvolvimento de tumores em tecidos responsivos ao AMPc, incluindo a ocorrência de schwannomas não-pigmentados, lesões fibro-ósseas e tumores benigno e maligno em tireóide (KIRSCHNER *et al.*, 2005), o que sugere, que a haploinsuficiência do *PRKAR1A* leve a aumento de proliferação celular e consequentemente está associada à tumorigênese.

A região franca de leitura (*Open Reading Frame* – ORF) dos TSGs são comumente truncadas por mutações do tipo *nonsense* (que resultam em um códon de parada), pequenas inserções ou deleções, ou mutações em regiões de *splice* (locais de remoção dos íntrons na junção éxon-intron durante o processamento do pré-RNA). Além disso, TSGs podem ser inativados por substituições de um único nucleotídeo que alteram resíduos-chave nas proteínas supressoras de tumor, causando, portanto, uma alteração na proteína codificada (BUNZ, 2008). Revisões de CNC mais recentes apontam 117 mutações envolvendo o *PRKAR1A* identificadas em 387 famílias não relacionadas, de origens étnicas diversas (HORVATH *et al.*, 2010). Dentre as principais alterações moleculares encontradas nesse gene estão: substituição de uma única base e pequenas (até 15pb) deleções, inserções ou rearranjos combinados, encontrados por toda a estrutura de leitura do gene (HORVATH *et al.*, 2010). KIRSCHNER *et al.* (2000b) apontou que as mutações tendiam a se concentrar em alguns éxons, com a maioria ocorrendo nos éxons 2 e 6 e que por outro lado, o éxon 4B seria o éxon mais comumente mutado pelo mesmo defeito genético (578delTG). Apenas 17% (20/117) das mutações já descritas para o gene *PRKAR1A* no CC resultam na expressão de uma proteína alterada, enquanto 82,9% (97/117) geram um códon de parada prematuro (HORVATH *et al.*, 2010). Mutações deste tipo resultam em uma redução de 50% nos níveis celulares de *PRKAR1A*, ocorrendo assim, uma maior proporção da subunidade catalítica em relação à reguladora, gerando aumento na sinalização e ativação dos processos celulares como proliferação e diferenciação celular (HORVATH *et al.*, 2010).

Como as mutações no *PRKAR1A* parecem ser as causadoras da síndrome de Carney, em que os mixomas cardíacos e de pele são componentes, PERDIGÃO *et al.* (2005), devido às similaridades histológicas entre os mixomas cardíacos e os mixomas odontogênicos (um tumor derivado do ectomesênquima do germe dentário), investigaram pela primeira vez a ocorrência de alterações no gene *PRKAR1A* em mixomas odontogênicos esporádicos, de pacientes sem achados de CNC ou de qualquer outra síndrome neoplásica múltipla (PERDIGÃO *et al.*, 2005). Apesar de neste estudo os autores terem sequenciado *PRKAR1A* de apenas duas amostras frescas de mixoma odontogênico, ambos apresentaram mutação no gene e também ausência de imunexpressão da proteína. Um dos casos de mixoma odontogênico apresentou uma mutação *missense* (substituição de um par de bases que leva à mudança no aminoácido codificado) no éxon 6 do gene e o outro caso, uma deleção em único par de base, também no éxon 6. Entretanto, como outros tumores odontogênicos não foram estudados, é possível que alterações neste gene sejam um evento comum ao ectomesênquima de outros tumores odontogênicos.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral:

Investigar molecularmente o gene *PRKAR1A* na odontogênese normal e em tumores odontogênicos mistos.

3.2 Objetivos específicos:

- ✓ Avaliar na odontogênese:
 - ✓ Padrão de expressão do gene *PRKAR1A*, assim como de *PRKAR2A* em diferentes fases da odontogênese em embriões de camundongos e humanos por hibridização *in-situ*.
- ✓ Avaliar nos tumores odontogênicos mistos:
 - ✓ Níveis de transcrição de *PRKAR1A* e *PRKAR2A* por PCR quantitativo em tempo real;
 - ✓ Imunolocalização da proteína PRKAR1A por imunistoquímica (IHC);
 - ✓ Perda de heterozigosidade (LOH) da região do gene *PRKAR1A* por análise de marcadores polimórficos de microssatélite;
 - ✓ Presença de mutações no gene *PRKAR1A* por sequenciamento direto dos éxons.
- ✓ Avaliar em camundongos *Prkar1a*^{+/-} :
 - ✓ Presença ou ausência de tumor odontogênico

4. METODOLOGIA

Para facilitar a compreensão da metodologia empregada, o trabalho foi dividido em estudo da odontogênese e em estudo dos tumores odontogênicos.

4.1 ESTUDO DA ODONTOGÊNESE:

Este estudo foi conduzido no Laboratório de Desenvolvimento Craniofacial do *King's College London, UK* por meio de um estágio de doutorado sanduíche (bolsista do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE), CAPES, (processo BEX 1264/12-5, ANEXO I) no período compreendido entre Maio e Setembro de 2012. Este trabalho contou com a orientação do Professor Paul T. Sharpe e coorientação do Professor Atsushi Ohazama, ambos do *Kings College London*.

4.1.1 Aspectos éticos:

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética do *King's College London*, unidade *Guy's Hospital*. Todos os experimentos envolvendo embriões humanos foram aprovados pelos institutos de pesquisa de genética humana e da saúde da criança, *Institute of Human Genetics, Newcastle*, e *Institute of Child Health, University College London* com o suporte da Dra. Dianne Gerelli. E todos os experimentos envolvendo animais foram feitos de acordo com a norma europeia número 2010/63/EU de proteção aos animais para uso em propósitos científicos.

4.1.2 Coleta das amostras:

4.1.2.1 Embriões animais:

Fêmeas de camundongos da espécie *Mus musculus* foram cruzadas com camundongos da mesma linhagem para obtenção dos embriões em diferentes estágios gestacionais. A constatação do *plug* vaginal foi indicativo de prenhez e marcou o dia embrionário 0.5 (E0.5). As fêmeas foram então sacrificadas pelo método de deslocamento cervical e os embriões de cada período gestacional (E10.5, E12.5, E13.5, E14.5 e E18.5) coletados.

Processamento:

Os embriões coletados foram fixados em solução de paraformaldeído (PFA) 4%, lavados em PBS, dissecados em microscópio e desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes. Descalcificação utilizando EDTA 0.5M (pH 8.0) foi realizada após a fixação do estágio E18.5. Em seguida, parte das cabeças foram armazenadas a -20°C embebidas em etanol absoluto e outras, embebidas em parafina, cortadas em série em micrótomo com cortes de 8 µm e montadas em lâminas livres de ribonucleases (RNase free).

4.1.2.2 Embriões humanos:

Embriões humanos no estágio embrionário *Carnegie* 21, estágio fetal 1 e estágio fetal 4 foram obtidos através do banco tecidual “The Human Developmental Biology Resource” (referência: 08/H0712/34+5). Os tecidos embrionários foram coletados mediante termo de consentimento das pacientes.

Processamento: Os embriões coletados foram fixados em solução de PFA 4%, descalcificados em EDTA 0.5M (pH 8.0), lavados em PBS, dissecados em microscópio e desidratados em uma série de etanóis em concentrações crescentes. As cabeças foram embebidas em parafina, cortadas em micrótomo em cortes seriados (8 µm) e montadas em lâminas livres de RNase.

4.1.3 Hibridização *in situ*

O procedimento de hibridização *in situ* é um método extremamente sensível e considera os princípios de pareamento de bases da dupla-fita que forma a estrutura do DNA. Se uma sonda de RNA anti-sense possui uma sequência complementar a uma porção do RNAm transcrito na célula, ela hibridizará, ou seja, fará um pareamento estável, com aquele RNAm. A introdução de RNases em qualquer momento de um experimento de hibridização, desde a coleta até a formação do híbrido de RNA endógeno/sonda, pode ser a causa de um sinal ausente ou fraco. Para evitar isso, possíveis fontes de RNase foram descontaminadas conforme descrito abaixo:

- Água e soluções foram tratadas com dietilpirocarbonato (DEPC), por 16 – 24 horas e em seguida esterilizadas em autoclave (ex: água-DEPC e PBS-DEPC);
- Materiais de vidro e metal foram autoclavados.

Os procedimentos de hibridização *in situ* foram realizados conforme proposto pelo Prof. Atsushi Ohazama, tendo sido sintetizadas dois tipos de sondas de RNAm: uma sonda marcada com a digoxigenina (DIG) conjugada à uridina tri-fosfato (UTP) para realização da técnica whole-mount *in situ*; e uma sonda marcada com o radioisótopo ³⁵S conjugado à UTP, para a técnica

radioativa. A descrição de ambas as técnicas encontra-se nos próximos tópicos.

4.1.3.1 Preparação das Sondas de RNAm:

Clones

Bactérias contendo os plasmídeos pCMV-SPORT6, pSPORT1 e pOTB7 contendo as sondas dos clones de cDNA dos genes *Prkar1a*, *Prkar2a*, *PRKAR1A* e *PRKAR2A* foram adquiridos (Source BioScience, Lifesciences, UK) e as condições destes clones estão listadas na Tabela 1.

Tabela 1: Descrição dos clones de cDNA dos genes estudados

Gene	Hospedeiro	Vetor	Enzima restrição	Resistência	Referência (IMAGE ID)
<i>Prkar1a</i>	DH10B (E. coli)	pCMV-SPORT6	5s: Sall; 3s: NotI	Ampicilina	2648357
<i>Prkar2a</i>	DH10B (E. coli)	pSPORT1	5s: Sall; 3s: NotI	Ampicilina	6432304
<i>PRKAR1A</i>	DH10B (E.coli)	pCMV-SPORT6	5s: Sall; 3s: NotI	Ampicilina	2286721
<i>PRKAR2A</i>	DH10B (E.coli)	pOTB7	5s: EcoRI 3s: XhoI	Cloranfenicol	3629579

Plaqueamento da cultura bacteriana em meio ágar LB

O meio mais comumente utilizado é conhecido como Luria-Bertani (LB), composto por triptona (10 g/l), extrato de levedura (5 g/l) e NaCl (10 g/l). Após autoclavagem, o meio LB foi resfriado entre 45 °C e 50 °C antes de ser adicionado nas placas, evitando assim a formação de uma condensação. Soluções de estoque de ampicilina ou cloranfenicol foram adicionadas ao meio LB estéril, pouco antes do uso. As placas foram então imersas em uma estufa a 37 °C durante 24 horas para secarem. Uma vez secas, as placas foram

utilizadas ou armazenadas em sacos plásticos fechados e refrigerados até serem usadas. Utilizando-se uma pipeta estéril, as bactérias foram espalhadas ao longo das placas e estas foram incubadas *overnight* a 37 °C em uma estufa, na posição *upside down* (com tampa voltada para baixo). Após 12-16 horas, as placas foram retiradas da estufa, envoltas por papel *parafilm* e armazenadas a 4 °C.

Amplificação plasmidial

Para cada placa, selecionamos uma única colônia e com o auxílio de uma ponteira estéril, retirou-se uma colônia e esta foi inserida em um *erlenmeyer* contendo 200 mL de meio LB líquido e antibiótico adequado. Em seguida, os frascos foram colocados em um agitador mecânico *overnight* a 37 °C e 250 rpm. Após 12-16 horas, as culturas de *E.coli* transfectadas com os plasmídeos foram submetidos à lise celular através do kit *Plasmid Maxi Kit* (Qiagen, Hilden, Germany), conforme protocolo a ser descrito.

Extração de plasmídios por lise alcalina

As culturas bacterianas deixadas em *overnight* foram então transferidas para frascos de 250 mL apropriados para uso em centrífuga e centrifugadas a 8.000 x g por 20 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 10 mL de *buffer* P1 (50mM Tris-HCl pH 8; 10mM EDTA; 100µg/mL RNase A). As células foram então lisadas com a adição de 10 mL de *buffer* P2 (200mM NaOH; 1% *sodium dodecyl sulfate* (SDS), levemente agitadas, invertendo 4-6 vezes os frascos, e incubando-os à temperatura ambiente por 5 min. A mistura foi então neutralizada pela adição de 10 mL de *buffer* P3 (3M NaOAc pH5.5) invertendo novamente 4-6 vezes, seguidos de

incubação no gelo por 20 min e posteriormente, centrifugadas a 30.000 x g por 35 min a 4 °C. O sobrenadante foi filtrado passando-o duas vezes em uma gase estéril. Colunas *Qiagen-tip* 500 (Qiagen, Hilden, Germany) foram equilibradas através de 10 mL de *buffer* QBT (750mM NaCl; 50mM MOPS pH 7; 15% isopropanol; 0.15% Triton X-100), deixando a coluna esvaziar-se por fluxo da gravidade. Uma vez em equilíbrio, o sobrenadante filtrado foi imediatamente passado na coluna. A coluna *Qiagen-tip* 500 foi então lavada com 2 aplicações de 30 mL de *buffer* QC (1M NaCl; 50mM MOPS pH 7; 15% isopropanol) e o DNA plasmidial eluído em 15 mL de *buffer* QF (1.25M NaCl; 50mM Tris-HCl pH 8.5; 15% isopropanol). O DNA foi depois precipitado adicionando 10.5 mL de isopropanol à temperatura ambiente e centrifugado imediatamente a 4.500 x g por 32 min a 4 °C. O pellet resultante foi lavado em 5 mL de etanol 70% à temperatura ambiente e depois centrifugado a 4.500 x g por mais 10 min. Com cuidado, o sobrenadante foi descartado e o pellet deixado secar por 5-10 min em temperatura ambiente. O DNA plasmidial foi resuspenso em 100 µL de água livre de nuclease, quantificado em um espectrofotômetro e armazenado a -20 °C até o seu uso.

Linearização dos plasmídeos:

A linearização do plasmídeo foi realizada para evitar uma marcação desnecessária do vetor de clonagem. Foram digeridos 10 µg de DNA plasmidial em 10 U/µL da enzima de restrição KpNI (Promega, Hampshire, UK) para os plasmídeos pCMV-SPORT6 e em 10 U/µL da enzima BamHI (Promega, Hampshire, UK) para os plasmídeos pSPORT1 e pOTB7, acrescidos de 2.5 µL do tampão da enzima, completando-se com água RNase free em um volume

total de 25 µl. A reação ocorreu em banho-seco por 2 h a 37 °C. A verificação da linearização plasmidial foi feita através de eletroforese em géis de agarose 0.8%.

Eletroforese em gel de agarose

Géis de agarose (0,8%) foram preparados pela adição 2g de pó de agarose em 100ml de solução 1X TAE (40mM Tris-HCl; 1mM EDTA pH 8) e aquecidos em microondas convencional, com borbulhamento ocasional até a dissolução da agarose. Após resfriamento, 0.2 mg/mL de brometo de etídio (Sigma-Aldrich, At. Louis, MO, EUA) foi adicionado na mistura e a agarose dispensada sobre o recipiente de gel apropriado. Uma vez polimerizado, o gel foi imerso em um recipiente de eletroforese contendo solução tampão 1X TAE. As amostras de DNA foram homogeneizadas em um corante de gel e a eletroforese realizada a 110 v por 1 h. O DNA foi visualizado em uma câmara de ultra-violeta (UV). Para se estimar o tamanho do DNA na corrida, utilizou-se marcador padrão de DNA conhecido com tamanho de 1 Kb.

Extração do DNA no gel e purificação

Após verificação da digestão plasmidial, procedeu-se a extração do DNA plasmidial no gel de agarose, usando-se o kit "*QIAquick gel extraction kit*", (Qiagen, Hilden, Germany). Procedeu-se à excisão do fragmento de DNA de interesse do gel de agarose com uma lâmina de bisturi estéril sobre luz UV. O excesso de agarose foi removido e o fragmento do gel excisado inserido em um microtubo de 1.5 mL. O peso do fragmento excisado foi verificado e o volume de *buffer* QG (solução com agente solubilizante com pH indicador) excedendo em 3 vezes o valor do peso do fragmento, foi adicionado ao gel. O

fragmento do gel foi dissolvido incubando-o a 50 °C por 5 min em banho-seco e agitando no vórtex a cada 2 min. Após completa dissolução dos fragmentos de gel e obtenção de coloração amarela na mistura (garantia de que o pH da solução permaneceu ≤ 7.5) e para aumentar o rendimento dos fragmentos de DNA, adicionou-se isopropanol conforme o valor da pesagem do gel nos tubos. Agitou-se bem e transferiu-se o volume dos tubos para uma coluna *QIAquick spin* do kit e centrifugou as amostras por 1 min a 13.000 x g. O filtrado foi descartado e a coluna lavada com *buffer* QG para remoção de qualquer resquício de agarose. Após descarte do novo filtrado, uma nova lavagem em 750 μ l de *buffer* PE foi realizada. A coluna foi então centrifugada duas vezes, por 1 min cada a 13.000 x g, para remoção de qualquer resíduo de etanol (de *buffer* PE) da coluna. O DNA foi então eluído em microtubo de 1.5 mL pela adição de 30 μ l de água livre de nuclease no centro da membrana da coluna e centrifugado por 1 min a 13.000 x g. O DNA purificado foi armazenado a -20 °C.

A sequência dos DNAs purificados foram sequenciadas e analisadas no programa "4Peaks" (<http://mekentosj.com/4peaks/>) e a busca por similaridades com outras sequências depositadas no *Genbank*, foi feita usando o *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST).

Síntese das ribosondas digoxigenina-marcadas

Ribosondas marcadas com DIG-UTP foram sintetizadas pela mistura dos seguintes reagentes em microtubos de 1.5 mL estéril, e incubando a reação em banho-seco, a 37 °C, por 2h: 3 μ l *template* linearizado, 8 μ l tampão da reação de transcrição 5X, 4 μ l 100mM DTT, 2 μ l mix de

nucleotídeos (GTP, CTP, ATP, DIG-UTP), 0.5 µl RNasin (400 u/µl), 1 µl RNA enzima polimerase (10 u/µl) (T3, T7 or SP6), 21.5 µl água destilada. Todos os reagentes usados foram da Promega, (Promega, Hampshire, UK), exceto a mistura de nucleotídeos (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany).

Após 1 hora, a 37 °C adicionou-se mais 1 µl da enzima RNA polimerase na mistura e incubou-se novamente a 37 °C, por 1 h. Após as 2 h completas da reação, a mistura da transcrição foi tratada com 2 µl da enzima RQ1 *RNase-Free DNase I* (Promega, Hampshire, UK) por 15 min a 37 °C. Feito isso, as amostras foram desincubadas, imersas no gelo e submetidas à reação de purificação usando-se o kit “*SigmaSpin Sequencing Reaction Clean-up*” (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA). As amostras purificadas foram analisadas por eletroforese em gel de agarose 0.8% e armazenadas a -80 °C até seu uso nos experimentos de hibridização *in situ*.

Síntese das ribosondas ³⁵S UTP-marcadas

Ribosondas marcadas com ³⁵S-UTP foram sintetizadas pela mistura dos seguintes reagentes em tubos de 1.5 mL estéril e incubando a reação a 37 °C, por 1 h e 40 min: 5.0 µl tampão da reação de transcrição 5X, 0.5 µl 1M DTT, 1.2 µl 10mM GTP, 1.2 µl 10mM ATP, 1.2 µl 10mM CTP, 1.0 µl 50µM UTP, 2-3 µg DNA linearizado (volume máximo 6.4 µl), 0.5 µl RNasin, 7 µl ³⁵S UTP, 1 µl RNA enzima polimerase (10u/µl) (T3, T7 ou SP6). Todos os reagentes usados eram da Promega (Promega, Hampshire, UK).

Após 40 min a 37 °C, adicionou-se mais 1µl da enzima RNA polimerase na mistura e incubou-se novamente a 37 °C, por 1 h. Após completa reação de transcrição, o DNA *template* foi degradado pela adição de 0.5 µl RNasin; 1 µl

10 mg/mL tRNA DEPC-tratado; 0.5 µl 1M DTT; 0.5 µl *RNase-free DNase I* e incubado por mais 10 min a 37 °C . O RNA na reação foi depois precipitado pela adição de 160 µl dH₂O DEPC-tratada; 4.0 µl 1M DTT; 4.0 µl 5M NaCl; 20 µl 3M NaOAc pH 5.2; 400 µl de etanol absoluto e incubado *overnight* (-20 °C) ou 1 h (-80 °C). Obtivemos depois um pellet de RNA pela centrifugação por 10 min a 7.800 x g. O pellet foi então lavado duas vezes em solução contendo 100 µl de 10mM DTT em 10 mL de etanol absoluto e deixado secar ao ar livre. Após estes passos, o pellet foi resuspendido em 50 µl 50mM DTT em dH₂O DEPC-tratada.

A fim de determinar a atividade da ribossonda, quantificou-se a incorporação do radioisótopo ³⁵S-UTP. Um µl de sonda foi colocada em 2 mL de fluido de cintilação “Ultima Gold” (Packard Bioscience Company, Meriden, CT, EUA). O tubo foi então inserido em um contador de cintilação Beckman LS60001C (Beckman, High Wycombe, UK) e a atividade mensurada em desintegração por minuto (dpm). O restante da ribossonda foi armazenado a -80 °C e usado em até 1 mês.

4.1.3.2 Hibridização *in situ whole-mount*

Preparo e hibridização

As cabeças de embriões de camundongos armazenadas em etanol absoluto a -20 °C foram reidratadas em banhos seriados decrescentes de etanol (95%, 85%, 70%, 50%, 30%, todos feitos com dH₂O DEPC-tratada) em intervalos de 15 min cada, sempre sobre agitação. Após essa reidratação, seguiram-se 3 banhos de 5 min cada, em solução PBS DEPC-tratada e suplementada com Tween 20 0.1% (PBST). Os embriões foram depois imersos em H₂O₂ 6% em PBST por 15 min à temperatura ambiente. Nesta etapa, os embriões previamente desidratados são clareados, havendo diminuição da intensidade de pigmentos presentes, no sangue, por exemplo, ao mesmo tempo em que há inativação das fosfatases endógenas (KADOTA *et al.*, 1987) que poderiam gerar reação de fundo. Após 3 banhos de 5 min cada com PBST, seguiu-se ao tratamento com proteinase K na concentração de 20 µg/mL a 37 °C por 15 min. As amostras foram depois lavadas em 3 banhos de 0.1M trietanolamina hidrocloreto pH 7.8 (TEA) em dH₂O DEPC-tratada de 5 min cada. Na segunda lavagem, 12.5 µl de anidro acético (AA) foi adicionado a 2 mL de volume do TEA e 12.5 µl extras foram adicionados na terceira lavagem. As lavagens com TEA foram acompanhadas de agitações vigorosas para permitir a mistura do AA. Após esse passo, seguiu-se a refixação por 20 min com PFA 4% em PBST. Realizou-se 5 enxagues de 5 min cada com PBST e transferiu-se as amostras em temperatura ambiente para o mix de pré-hibridização (formamida 50%; SSC 5X pH 4.5; 1mg/mL de tRNA de levedura; 50 µg/mL de heparina; Denhardt's 5X; 5g BSA; Tween 20 0.1%; (3-[(3-

cloramidopropil)dimetilamônio]-1-propano-sulfato 0.1%; 10mM EDTA; dH₂O DEPC-tratada) e aquecidas a 65 °C em por 10 min. Passados os 10 min, o mix de pré-hibridização foi substituído por um novo mix de pré-hibridização pré-aquecido a 65 °C, e as amostras foram deixadas aquecendo por pelo menos 4 h. Após o pré-tratamento com o mix de pré-hibridização, as amostras foram transferidas para o mix de hibridização (mix de pré-hibridização contendo a ribossonda marcada com DIG na concentração de 1 µg/mL) e deixadas aquecendo a 65 °C *overnight* em forno hibridizador.

Lavagens pós-hibridização

A solução contendo o mix de hibridização com a ribossonda foi retirada das amostras e armazenada no -80 °C para uso posterior. Lavou-se as amostras duas vezes em solução pós-hibridização (Formamida 50%; SSC 5X pH 4.5; 10mM EDTA; Tween 20 0.1%; dH₂O) por 10 min cada a 65 °C , seguido de 3 banhos contendo SSC 2X pH 4.5; Tween 20 0.1% em dH₂O por 20 min cada a 65 °C e depois, dois banhos em SSC 0.2X pH 4.5; Tween 20 0.1%; dH₂O por 30 min cada a 65°C . Os embriões foram depois transferidos para solução de ácido maléico 1X (*maleic acid buffer* – MAB) à temperatura ambiente em dois banhos de 10 min cada e depois pré-bloqueados à temperatura ambiente em banhos de 2 h com reagente de bloqueio *Boehringer Mannheim* (BBR) a 2% em tampão MAB. Após isso, as amostras foram pré-incubadas em solução de alta concentração protéica (BBR 2%, soro de ovelha inativado 10% (pré-aquecido a 60 °C por 30 min) em tampão MAB) por 2 horas à temperatura ambiente. A etapa de pré-bloqueio é importante para bloquear sítios nos quais o anticorpo pode eventualmente se ligar inespecificamente.

Após o pré-bloqueio, os embriões foram incubados em solução contendo 2% de BBR, em tampão MAB, soro de ovelha inativado e anticorpo anti-DIG conjugados à fosfatase alcalina na titulação de 1:2000 e deixados *overnight* a 4 °C . Na manhã seguinte, a solução de anticorpo foi removida e armazenada a 4 °C até o próximo uso. Os embriões foram então lavados três vezes por 15 min cada e depois mais três vezes de 60 min cada, com solução tampão MAB acrescida de Tween 20 0.1% (MABT) à temperatura ambiente para completa eliminação de marcação inespecífica pela fosfatase alcalina.

Como preparação para detecção da cor, os tecidos foram lavados em solução recém preparada de fosfatase alcalina (Tris-HCl 100mM pH 9.5; MgCl₂ 50mM; NaCl 100Mm; Tween 20 0.1%) sendo 5 banhos de 10 min cada à temperatura ambiente.

Detecção da ribossonda de digoxigenina

Fragmentos anti-DIG cobertos com ribossonda marcada com DIG nos tecidos foram detectados pela exposição a 4.5 µl/mL NBT (Roche Diagnostics, Brasileia, Suíça) e 3.5 µl/mL BCIP (Roche Diagnostics, Risch, Suíça) em solução de fosfatase alcalina. A reação ocorreu com os embriões protegidos da luz, a fim de detectar a ação da fosfatase alcalina até que a quantidade apropriada de coloração fosse obtida. Neste momento, a reação foi paralisada com lavagem em PBST. As amostras foram então fixadas com PFA 4% e armazenadas a 4 °C .

Fotografia

As amostras foram submersas em PBS em uma placa de pétri contendo gel de agarose a 10% (fundo branco). Fotografias foram tiradas de um estereomicroscópio, iluminado por baixo, Leica MZ FL III microscópio (Leica Microsystems, Solms, Alemanha) usando câmera digital Leica DFC300 FX (Leica Camera, Solms, Alemanha)

4.1.3.3 Hibridização *in situ* radioativa

Pré-tratamento dos cortes histológicos

As lâminas contendo os cortes histológicos dos variados períodos do desenvolvimento embrionário foram inicialmente desparafinizadas com duas imersões sucessivas em *Histo-clear II* (National Diagnostics, Atlanta, GA, EUA), de 15 min cada. Os cortes foram reidratados passando por uma série decrescente de etanol (etanol absoluto, 95%, 90%, 80%, 60% e 30%), feitos usando dH₂O DEPC-tratada, em banhos de 2 min cada e depois enxaguando-os em dH₂O DEPC-tratada duas vezes de 2 min cada. Em seguida, as lâminas foram tratadas com ácido clorídrico (HCl) concentrado 2% por 20 min e lavadas com solução SSC 2X pH 4.5 por 5 min. O tecido foi permeabilizado tratando-o com proteinase K em Tris-HCl 100mM pH 7.5; EDTA 50mM por 10 min a 37 °C e enxaguados por 2 min em 2 mg/mL de glicina em PBS DEPC-tratado. Após isso, as lâminas foram lavadas em PBS DEPC-tratado por 1 min cada e depois refixadas por 20 min em solução fresca de PFA 4% em PBS DEPC-tratado. Novamente, as lâminas foram lavadas em PBS DEPC-tratado por 2 min e em seguida, tratadas com TEA 0.1M; anidro acético 1/400 por 10 min sobre

agitação constante. As lâminas foram depois lavadas em PBS DEPC-tratado por 5 min e em dH₂O DEPC-tratada por mais 2 min. Finalmente, os cortes foram desidratados por alcoóis em graduação crescente feitos com dH₂O DEPC-tratada (30%, 60%, 80%, 95%, etanol absoluto) e deixadas secar.

Hibridização e lavagem dos cortes histológicos

As lâminas foram estendidas em bastões de vidro em uma câmara de hibridização contendo papel toalha umedecido em 100 mL de SSC 2X pH 4.5 e formamida 50%. Em cada lâmina foi pipetada 100 µl de solução de hibridização e cobertas com uma lamínula de vidro em cima. A solução de hibridização foi composta por um *mix* de formamida 50%, dextran sulfato 10%, DTT 50mM, 0.5mg/mL tRNA, NaCl 0.3M, Tris-HCl 0.02M pH 8, 5mM EDTA, 1X Denhardt's, ribossonda marcada com ³⁵S (na concentração de 1x10⁴ contagens por min), dH₂O DEPC-tratada. O mix de hibridização foi inicialmente passado no vórtex e depois centrifugado por pouco segundos, aquecido a 80 °C por 2 min e previamente resfriado em gelo antes de ser inserido nas lâminas. Após todas as lâminas terem sido tratadas com a solução hibridizadora e cobertas com lamínulas, a câmara de hibridização foi fechada, selada e deixada a 55 °C *overnight* em uma estufa de hibridização. No dia seguinte, as lamínulas foram cuidadosamente removidas e as lâminas transferidas para um suporte de lâminas e lavadas por 15 min a 55 °C em uma solução de lavagem previamente preparada (formamida 50%; SSC 2X pH 4.5; DTT 10mM). Esta lavagem foi repetida por 20 min a 55 °C e depois por 20 min a 65 °C. As lâminas foram depois lavadas em uma solução RNase *free* (NaCl 500mM; Tris-HCl pH 8 10mM; EDTA 1mM) por 15 min a 37 °C . A lavagem com RNase *free*

foi repetida antes das lâminas serem transferidas para RNase A 40 µg/mL por 30 min a 37°C . Após isso, as lâminas foram novamente lavadas em solução RNase A por 15 min a 37 °C e em seguida, enxaguadas em solução de lavagem por 20 min a 65 °C , antes de serem transferidas para SSC 0.1X pH 4.5; DTT 10mM por mais 20 min a 65 °C . Após novo enxague em SSC 0.1X pH 4.5; DTT 10mM por 5 min à temperatura ambiente, as lâminas foram finalmente desidratadas em uma série de etanóis, sendo 70% em acetato de amônio 300mM, 95% e 100%, cada um por 2 min à temperatura ambiente. As lâminas foram depois cobertas com papel alumínio e deixadas secar ao ar livre.

Autoradiografia

Uma vez secas, as lâminas foram expostas a filme Biomax[®] (Kodak, Rochester, NY, EUA) *overnight* à temperatura ambiente. O filme foi revelado no dia seguinte e a densidade da precipitação dos grãos de prata inspecionada. Quanto mais densa a precipitação, menor foi o tempo de exposição das lâminas à emulsão. As lâminas foram imersas em emulsão Ilford K5 (Kodak, Rochester, NY, EUA) dissolvida em glicerol a 2% a 42 °C sob uma luz segura, e em seguida, mantidas no escuro por pelo menos 2h para secar. Uma vez secas, as lâminas foram armazenadas em recipiente específico em geladeira a 4 °C . As amostras foram deixadas expostas a emulsão por duas semanas.

Revelação

Antes de iniciar a revelação, as lâminas foram deixadas a atingir à temperatura ambiente. Sob luz adequada em uma sala escura, as lâminas foram reveladas por imersão em revelador Kodak D19 (Kodak, Rochester, NY,

EUA) por 5 min e depois fixadas em Kodak Unifix (Kodak, Rochester, NY, EUA) por mais 5 min. As lâminas foram enxaguadas sob água corrente por 20 min e lavadas por 3 vezes em dH₂O. Os cortes foram contra-corados com solução hematoxilina, novamente enxaguadas em dH₂O e deixadas secarem ao ar livre. E finalmente, foram montadas com lamínulas usando *DPX mountant* (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA).

Análise e fotografia

Os cortes foram examinados em campo claro usando um microscópio *Zeiss Axioskop 2 Plus* (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, EUA) e as imagens em campo escuro foram fotografadas com câmera *Zeiss AxioCam HRm* (Carl Zeiss Microscopy, Thornwood, NY, EUA).

4.1.4 Quantificação relativa dos genes *PRKAR1A* e *PRKAR2A* em germe decíduo humano

Verificou-se a expressão do RNAm dos genes humano *PRKAR1A* e *PRKAR2A* em germe de dente decíduo humano através de qRT-PCR. Realizou-se extração do RNA total do germe dentário com *Rneasy mini kit* (QIAGEN, Hilden, Germany). A integridade do RNA foi checada em gel de agarose 1% e o cDNA foi sintetizado a partir de 1 µg de RNA tratado com DNase com kit *Superscript First-Strand Synthesis Sytem* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

Com o software *Primer Express* (Appplied Biosystems, Foster City, CA, EUA), os primers de *PRKAR1A* e *PRKAR2A* foram desenhados alinhando na região das ribossondas usadas na *in situ*. As sequências de primers alvos

foram *PRKAR1A* (F 5'-TCTGTGTGCAACTAACTGACTCTGTT-3' e R 5'-CCTCTTCCCCAGATTTATACTTCATACT-3'; tamanho do amplicon 145 pb) e *PRKAR2A* (F 5'-GGCCCAACCCGTCTATCC-3' e R 5'-GCAGCACCTCCACCGTG TAG-3'; tamanho do amplicon 102 pb).

As reações de qRT-PCR foram feitas em triplicata usando reagente *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. Os parâmetros de ciclagem foram desnaturação inicial de 10 min a 95 °C, seguida de 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 57 °C por 1 min. A análise das curvas de melting foram usadas para análise da especificidade. As expressões dos genes alvos foram normalizadas com o endógeno 28S RNAr. A média nos valores de *threshold cycle* (CT) nas três replicatas foi usada para calcular ΔCT (as diferenças nos valores de CT entre o gene alvo e o endógeno). A quantificação relativa da expressão dos genes foi calculada com o método $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK E SCHMITTGEN 2001; SCHMITTGEN E LIVAK, 2008). Glândula salivar normal foi usada como calibrador (PILUDU *et al.*, 2002).

4.2 ESTUDO DOS TUMORES ODONTOGÊNICOS

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG com auxílio financeiro da FAPEMIG, CAPES e CNPq.

Pode ser dividido em duas partes: a primeira consistiu no estudo de qRT-PCR, com o intuito de verificar os níveis de transcrição dos genes *PRKAR1A* e *PRKAR2A* nos tumores odontogênicos, bem como os estudos de IHC, LOH e sequenciamento direto do gene *PRKAR1A* nos tumores odontogênicos mistos; e a segunda parte deste trabalho objetivou investigar a ocorrência ou ausência de formação de tumores odontogênicos em camundongos *knockdown* para o *Prkar1a* (*Prkar1a^{+/-}*). Desta forma, para facilitar a compreensão da metodologia utilizada, será descrito primeiramente, a primeira parte do estudo.

4.2.1 Primeira parte: qRT-PCR, IHC, LOH e sequenciamento

4.2.1.1 Aspectos éticos:

Esta parte do trabalho foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG, tendo sido previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da UFMG, sob o parecer número 498/11 (ANEXO II), obedecendo à resolução brasileira do Conselho Nacional de Saúde nº 441/11. Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) foi aplicado em todos os pacientes envolvidos (Apêndices I A-D).

4.2.1.2 Coleta das amostras:

Os espécimes frescos foram obtidos após os procedimentos de biópsia incisional ou excisional em cirurgias de tumores odontogênicos realizadas na clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFMG. Foi obtida carta de anuência para que estas coletas fossem realizadas (ANEXO III).

Eram coletados do mesmo paciente dois fragmentos de tumor, sendo um imerso em solução tissue-tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) e imediatamente armazenado em nitrogênio líquido; e outro acondicionado em RNA-*holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) e mantido no meio por 24 h a 4 °C , e em seguida, guardados em nitrogênio líquido. Uma amostra de mucosa bucal normal do paciente também foi coletada em meio RNA-*holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) durante o acerto da ferida cirúrgica, para ser utilizada como controle de DNA genômico. Os tecidos eram acondicionados o mais rapidamente possível nestas soluções para preservação dos ácidos nucleicos evitando a degradação destes (MELO *et al.*, 2010).

Todos os fragmentos de tumor e mucosa normal coletados foram cortados em criostato, montados em lâminas de vidro e corados com azul de toluidina para confirmação do tecido coletado. O tecido acondicionado em tissue-tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) foi usado para extração do DNA e os tecidos acondicionados em RNA-*holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil) foram usados para extração do RNA total.

Desses tumores frescos coletados, foram obtidos também, o bloco de parafina e a lâmina de HE dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG.

4.2.1.3 Descrição das amostras

Os tumores FA, FSA, FDA e FOA são lesões raras, o que muitas vezes dificulta a realização de estudos envolvendo eles. Todos os tumores tiveram suas lâminas em HE revisadas por pelo menos dois patologistas. Os diagnósticos foram baseados na classificação histológica dos tumores odontogênicos da OMS (Barnes *et al.*, 2005).

Foi utilizado um total de 13 casos de tumores odontogênicos mistos, sendo 06 FA, 01 FDA e 04 FOA, além de 02 FSA (Tabela 2). 01 FA e 01 FDA eram tumores frescos, sendo os demais, fixados em formol e emblocados em parafina (*Formalin Fixed Paraffin Embedded* – FFPE).

Para realização do experimento qRT-PCR utilizamos 07 ameloblastomas, 05 mucosas orais normais e 06 folículos pericoronários de amostras extraídas em estudo prévio (FARIAS *et al.*, 2012). Estes materiais já dispunham, portanto, de RNA extraído e cDNA sintetizados. Utilizamos ainda neste experimento, 01 FA e 01 FDA frescos.

Tabela 2: Dados clínicopatológicos dos tumores odontogênicos mistos avaliados e características dos materiais incluídos no estudo.

Caso	Gênero	Idade	Localização	Diagnóstico	Material	Tipo de Microdissecção
1	F	7	Mandíbula	FA	Fresco/ bloco parafina	Laser
2	M	14	Mandíbula	FA	Bloco parafina	Manual
3	M	13	Mandíbula	FA	Bloco parafina	Laser
4	F	6	Mandíbula	FA	Bloco parafina	Laser
5	F	-	-	FA	Bloco parafina	Manual
6	F	23	Mandíbula	FA	Bloco parafina	NR
7	M	25	Mandíbula	FSA	Bloco parafina	Laser
8	F	32	Mandíbula	FSA	Bloco parafina	Laser
9	M	9	Maxila	FDA	Fresco/ bloco parafina	Laser
10	M	9	Mandíbula	FOA	Bloco parafina	Manual
11	M	6	Mandíbula	FOA	Bloco parafina	Laser
12	F	13	Mandíbula	FOA	Bloco parafina	NR
13	F	12	Mandíbula	FOA	Bloco parafina	NR

(-) Não foram encontradas na ficha clínica essas informações; NR, não foi realizado por ausência de cápsula, ou por quantidades insuficientes de tecido.

4.2.1.4 Processamento das amostras

4.2.1.4.1 Material fresco

4.2.1.4.1.1 Extração do DNA de tecido fresco:

Para extração do DNA dos espécimes frescos, utilizou-se kit *DNeasy Blood & Tissue kit* (Qiagen, Hilden, Germany). Os fragmentos de tumor, armazenados em solução *tissue-tek* (Sakura Finetek, Torrance, CA, EUA) em nitrogênio líquido, foram descongelados e o tecido cortado em pequenos pedaços de até 25 mg e inseridos em microtubo de 1,5 mL. Para digestão tecidual, adicionou-se 180 µl de tampão (*buffer ATL*) e 20 µl de proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany). O tecido foi incubado a 56 °C até a completa lise, usando-se o vórtex, ocasionalmente, durante a incubação. Após digestão completa, adicionou-se 200 µl de *buffer AL* à amostra, misturando bem em vórtex; e em seguida, adicionou-se 200µl de etanol (96-100%) misturando bem novamente. Pipetou-se então a mistura numa coluna de spin *Mini DNeasy* num tubo de coleta de 2 mL e centrifugou-se a 15.000 x g durante 1 min. Após adesão do DNA na membrana da coluna, adicionou-se 500 µl de *buffer AW1* e centrifugou-o durante 1 min a 15.000 x g; descartando-se o fluido, procedeu-se a nova lavagem da coluna com 500 µl de *buffer AW2* e centrifugação durante 3 a 5 min a 15.000 x g. Para eluição do DNA, transferiu-se a coluna para um microtubo de 1,5 mL, e adicionou-se 50 µl de *buffer AE*. Incubou-o por 1 min à temperatura ambiente e centrifugou-o durante 1 min a 15.000 x g. Este passo foi repetido para obtenção da segunda e terceira extração. Em seguida as amostras de DNA foram quantificadas em nanodrop (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) A concentração do DNA obtido foi determinada pela mensuração da densidade óptica (DO) a 260 nm e a razão

de DO_{260}/DO_{280} de aproximadamente 1.8 foi aceita como pura (WILLIAM *et al.*, 1997). O DNA quantificado foi armazenado a -20°C .

4.2.1.4.1.2 Extração do RNA de tecido fresco

O RNA total foi isolado de amostras de tecido congelado, utilizando o reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), que consiste em uma solução monofásica de fenol e guanidina isotiocianato. O tecido previamente congelado em solução RNA-*holder* (BioAgency, São Paulo, SP, Brasil), foi macerado até ficar com consistência pastosa, tendo sido adicionado nitrogênio líquido constantemente durante o procedimento, evitando que o material descongelasse completamente. O tecido foi então transferido para *microtubo* e adicionado a ele o Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), sendo centrifugado por 10 min a 4°C a $12.000 \times g$. O Trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) rompe as células e mantém a integridade do RNA. Após isso, para separação da solução em fase aquosa e orgânica, adicionou-se ao pellet 200 μl de clorofórmio, seguida de agitação vigorosa com as mãos e repouso em temperatura ambiente por 3 min. Centrifugou-se então, por 15 min a 4°C a $12.000 \times g$ para melhor separação das fases. Após a centrifugação, a mistura ficou separada em 3 fases: no fundo do tubo uma fase avermelhada (fenol + clorofórmio), uma interfase, e uma fase aquosa superior (onde está contido o RNA). A fase aquosa foi então cuidadosamente transferida para outro *microtubo* e as demais fases armazenadas a -20°C . Procedeu-se então, à precipitação do RNA com 500 μl de isopropanol por 10 min à temperatura ambiente, seguida de centrifugação por 10 min a 4°C a $12.000 \times g$. Após a centrifugação, o RNA precipitado formou

um pellet esbranquiçado no fundo e nas paredes do tubo. Após remoção cuidadosa do sobrenadante, lavou-se o pellet com etanol 75% preparado minutos antes. A amostra foi então centrifugada por 5 min a 4 °C a 12.000 x g. O sobrenadante foi descartado e o pellet seco à temperatura ambiente por aproximadamente 5 min. Para ressuspensão do RNA, adicionou-se de 15 a 20 µl em água livre de RNase, conforme o tamanho do pellet. Em seguida, as amostras de RNA foram quantificadas em nanodrop (NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA). A concentração do RNA obtido foi determinada pela mensuração da densidade óptica (DO) a 260 nm sendo uma razão de DO_{260}/DO_{280} de aproximadamente 2 aceita como pura (WILLIAM *et al.*, 1997). A integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1% contendo a solução reveladora Gelred (Biotium, Hayward, CA), sensível à luz UV. Foram identificadas duas bandas distintas representando o RNA ribossomal (28S e 18S), confirmando a integridade do RNA. O RNA foi armazenado a -80 °C até a síntese do cDNA e transcrição reversa.

4.2.1.4.1.3 Síntese do cDNA e transcrição reversa

O kit *SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR* (Invitrogen, USA) foi utilizado para a síntese de cDNA a partir de 1 µg de RNA total tratado com DNase (Invitrogen, USA). Ao RNA, equivalente a 8 µl, foram adicionados 1 µl de Oligo(dT) (50 µM) e 1 µl de oligonucleotídeos dNTP (10 µM). A mistura foi homogeneizada e submetida à temperatura de 65°C por 5 min. Após este período, a mistura permaneceu no gelo por 1 min. Então, foram adicionados 2 µl de tampão específico 10X concentrado, 4 µl de $MgCl_2$ 25 mM, 2 µl de DTT 0,1 M, 1 µl de RNase OUT (40U/mL) e 1 µl da enzima SuperScript III RT

(200U/mL). Em seguida, o mix de amostra e reagentes foi incubado a 50°C durante 50 min, seguido por 85 °C por 5 min. Então, 1 µl da enzima RNase H foi adicionado para remover a fita de RNA complementar ao cDNA. As amostras foram aquecidas a 37°C por 20 min e o conteúdo final foi diluído em água livre de RNase e armazenadas a -20°C.

4.2.1.4.2 Material parafinado

Os blocos de parafina foram cortados em micrótomo em cortes de 4 µm de espessura e montados em lâminas de vidro polarizadas do tipo *StarFrost® knittel glass adhesive slides* (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig, Alemanha) para realização de reação IHC. Além disso, em alguns blocos de parafina realizou-se microdissecção manual antes da extração do DNA. E na maior parte dos casos, os blocos foram cortados para realização de microdissecção à laser.

4.2.1.4.2.1 Microdissecção

O uso desta técnica permite seleção e captura de células e componentes teciduais, permitindo assim, uma análise molecular mais específica de cada componente (PINZANI *et al.*, 2006). A cápsula foi considerada como tecido normal para controle do DNA genômico.

Para a microdissecção manual, a lâmina corada em HE foi sobreposta ao bloco de parafina e foi realizada a delimitação das áreas de epitélio e ectomesênquima odontogênicos da área de cápsula. Em seguida, no bloco de parafina contendo o tecido, fez-se a separação manual da parte tumoral e da

cápsula de tecido conjuntivo. Os blocos, então, foram cortados em micrótomo em 10 cortes de 10 μm para posterior extração do DNA de ambas as regiões.

Os casos submetidos à microdissecção a laser foram cortados em micrótomo em cortes de 12 μm de espessura, montados em membrana *MMI* (Olympus, Tokyo, Japan). Em seguida, foram corados pela hematoxilina em um protocolo de coloração rápida (STROKES *et al.*, 2011), conforme se segue. Para remoção da parafina remanescente, imersão em 2 banhos de xilol, por 1 min cada. Para remoção do xilol, imersão dos cortes em 3 banhos de etanol absoluto por 30 s cada, seguido por lavagem em água destilada, por 15 s. Coloração em hematoxilina era feita durante 5 s, seguida de enxague em água corrente por 1 min. Os cortes eram então hidratados em 3 banhos de etanol absoluto por 30 s cada e as membranas com os cortes deixadas secar à temperatura ambiente. Os cortes corados foram microdissecados usando microscópio Olympus IX81 e sistema de microdissecção a laser *MMI CellCut Plus* (Olympus, Tokyo, Japan). Células epiteliais, ectomesenquimais e células normais foram visualizadas no microscópio e seletivamente destacadas pela ativação do laser. As células dissecadas eram coletadas no *cap* (tampa com adesivo) de um tubo plástico. Desta forma, foram capturados epitélio, ectomesênquima e tecido normal de cada caso, sendo cada um em um tubo estéril diferente. O material microdissecado era então armazenado neste tubo para extração do DNA logo a seguir.

4.2.1.4.2.2 Extração do DNA de tecido parafinado submetido à microdissecção a laser

Utilizou-se kit específico de material parafinado *Qiamp DNA FFPE tissue* (Qiagen, Hilden, Germany). O material previamente microdissecado foi então, digerido com 20 µl proteinase K e 180 µl de tampão *ATL buffer*. Os tubos eram passados no vórtex na posição *upside down* (com a tampa voltada para baixo) e incubados em banho seco a 56 °C por 30 min também nesta mesma posição. Em seguida, o tecido era centrifugado por 2 min a 3.000 x g e novamente incubado overnight em banho seco a 56 °C. No dia seguinte, os tubos eram incubados a 90 °C por 1 h no termociclador. Após lise tecidual completa, para precipitação do DNA, adicionou-se 200 µl de *buffer AL* e 200 µl de etanol absoluto, sendo o tecido passado no vórtex e em seguida, centrifugado por 2 min a 3.000 x g. Transferiu-se então o conteúdo para uma coluna *Min Elute Qiamp* (Qiagen, Hilden, Germany) e centrifugou-o por 1 min a 6.000 x g. Com o DNA aderido agora à membrana da coluna, procedeu-se à lavagem com 500 µl de *buffer AW1* e centrifugação por 1 min a 6.000 x g seguida de nova lavagem com *buffer AW2* com centrifugação de 1 min a 6.000 x g e nova centrifugação por 5 min a 15.000 x g. Por fim, para eluição do DNA, ressuspendeu-se o DNA com 30 µl de *buffer ATE*, deixando esta solução em contato com a membrana por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se novamente por 5 minutos a 15.000 x g. Para obtenção das 2^a e 3^a extrações, procedeu-se à nova eluição e sempre com um volume menor que a primeira extração. O DNA obtido foi quantificado em *nanodrop* (*NanoDrop 2000c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA*) (*Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA*) A concentração do DNA obtido foi determinada pela mensuração da densidade

óptica (DO) a 260 nm e a razão de DO_{260}/DO_{280} de aproximadamente 1.8 foi aceita como pura (WILLIAM *et al.*, 1997). O DNA quantificado foi armazenado a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.2.1.4.2.3 Extração do DNA de tecido parafinado submetido à microdissecção manual

Para extração do DNA dos tecidos parafinados utilizou-se o kit *Qlamp DNA FFPE tissue* (Qiagen, Hilden, Germany). Os blocos de parafina de cada tumor foram cortados em 10 cortes de 10 μm cada e armazenados em microtubo. Em seguida, procedeu-se à desparafinização do tecido em xilol aquecido em banho seco a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada banho de xilol durava 10 min e o tecido era em seguida centrifugado à temperatura ambiente por 1 min a 15.000 x g . Após este passo, removia-se o xilol todo, com bastante cuidado para não aspirar ao tecido e novo banho de xilol era feito. Foram realizados quantos banhos de xilol fossem necessários até que toda a parafina tivesse sido removida, sendo o mínimo de 4 banhos e o máximo de 6. O DNA foi resuspendido em 1.000 μl de etanol a 95% (preparado com etanol e água mili-Q), sendo homogeneizado e centrifugado por 2 min a 15.000 x g . Após remoção do sobrenadante, o pellet foi ressuspendido em 1.000 μl de etanol a 70% (preparado com etanol e água mili-Q). Após homogeneizar e centrifugar por 2 min a 15.000 x g , o sobrenadante foi removido e o pellet deixado em repouso para secar o álcool residual, em temperatura ambiente, com a tampa do *microtubo* aberta. Para digestão enzimática, o pellet foi ressuspendido em 180 μl de *ATL buffer* e 20 μl de proteinase K e incubado no banho seco a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$. Após a lise completa, para reaver parcialmente os ácidos nucleicos

modificados pelo formaldeído, o DNA foi incubado a 90 °C por 1 h em termociclador e, em seguida, centrifugado por 1 min a 15.000 x g. Para lavagem do DNA, adicionou-se 200 µl de *buffer* AL e 200 µl de etanol absoluto; levou-se a mistura ao vórtex e centrifugou-a por 1 min a 15.000 x g. Em seguida, transferiu-se o conteúdo para a coluna *Min Elute Qlamp* (Qiagen, Hilden, Germany) e centrifugou-o por 1 min a 15.000 x g. Com o DNA aderido à membrana da coluna, procedeu-se à lavagem com 500 µl de *buffer* AW1 e centrifugação por 1 min a 15.000 x g; nova lavagem com *buffer* AW2, seguida de centrifugação de 1 min a 15.000 x g e nova centrifugação por 5 min a 15.000 x g. Por fim, para eluição do DNA, ressuspendeu-se o DNA com 50 µl de *buffer* ATE, deixando esta solução em contato com a membrana por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, centrifugou-se novamente por 5 min a 15.000 x g. Para obtenção das 2ª e 3ª extrações, procedeu-se à nova eluição e sempre com um volume menor que a primeira extração. O DNA obtido foi quantificado em *nanodrop* (*NanoDrop 2000c*, *Thermo Fisher Scientific*, *Waltham, MA, EUA*). A concentração do DNA obtido foi determinada pela mensuração da densidade óptica (DO) a 260 nm. A razão de DO_{260}/DO_{280} de aproximadamente 1.8 foi aceita como pura (WILLIAM *et al.*, 1997). O DNA quantificado foi armazenado a -20 °C.

4.2.1.5 Quantificação relativa dos genes *PRKAR1A* e *PRKAR2A*

Iniciamos essa primeira parte do estudo analisando através da técnica qRT-PCR a expressão quantitativa dos níveis de transcrição dos genes *PRKAR1A* e *PRKAR2A* no principal tumor odontogênico epitelial (7 ameloblastomas) e nos 2 tumores odontogênicos mistos, que dispúnhamos de

tecido fresco (1 FA e 1 FDA), comparando essa expressão com um grupo de 5 mucosas orais normais.

O método de qRT-PCR interpreta quantitativamente a amplificação das fitas de DNA em um determinado número de ciclos, utilizando uma molécula fluorescente. Essa análise se dá através da detecção de um sinal fluorescente a cada ciclo de amplificação. Para isso, é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência onde todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente. Para se estabelecer uma base de comparação entre as amostras utiliza-se o valor de CT (*Threshold cycle*) onde cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*. Foi adotado o método da quantificação relativa para avaliar os níveis de transcrição dos genes estudados. Esse método consiste na comparação entre os CTs de cada amostra em relação a um gene endógeno e a um tecido calibrador, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza.

Foram testados dois genes endógenos, β -actina e 28S RNAr, sendo este último, o que apresentou expressão em níveis constantes nos diferentes tecidos testados (mucosa oral normal e folículo pericoronário), sendo portanto, o gene endógeno escolhido. Para a escolha do calibrador, foram realizados testes, em diferentes amostras de mucosa oral normal e folículos pericoronários. O tecido calibrador escolhido foi um pool de cDNAs de 6 folículos pericoronários, por terem expressado o transcrito em níveis semelhantes para os genes estudados. Foi realizado um teste de eficiência da cinética de amplificação para todos os primers estudados.

De acordo com o método adotado para análise da expressão gênica, as diferenças nos valores de CT entre o gene alvo e o endógeno (Δ CT) foram

calculadas, para cada amostra, pela média dos CT das triplicatas, da seguinte forma: $\Delta CT = CT(\text{gene alvo}) - CT(\text{gene endógeno})$.

Os níveis dos transcritos entre os grupos experimentais foram determinados pela comparação entre o ΔCT da amostra estudada e o ΔCT da amostra de referência (calibrador): $\Delta\Delta CT = \Delta CT (\text{amostra estudada}) - \Delta CT (\text{calibrador})$

Assim, a expressão relativa correspondeu à fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (LIVAK E SCHMITTGEN 2001; SCHMITTGEN E LIVAK, 2008). As análises foram realizadas em um aparelho *Step-One Real-time PCR 96-well plate* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As reações de amplificação em tempo real foram feitas em triplicata utilizando o reagente *SYBR Green PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), contendo a molécula fluorescente e os demais reagentes necessários à amplificação. As sequências de primers alvos foram *PRKAR1A* (F 5'-TCTGTGTGCAACTAACTGACTCTGTT-3' e R 5'-CCTCTTCCCCAGATTTATACTTCATACT-3'; tamanho do amplicon 145 pb) e *PRKAR2A* (F 5'-GGCCCAACCCGTCTATCC-3' e R 5'-GCAGCACCTCCACCGTGTAG-3'; tamanho do amplicon 102 pb). Os parâmetros de ciclagem foram 10 min a 95 °C seguidos por 40 ciclos a 95 °C por 15 s e 57 °C por 1 min.

4.2.1.6 Imunoistoquímica para PRKAR1A:

Considerando que os níveis transcricionais de *PRKAR1A* nos tumores odontogênicos avaliados foi menor do que nas mucosas, investigamos a imunexpressão protéica nos ameloblastomas e em todos os tumores odontogênicos mistos dos quais dispunhamos dos blocos de parafina

provenientes das biópsias excisionais (casos 1, 4 ao 13). A técnica foi executada manualmente; controles positivos (fragmento de mucosa oral normal) e negativos (omissão do anticorpo primário), foram incluídos em cada experimento. O anticorpo usado foi anti-PRKAR1A, clone 6C7 (Origene, Rockville, MD, EUA) Segue abaixo uma descrição da técnica e informações do anticorpo primário utilizado.

Os processos de desparafinização, hidratação e recuperação antigênica foram feitos por imersão das lâminas na solução *Trilogy* (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) e aquecidas à 98 °C em *steamer* por 20 min. Para bloqueio da peroxidase endógena, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio 10% (v/v) em dois banhos de 15 min. A incubação do anticorpo primário foi realizada por 30 min à temperatura ambiente sob agitação no *shaker*. Após lavagem com Tris-HCl 20 mM pH 7.4, foi realizada incubação com o sistema de detecção *Envision* (Dako, Carpinteria, CA, USA), por 30 minutos à temperatura ambiente sob agitação leve no *shaker*. A revelação da reação foi feita pela aplicação de solução cromógena 3,3' diaminobenzidina (DAB)(Dako, Carpinteria, CA, USA) e solução de hematoxilina de Mayer's foi usada na contracoloração.

Tabela 3: Informações do anticorpo utilizado

Anticorpo	Fabricante	Recuperação antigênica	Concentração	Sistema de detecção
anti-PRKAR1A (6C7)	OriGene	Solução Trilogy® (Cell Marque)	1:80	Envision (Dako)

Todas as reações foram avaliadas em microscópio óptico de luz por pelo menos 2 patologistas quanto ao padrão de imunexpressão da proteína PRKAR1A. Para avaliação desta expressão, considerou-se a distribuição da

marcação por toda a lesão. Assim, a expressão foi categorizada como forte (++)), quando observava-se uma marcação evidente na maior parte das células tumorais (>50%), moderada (+), quando uma significativa proporção de células neoplásicas eram positivas (10-50%) e fraca/negativa (-) na ausência de células marcadas ou marcação em células ocasionais (<10%). A imunomarcação era citoplasmática e a intensidade não foi utilizada para a categorização.

4.2.1.7 Perda de heterozigosidade

Uma das formas para detectar LOH é através da utilização de marcadores para regiões de microssatélites, próximas a genes supressores de tumor. Os microssatélites são pequenas sequências repetitivas, altamente polimórficas na população e susceptíveis a erros durante a replicação do DNA (LI *et al.*, 2004; MIGALDI *et al.*, 2004). Os estudos de LOH identificam mudanças na dosagem de um alelo heterozigoto em relação ao outro alelo, em um marcador genético. A análise conduzida em neoplasias identifica regiões de LOH examinando alterações no status genômico de células normais com células tumorais do mesmo paciente.

Todos os tumores odontogênicos mistos microdissecados (Tabela 2: (Casos 1, 2, 3, 4, 5, 7, 8, 9, 10 e 11) foram incluídos na análise de LOH. Entende-se por DNA normal aquele extraído de áreas de tecido conjuntivo não neoplásico na região da cápsula, obtido pela microdissecção. A parte tumoral refere-se ao DNA extraído das áreas que continham ou epitélio odontogênico ou ectomesênquima odontogênico, sendo que em alguns casos, o DNA extraído da parte tumoral continha ambos os tecidos neoplásicos.

Após a extração do DNA microdissecado em tecido normal e tumoral, foi realizada a amplificação das regiões genômicas de microssatélite por meio da PCR utilizando iniciadores fluorescentes. Foram avaliados quatro marcadores microssatélites localizados no braço curto do cromossomo 17, locus 24: D17S1882 (17q24.1), D17S940 (17q24.2), D17S942 (17q24.2), D17S2182 (17q24.3) (Tabela 4). Os marcadores foram escolhidos baseados em estudos prévios de LOH envolvendo o gene *PRKAR1A* (KIRSCHNER *et al.*, 2000a; BERTHERAT *et al.*, 2003). As distâncias desses marcadores em relação ao gene *PRKAR1A* está ilustrada na Figura 10.

Os produtos de de PCR amplificados foram revelados em gel de poliacrilamida a 8% e visualizados através da coloração de prata. Foi diluído 1 μ L do PCR em água milliQ numa proporção que variou de 1:0 a 1:30 (produto de PCR : água milliQ). Desta diluição, 1 μ L foi homogeneizado com 12 μ L de formamida e 0,5 μ L de *GeneScanTM -500 Liz[®] size standard* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). As amostras foram desnaturadas por 5 minutos a 90 °C e posteriormente analisadas por eletroforese capilar no equipamento ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) onde foram obtidos os resultados da região alvo amplificada. Os resultados foram analisados com o *software* GeneMapper (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a LOH foi calculada baseando-se na razão entre o valor da altura do alelo 1 (A1) dividida pela altura do alelo 2 (A2) das amostras de tecido normal e tumoral (VAN HOUTEN *et al.*, 2000) de acordo com a fórmula:

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

As amostras em que a razão entre os valores dos alelos do tecido normal e tumoral foram menores que 0.5 (<0.5) ou maiores que 2 (>2) foram denominadas como LOH (VAN HOUTEN *et al.*, 2000). Os valores encontrados entre 0,5 e 2,0 foram considerados como heterozigotos. Aqueles casos que apresentaram apenas um alelo no DNA de tecido normal foram considerados como homozigotos. Os casos em que não houve a amplificação do marcador na reação de PCR impossibilitaram a análise e por isso, foram considerados como inconclusivos.

Tabela 4: Marcadores microssatélites utilizados no estudo.

Marcador	Locus	Repetição	Sequência	Produto
D17S1882	17q24.1	Di (CA)	F: ACCCACCACCACTACTCC R: TATCATTACCTCACCTACCTT	110-126 pb
D17S940	17q24.2	Di (CA)	F: AGTTTCTGCTCCACCTTCTT R: TAGAGAGTGGAAAGGGGTATG	139 pb
D17S942	17q24.2	Di (CA)	F: GGGTAACAGGAAAATGGGTA R: TGTATCTTCATCCTCTGAGTTG	126 pb
D17S2182	17q24.3	Tetra (CTAT)	F: TCTGGACAGGTTATTATACTGGG R: CAGGGTGAGCAAGCTGTATT	205-229 pb

F: forward; R: reverse.

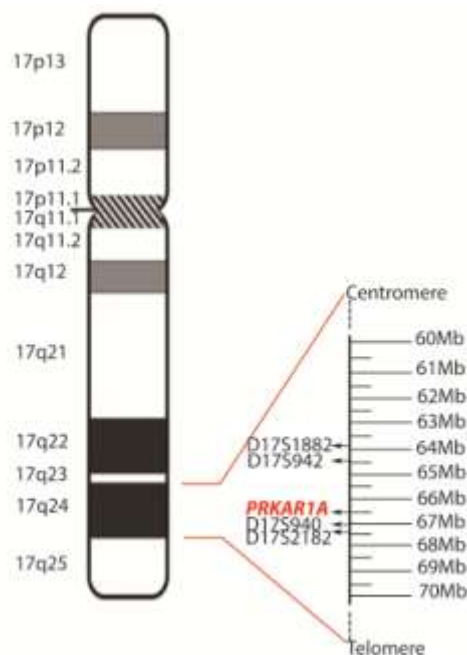


Figura 10: Cromossoma 17, locus 24. Posição em megabases (Mb) dos marcadores de perda de heterozigiosidade utilizados no estudo em relação à posição do gene *PRKAR1A*.

4.2.1.8 Sequenciamento direto

Considerando-se a pequena quantidade de DNA disponível nas amostras parafinadas e microdissecadas, e ainda, a grande quantidade de éxons existentes no gene *PRKAR1A*, iniciamos sequenciando as duas amostras de tecido fresco disponíveis (01 FA e 01 FDA), para em seguida sequenciarmos as amostras parafinadas e microdissecadas.

O sequenciamento genético é uma técnica utilizada em biologia molecular que permite a verificação de toda a sequência genômica de qualquer amostra de DNA ou de uma amostra de RNA mensageiro (RNAm) convertida em cDNA. O sequenciamento direto utiliza corantes fluorescentes para marcar os produtos de extensão e requer amostra de DNA, primer de sequenciamento,

uma polimerase termo estável, desoxinucleotídeos (dNTPs), didesoxinucleotídeos (ddNTPs) e tampão combinados em uma reação semelhante à técnica de PCR.

Foram utilizados 12 pares de primers para amplificação dos éxons 1-10 do gene *PRKAR1A*, sendo a sequência dos oligonucleotídeos, conforme a descrita por KIRSCHNER *et al.* (2000b) (Tabela 5).

As amostras com DNA extraído foram primeiramente submetidas à reação de PCR para amplificação de cada um dos éxons do gene. As condições de ciclagem eram de desnaturação inicial a 95 °C por 10 min seguida de desnaturação a 96 °C por 10 s, anelamento em temperatura variável por 30 s (Tabela 5), extensão a 70 °C por 1 min e extensão final a 70 °C por 1 min, sendo um total de 35 ciclos nas amostras frescas e de 45 ciclos para as amostras parafinadas. Após a amplificação, os produtos foram purificados utilizando-se o kit *illustra™ GFX™ PCR DNA and Gel Band Purification kit* (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK), seguindo as orientações do fabricante.

Após a purificação, foi realizado o sequenciamento direto do DNA com a utilização do kit *BigDye™ Terminator cycle sequencing v.3.1* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Cada reação continha 20 µl de uma mistura preparada com todos os dNTPs e ddNTPs; produto de PCR de DNA purificado (2-100 ng); tampão de sequenciamento 2.5x concentrado e um dos iniciadores com concentração de 3.2 pmol. Os 20 µl de reação foram colocados em um termociclador para amplificação do DNA.

O produto da precipitação do sequenciamento foi submetido à eletroforese capilar na plataforma ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA,

EUA). Durante a eletroforese capilar, as moléculas são eletroinjetadas nos capilares e se deslocam em direção ao eletrodo anodo. A ordem de migração das moléculas depende diretamente de seu peso molecular, sendo sempre em ordem crescente a passagem dos fragmentos. Ao passar pela câmara de luz, a fluorescência de cada molécula é captada por um laser de detecção. A detecção das fluorescências gera os dados correspondentes aos picos do eletroferograma. A partir desse eletroferograma é que se pôde fazer a leitura da fita de DNA verificando-se as possíveis alterações no gene estudado. A análise visual das sequências foi realizada manualmente por meio do programa *Sequence Scanner 2.0* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA).

Tabela 5: Sequência dos primers dos éxons do gene *PRKAR1A* e temperaturas de anelamento para os tecidos fresco e parafina.

ÉXON	SEQUÊNCIA PRIMERS	TEMPERATURA DE ANELAMENTO	
		FRESCO	PARAFINA
1A	F: AGTCGCCCACCTGTCATCT R: CACTTCTCCTTTCCGCAGTC	69,5°C	59°C
1B	F: CATTGACGTCAGTAGCCGAA R: ATCTTGGATCGGTCCAGCTC	64°C	55°C
2	F: CCTAGTCCCCACTTCCCTGT R: ATCACCTCATCATCTCCCCA	67°C	59°C
3	F: CATGCCGAAGGATCTCATT R: ATGGATGAAGTTCCACCCTG	68°C	54°C
4A	F: CAGGTTGCAAACGTGAAATG R: CTGCGATAAAGGAGACCGAA	67°C	58°C
4B	F: AGCCAAAGCCATTGAAAAGA R: GCCTCCTCTCCCGTAACAAT	68°C	55°C
5	F: TTGCTTGATTTTCTTTCCCC R: ATTCTTATTGCTCGGAAGCG	66°C	52°C
6	F: TCATTTAACTCGTCAGAAATCACC R: TTCTAAATCAGACTCTCAAACACCA	69°C	58°C
7	F: GGCATAATATTGGCGGAAAA R: AAGGCTTTTCCCAAGTCCAT	67°C	52°C
8	F: AGAATGTTGAATGGGCATGG R: TTAGCCCCTCTTTCCCTCTT	68°C	54°C
9	F: CACCCTGGGTTTGAGAGTGT R: TTCCCTCTCAGAGCCAAAAA	66°C	55°C
10	F: CCCATCTTTGCTTTCTCCAG R: AACAGACAGGAAGCTGCGAT	69°C	55°C

4.2.2 Segunda parte: histologia dos animais *Prkar1a*^{+/-}

4.2.2.1 Aspectos éticos:

Todos os animais utilizados nesta parte do estudo foram manipulados de acordo com as normas institucionais do *National Institute of Health* (NIH), Bethesda, MD, EUA.

4.2.2.2 Descrição das amostras:

Solicitamos ao Professor Constantine Stratakis, pesquisador do NIH, EUA, departamento *Child Health and Human Development*, para que fossem nos cedidos camundongos heterozigotos para o gene *Prkar1a*, conforme modelo animal utilizado previamente (KIRSCHNER *et al.*, 2005). Assim, camundongos *Prkar1a*^{+/-} com 1 mês (5 animais) e 6 meses de vida (4 animais), foram sacrificados, dissecados e fixados por imersão em PFA 4%. Após fixação, as cabeças dos murinos foram gentilmente nos cedidas.

4.2.2.3 Processamento das amostras:

As cabeças previamente fixadas, foram lavadas em água destilada e submetidas à descalcificação com EDTA 0.9M pH 7.5 por aproximadamente 20 dias. Após descalcificação, as cabeças foram novamente lavadas em água destilada, seccionadas conforme mostrado na Figura 11, desidratadas em bateria de soluções alcoólicas em concentrações graduais e crescentes, imersas em xilol e incluídas em parafina líquida. Os blocos de parafina foram então cortados em micrótomo em cortes de 10 µm de espessura. Os cortes foram montados em lâmina de vidro e submetidos à coloração por

hematoxilina-eosina. Após a coloração, as lâminas foram montadas com lamínulas de vidro e Entellan, secadas ao ar livre e depois observadas em microscópio óptico de luz.

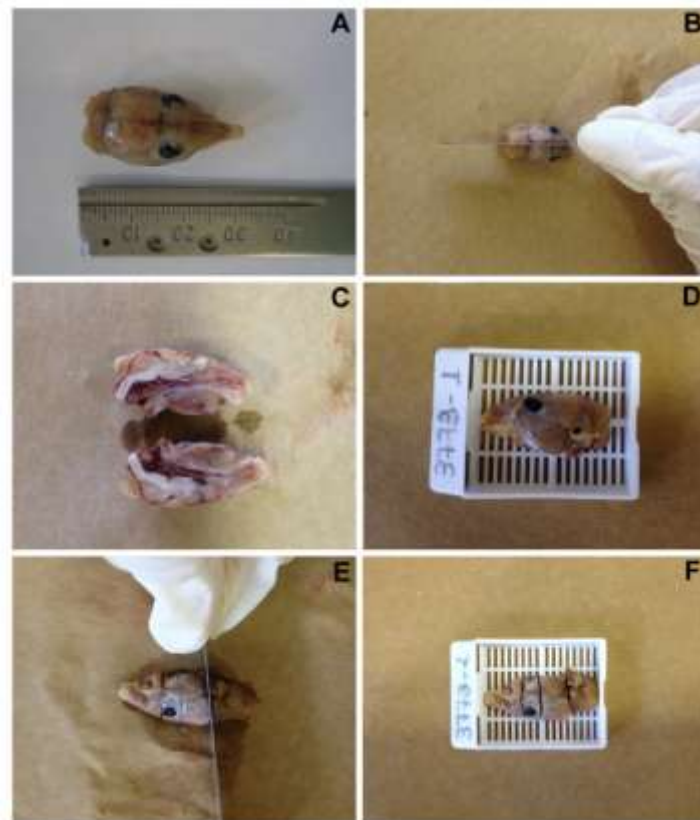


Figura 11: Secção das cabeças de camundongos *Prkar1a*^{+/-} antes da inclusão em parafina. (A) Aspecto macroscópico de cabeça de camundongo medindo aproximadamente 3,2 cm. (B) Secção sagital ao meio da cabeça. (C) Hemifaces direita e esquerda após secção sagital. (D) Posição para inclusão de uma das hemifaces. (E) Secção transversal de hemiface em 4 fragmentos. (F) Posição de inclusão dos fragmentos da segunda hemiface.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 ARTIGO I

O artigo desta seção, intitulado “**PKA regulatory subunit expression in tooth development**”, foi publicado no periódico *Gene Expression Patterns* (ISSN 1567-133X, Fator de impacto: 1.640).



PKA regulatory subunit expression in tooth development



Sílvia Ferreira de Sousa ^{a,*}, Katsushige Kawasaki ^b, Maiko Kawasaki ^b, Ana Angelova Volponi ^b,
Ricardo Santiago Gomez ^a, Carolina Cavaliéri Gomes ^c, Paul T. Sharpe ^b, Atsushi Ohazama ^{b,d}

^a Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^b Department of Craniofacial Development and Stem Cell Biology, Dental Institute, King's College London, Tower Wing Guy's Hospital, London Bridge, London SE1 9RT, UK

^c Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^d Division of Oral Anatomy, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

PKA regulatory subunit expression in tooth development

Running title: PKA regulatory subunit in odontogenesis

Authors: Sílvia Ferreira de Sousa^{1*}, Katsushige Kawasaki², Maiko Kawasaki², Ana Angelova Volponi², Ricardo Santiago Gomez¹, Carolina Cavaliéri Gomes³, Paul T Sharpe², Atsushi Ohazama^{2,4}

1. Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
2. Department of Craniofacial Development and Stem Cell Biology, Dental Institute, King's College London, Tower Wing Guy's Hospital, London Bridge, London SE1 9RT, UK.
3. Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
4. Division of Oral Anatomy, Department of Oral Biological Science, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata, Japan

***Corresponding author:**

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

Tel: +55 31 34092477; Fax: +55 31 34092430

E-mail: silvinhaferreira21@yahoo.com.br

Abstract

Protein kinase A (PKA) plays critical roles in many biological processes including cell proliferation, cell differentiation, cellular metabolism and gene regulation. Mutation in PKA regulatory subunit, *PRKAR1A* has previously been identified in odontogenic myxomas, but it is unclear whether PKA is involved in tooth development. The aim of the present study was to assess the expression of alpha isoforms of PKA regulatory subunit (*Prkar1a* and *Prkar2a*) in mouse and human odontogenesis by *in situ* hybridization. *PRKAR1A* and *PRKAR2A* mRNA transcription was further confirmed in a human deciduous germ by qRT-PCR. Mouse *Prkar1a* and human *PRKAR2A* exhibited a dynamic spatio-temporal expression in tooth development, whereas neither human *PRKAR1A* nor mouse *Prkar2a* showed their expression in odontogenesis. These isoforms thus showed different expression pattern between human and mouse tooth germs.

Keywords: *PRKAR1A*, *PRKAR2A*, tooth development, human, mouse, *in situ* hybridization

Introduction:

The tooth is an organ that develops as a result of sequential and reciprocal interactions between the oral epithelium and neural crest-derived mesenchyme. The first morphological sign of tooth development is an epithelial thickening. The thickened epithelium progressively takes the form of the bud, cap and bell configurations as differentiation and morphogenesis processes. Subsequently, epithelial cells and mesenchymal cells (dental papilla) differentiate into enamel-producing ameloblasts and dentin-secreting odontoblasts, respectively. Odontogenic tumours are known to arise either from the dental epithelium, dental papilla or the dental follicle.

Protein kinase A (PKA) is a serine-threonine kinase that mediates cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate (cAMP) regulation for a variety of biological processes including cell proliferation, cell differentiation, cellular metabolism and gene regulation (Krebs, 1972, Roesler *et al.*, 1988, Boynton and Whitfield, 1983, Liu, 1982; Schwartz and Rubin, 1983, Krebs and Beavo, 1979). The PKA signaling is essential in embryonic mesodermal and ectodermal differentiation, and is interacted with many other signaling pathways such as Hedgehog, Wnt and Fgf in initial morphogenesis (Jia *et al.*, 2004, Almeida *et al.*, 2010, Bossis and Stratakis 2004, Hammerschmidt *et al.*, 1996; Amieux *et al.*, 2002; Sakai *et al.*, 2006; Kim *et al.*, 2013).

In the inactive form, the PKA holoenzyme is localized in the cytosol as a heterotetramer composed of two regulatory (R) subunits bound to two catalytic (C) subunits (Scott, 1991; Taskén *et al.*, 1997). PKA is activated when two

molecules of cAMP bind to each R subunit, which leads to dissociation of the holoenzyme. Four R subunit isoforms (R1 α , R1 β , R2 α and R2 β) have been characterized in human and mouse, while two C subunit isoforms (C α , C β) and four C subunits (C α , C β , C γ and PRKX) have been identified in mouse and human, respectively (Amieux *et al.*, 2002; Horvarth *et al.*, 2010;). Type I PKA contains either regulatory subunit R1 α or R1 β in its structure, and is usually associated with stimulated states of PKA; type II PKA contains either regulatory subunit R2 α or R2 β , and is involved in basal states (Bossis and Stratakis, 2004; Griffin *et al.*, 2004).

R1 α is the only isoform that is essential for early embryonic stage of mouse development (Amieux *et al.*, 1997; Amieux *et al.*, 2002). Mutations in the *PRKAR1A*, which encodes R1 α subunit, result in many diseases including Carney Complex (CNC), an autosomal dominant disorder characterized by skin lesions, myxomas and endocrine overactivity (Horvath *et al.*, 2010, Stratakis *et al.*, 2001). *PRKAR1A* mutation was also identified in odontogenic myxomas (Perdigão *et al.*, 2005). In common with R1 α , R2 α is widely expressed in mouse and human, and both alpha isoforms are expressed in the dental follicle during tooth eruption (Amieux *et al.*, 1997; Amieux *et al.*, 2002, Yao and Wise, 2003). It is however unknown whether these isoforms are involved in embryonic tooth development. The aim of the present study was to investigate the expression of alpha isoforms of PKA regulatory subunit in mouse and human odontogenesis.

Materials and Methods:

Mouse and Human embryos

Human embryos at different stages were collected by The Human Developmental Biology Resource (HDBR), which has been awarded Research Tissue Bank ethics (The Human Developmental Biology Resource. REC reference: 08/H0712/34+5). The HDBR can distribute tissue to none ethically approved medical research projects. Tissue was collected with full patient consent and is made available by the HDBR for use in Medical Research. The embryos, received from the HDBR Centre in a vial containing hypotonic phosphate *buffered* saline solution, were processed on the same day. Ethical permission for the collection of this material for research has been obtained at the Institute of Human Genetics, Newcastle and at the Institute of Child Health, London.

Wild-type CD1 females were mated with wild-type CD1 males. Day E0 was taken to be midnight prior to finding a vaginal plug. Embryos were collected at different stages (E10.5, E12.5, E13.5, E14.5, E18.5), fixed in 4% paraformaldehyde (PFA) and dehydrated through a graded series of ethanol. For whole mount *in situ* hybridization analysis, mouse heads were stored at -20°C until they are required. Heads of human embryos at Carnegie stage 21, Fetal stage 1 and Fetal stage 4 were also fixed in 4% PFA and dehydrated through a graded series of ethanol. For radioactive *in situ* hybridization analysis, decalcification using 0.5 M EDTA (pH 8.0) was performed after fixation for E18.5 mouse embryos and human embryos. The heads were embedded in paraffin and serially sectioned at 8 µm. In mice, gene expression was examined in incisor and the first molars.

Probe preparation & in situ hybridization:

The antisense riboprobes were generated from mouse and human cDNA clones. *Prkar1a* and *PRKAR1A* were linearized and transcribed by KpnI and T7 RNA polymerase, respectively. *Prkar2a* and *PRKAR2A* were linearized with BamHI and transcribed by SP6 RNA polymerase.

Whole-mount *in situ* hybridization was carried out for both genes only in mouse embryos (E10.5, E12.5, E13.5, E14.5) following a previously described protocol (Ohazama *et al.*, 2008). Radioactive *in situ* hybridization for both genes was carried out in mouse (E12.5, E13.5, E14.5 and E18.5) and human embryos' heads as described previously (Ohazama *et al.*, 2008).

Quantitative reverse transcription PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from one human deciduous tooth germ using RNeasy mini kit (QIAGEN, Hilden, Germany). RNA integrity was checked on 1% agarose gel and the cDNA was synthesized from 1.0 µg of DNase-treated RNA using Superscript First-Strand Synthesis System kits (Invitrogen Life Technologies Carlsbad, CA, USA). qPCR reactions were carried out using 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK). *PRKAR1A* and *PRKAR2A* primers were designed spanning the probe's region by using Primer Express software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) version 3.0: *PRKAR1A* (F 5'-TCTGTGTGCAACTAACTGACTCTGTT-3' and R 5'-CCTCTTCCCCAGATTTATACTTCATACT-3'; amplicon size 145 bp) and *PRKAR2A* (F 5'-GGCCCAACCCGTCTATCC-3' and R 5'-GCAGCACCTCCACCGTGTAG-3'; amplicon size 102 bp). Reactions were performed in triplicate on a Step One machine (Applied Biosystems, Foster City,

CA, USA). The cycling parameters were 10 min at 95°C followed by 40 cycles at 95°C for 15s and 57°C for 1min. Melting curve analysis was used to distinguish specificity. *PRKAR1A* and *PRKAR2A* expressions were normalized with 28S rRNA. The average threshold cycle (Ct) for three replicates per sample was used to calculate ΔCt . Relative quantification of these genes expressions was calculated with the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ method. Normal human salivary gland sample was used as a calibrator, because this tissue was previously reported to express *PRKAR2A* (Piludu *et al.*, 2002).

Results:

Mouse embryos:

Initiation begins before the tooth enlargement is morphologically visible. The first signals are derived from tooth presumptive epithelium at E9.5 (Ferguson *et al.*, 2000). The first visible signs of tooth development cannot be recognized at E10.5. Whole mount *in situ* hybridization analysis showed strong *Prkar1a* expression in the maxillary and mandibular processes at E10.5, whereas *Prkar2a* expression was restricted to the posterior region of maxillary and mandible processes (**Fig. 1A, 1A'**).

Thickening of epithelium takes place from E12.5. At E12.5 whole mount *in situ* hybridization analysis showed that *Prkar1a* expression became restricted to lower incisor tooth regions, and no obvious expression could be detected in neither upper incisor, upper nor lower molar region (**Fig. 1B, 1C**). No obvious *Prkar2a* expression was observed at any tooth region (**Fig. 1B', 1C'**). Radioactive *in situ* hybridization analysis showed that strong expression of *Prkar1a* was found in mesenchyme of both incisor and molar tooth germs, whereas weak expression was observed in tooth epithelium of both tooth types (**Fig. 2A, 2B**). *Prkar2a* showed no expression in either epithelium or mesenchyme of any tooth types (**Fig. 2A', 2B'**).

By E13.5 the tooth epithelium has invaginated into the underlying mesenchyme to form epithelial bud. Whole mount *in situ* hybridization analysis showed strong *Prkar1a* expression in incisor and molar regions of both upper and lower jaws, whereas no *Prkar2a* expression was observed at any tooth regions (**Fig. 1D, 1E, 1D', 1E'**). Radioactive *in situ* hybridization analysis

showed that *Prkar1a* was strongly expressed in mesenchyme of both incisor and molar tooth germs, whereas it showed weak expression in tooth epithelium (**Fig. 2C, 2D**). *Prkar2a* was expressed in neither epithelium nor mesenchyme of any tooth types (**Fig. 2C', 2D'**).

By E14.5 the bud basal epithelium develops into the internal and the external (outer) enamel epithelium, and the mesenchyme forms into the dental papilla and dental follicle. Whole mount *in situ* hybridization analysis showed strong expression of *Prkar1a* in the incisor and molar regions of both upper and lower jaws (**Fig. 1F, 1G**). No *Prkar2a* expression could be detected at any tooth region (**Fig. 1F', 1G'**). Radioactive *in situ* hybridization analysis exhibited strong expression of *Prkar1a* in dental papillae of both incisor and molar tooth germs, and weak expression in molar tooth epithelium (**Fig. 2E, 2F**). *Prkar2a* showed no expression in either epithelium or mesenchyme of incisors or molars (**Fig. 2E', 2F'**).

The terminal differentiation of dentin-forming odontoblasts from dental papilla cells and the enamel-forming ameloblasts from the internal epithelium occurs between E18 to P0. Strong expression of *Prkar1a* was observed in the odontoblasts layer of molars and incisors, and stratum intermedia of incisors (**Fig. 2G, 2H**). No expression of *Prkar2a* could be detected in any tooth germs (**Fig. 2G', 2H'**).

Human embryos:

PRKAR2A expression was observed in both epithelium and mesenchyme at bud and cap stages, whereas no obvious expression of *PRKAR1A* could be detected in either bud or cap stage tooth germs (**Fig. 3A-**

3B'). At the bell stage, *PRKAR2A* expression became restricted to stratum intermedia, odontoblasts and dental papillae, whereas no obvious expression of *PRKAR1A* could be detected at bell stage (**Fig. 3C, 3C'**). The qRT-PCR showed similar mRNA transcriptional levels of *PRKAR1A* and *PRKAR2A* in the human germ, with RQ (relative quantification) values of 0.020 and 0.025, respectively (data not shown).

The expression of human *PRKAR2A* and mouse *Prkar1a* during tooth development is summarized diagrammatically in **Fig. 4**.

Discussion:

We show here dynamic spatio-temporal expression of alpha isoforms of PKA regulatory subunit in odontogenesis. In mice, *Prkar1a* showed strong expression in tooth germs, whereas no expression of *Prkar2a* could be detected. Conversely, in human tooth development, *PRKAR2A* was strongly expressed, but *PRKAR1A* showed no obvious expression in tooth germs in the *in situ* hybridization analysis. Many genes such as *Shh*, *Pax9* and *Fgf8* have been shown different expression pattern in tooth development between mouse and human (Lin *et al.*, 2007, Hu *et al.*, 2013). The different expression pattern is likely to be established by different evolutionary processes in each animal. It is possible that different expression pattern contribute the different shape between human and mouse molar tooth. On the other hand, we examined *PRKAR2A* and *PRKAR1A* expression on human deciduous tooth germs, whereas mouse dentitions we examined were permanent tooth dentition. It is also possible that molecular mechanisms of tooth development are significantly different between permanent and deciduous tooth dentition. Furthermore it is difficult to identify the tooth type in human embryos, while we showed *Prkar1a* and *Prkar2a* expression on murine first molar tooth germ. Even in mouse permanent tooth dentition, slightly different expression pattern of *Prkar1a* was observed between incisors and molars. It is conceivable that human tooth germs we examined are not molar tooth germs.

PKA is known to be involved in several signaling pathways which play critical roles in regulating tooth development. The stimulation of cementoblasts

with parathyroid hormone-related protein (PTHrP), a regulator of cementogenesis, was described to occur via the cAMP/PKA pathway (Ouyang *et al.*, 2000). In addition, PKA has been shown to antagonize Sonic hedgehog (SHH) signaling which is an important factor for tooth root formation (Amieux *et al.*, 2002, Hammerschmidt *et al.*, 1996; Makinodan and Marneros, 2012, Nakataomi *et al.*, 2006, Niewiadowski *et al.*, 2013). The expression of R1 α and R2 α are observed in the dental follicle during tooth eruption when cement and tooth root also start to form (Yao and Wise, 2003). PKA is thus likely to play a critical role in cement/root formation through Shh and PTHrP signaling. *PRKAR1A* mutation has been shown in human odontogenic myxomas which is a tumor probably derived from the tooth germ ectomesenchyme (Perdigão *et al.*, 2005). It is also possible that mutation of *PRKAR1A* leads to the changes of Shh or PTHrP signaling activity which induce odontogenic myxomas formation, since aberrant activity of both signaling pathways is known to result in tumor formation (Bijsma and Roelink 2010, Kremer *et al.*, 2011), including odontogenic tumors (Gomez *et al.*, 2009; Gomes and Gomez, 2011; Farias *et al.*, 2012).

Acknowledgements:

The human embryonic and fetal material was provided by the Joint MRC/Wellcome Trust (grant # 099175/2/12/2) Human Developmental Biology Resource (<http://www.hdbr.org>). This work was supported by the MRC (Sharpe). This study was also supported by the following Brazilian funding agencies: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES - process #1264/12-5), by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and by the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. R.S. Gomez and C.C. Gomes are research fellows at CNPq, Brazil.

References:

1. Almeida MQ, Muchow M, Boikos S, Bauer AJ, Griffin KJ, Tsang KM, Cheadle C, Watkins T, Wen F, Starost MF, Bossis I, Nesterova M, Stratakis CA. Mouse Prkar1a haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the Trp53^{+/-} or Rb1^{+/-} backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. *Hum Mol Genet* 2010;19(8):1387-98.
2. Amieux PS, Cummings DE, Motamed K, Brandon EP, Wailes LA, Le K, Idzerda RL, McKnight GS. Compensatory regulation of RI alpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem* 1997;272(7):3993-8.
3. Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, Lee DC, Su T, Laszlo GS, Idzerda RL, McKnight GS. Increased basal cAMP-dependent protein kinase activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo. *J Biol Chem* 2002;277(30):27294-304.
4. Bijlsma MF, Roelink H. Non-cell-autonomous signaling by Shh in tumors: challenges and opportunities for therapeutic targets. *Expert Opin Ther Targets* 2010;14(7):693-702.
5. Bossis I, Stratakis CA. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 2004;145(12):5452-8.
6. Boynton, AL, Whitfield, JF. The role of cAMP in cell proliferation: a critical assessment of the evidence. *Adv Cyclic Nucleotide Res* 1983;15:193-294.
7. Ferguson CA, Tucker AS, Sharpe PT. Temporospacial cell interactions regulating mandibular and maxillary arch patterning. *Development* 2000;127(2):403-12.

8. Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol* 2009;45(12):1011-4.
9. Gomes CC, Gomez RS. PTCH1 gene inactivation is not a Keratocystic odontogenic tumour exclusive alteration. *Oral Oncol* 2011;47(3):226-7.
10. Farias LC, Gomes CC, Brito JA, Galvão CF, Diniz MG, de Castro WH, Bernardes Vde F, De Marco LA, Gomez RS. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol* 2012;43(8):1229-33.
11. Griffin KJ, Kirschner LS, Matyakhina L, Stergiopoulos S, Robinson-White A, Lenherr S, Weinberg FD, Claflin E, Meoli E, Cho-Chung YS, Stratakis CA. Down-regulation of regulatory subunit type 1A of protein kinase A leads to endocrine and other tumors. *Cancer Res* 2004;64(24):8811-15.
12. Hammerschmidt M, Bitgood MJ, McMahon AP. Protein kinase A is a common negative regulator of Hedgehog signaling in the vertebrate embryo. *Genes Dev* 1996;10(6):647-58.
13. Horvath A, Bertherat J, Groussin L, Guillaud-Bataille M, Tsang K, Cazabat L, Libé R, Remmers E, René-Corail F, Faucz FR, Clauser E, Calender A, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA.. Mutations and polymorphisms in the gene encoding regulatory subunit type 1-alpha of protein kinase A (PRKAR1A): an update. *Hum Mutat* 2010;31(4):369-79.
14. Hu X, Zhang S, Chen G, Lin C, Huang Z, Chen Y, Zhang Y. Expression of SHH signaling molecules in the developing human primary dentition. *BMC Dev Biol* 2013;13:11. doi: 10.1186/1471-213X-13-11.
15. Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, Jiang J. Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 2004;432(7020):1045-50.

16. Kim JM, Choi JS, Kim YH, Jin SH, Lim S, Jang HJ, Kim KT, Ryu SH, Suh PG. An activator of the cAMP/PKA/CREB pathway promotes osteogenesis from human mesenchymal stem cells. *J Cell Physiol* 2013;228(3):617-26.
17. Krebs EG. Protein Kinases. *Curr Top Cell Regul* 1972;5:99-133.
18. Krebs EG, Beavo JA. Phosphorylation-dephosphorylation of enzymes. *Annu Rev Biochem* 1979;48:923-59.
19. Kremer R, Li J, Camirand A, Karaplis AC. Parathyroid hormone related protein (PTHrP) in tumor progression. *Adv Exp Med Biol* 2011;720:145-60.
20. Lin D, Huang Y, He F, Gu S, Zhang G, Chen Y, Zhang Y. Expression survey of genes critical for tooth development in the human embryonic tooth germ. *Dev Dyn* 2007;236(5):1307-12.
21. Liu, AYC. Differentiation-specific increase of cAMP-dependent protein kinase in the 3T3-L1 cells. *J Biol Chem* 1982;257(1):298-306.
22. Makinodan E, Marneros AG. Protein kinase A activation inhibits oncogenic Sonic hedgehog signaling and suppresses basal cell carcinoma of the skin. *Exp Dermatol* 2012;21(11):847-52.
23. Nakatomi M, Morita I, Eto K, Ota MS. Sonic hedgehog signaling is important in tooth root development. *J Dent Res* 2006;85(5):427-31.
24. Niewiadomski P, Zhujiang A, Youssef M, Waschek JA. Interaction of PACAP with Sonic hedgehog reveals complex regulation of the hedgehog pathway by PKA. *Cell Signal* 2013;25(11):2222-30.
25. Ohazama A, Johnson EB, Ota MS, Choi HY, Porntaveetus T, Oommen S, Itoh N, Eto K, Gritli-Linde A, Herz J, Sharpe PT. Lrp4 modulates extracellular integration of cell signaling pathways in development. *PLoS One* 2008;3(12):e4092.

26. Ouyang H, Franceschi RT, McCauley LK, Wand D, Somerman MJ. Parathyroid hormone-related protein down-regulates bone sialoprotein gene expression in cementoblasts: role of the protein kinase A pathway. *Endocrinology* 2000;141(12):4671-80.
27. Perdigão PF, Stergiopoulos SG, De Marco L, Matyakhina L, Boikos SA, Gomez RS, Pimenta FJ, Stratakis CA. Molecular and immunohistochemical investigation of protein kinase a regulatory subunit type 1A (PRKAR1A) in odontogenic myxomas. *Genes Chromosomes Cancer* 2005;44(2):204-11.
28. Piludu M, Medniecks MI, Hand AR. Cyclic AMP-receptor proteins in human salivary glands. *Eur J Morphol* 2002;40(4):219-25.
29. Roesler WJ, Vandembark GR, Hanson RW. Cyclic AMP and the induction of eukaryotic gene transcription. *J Biol Chem* 1988;263(19):9063-6.
30. Sakai D, Suzuki T, Osumi N, Wakamatsu Y. Cooperative action of Sox9, Snail2 and PKA signaling in early neural crest development. *Development* 2006;133(7):1323-33.
31. Schwartz DA, Rubin CS. Regulation of cAMP-dependent protein kinase subunit levels in friend erythroleukemic cells. Effects of differentiation and treatment with 8-Br-cAMP and methylisobutyl xanthine. *J Biol Chem* 1983;258(2):777-84.
32. Scott JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. *Pharmacol Ther* 1991;50(1):123-45.
33. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86(9):4041-6.

34. Taskén K, Skalhogg BS, Taskén KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, *et al.* Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinase. *Adv Second Messenger Phosphoprotein Res* 1997;31:191-204.
35. Yao S, Wise GE. Protein kinase A expression and its possible roles in regulating tooth eruption genes in the dental follicle. *Med Sci Monit* 2003;9(5):BR160-7.

Figure Legends:

Figure 1: Whole mount *in situ* hybridization analysis of *Prkar1a* and *Prkar2a* expression in mouse tooth development. Expression in mouse heads at E10.5 (A, A'), E12.5 (B, B', C, C'), E13.5 (D, D', E, E') and E14.5 (F, F', G, G'). *Prkar1a*; A-G, *Prkar2a*; A'-G'. Arrowheads and arrows indicating the expression in incisors and molar tooth germ, respectively.

Figure 2: Radioactive *in situ* hybridization analysis of *Prkar1a* and *Prkar2a* expression in mouse tooth development. Frontal sections showing expression at E12.5 (A, B, A', B'), E13.5 (C, D, C', D'), E14.5 (E, F, E', F') and E18.5 (G, H, G', H'). *Prkar1a*; A-J, *Prkar2a*; A'-J'. Tooth epithelium are outlined in red. Arrows indicating tooth mesenchyme.

Figure 3: Radioactive *in situ* hybridization analysis of *PRKAR1A* and *PRKAR2A* expression in human odontogenesis. Frontal sections demonstrating expression at bud (A, A'), cap (B, B') and bell stage (C, C'). *PRKAR1A*; A-C, *PRKAR2A*; A'-C'. Tooth epithelium is outlined in red.

Figure 4: Diagrammatic representation of mouse *Prkar1a* and human *PRKAR2A* in tooth development. Expression of *Prkar1a* and *PRKAR2A* in epithelium shown in blue and in mesenchyme in red.

Figure 1

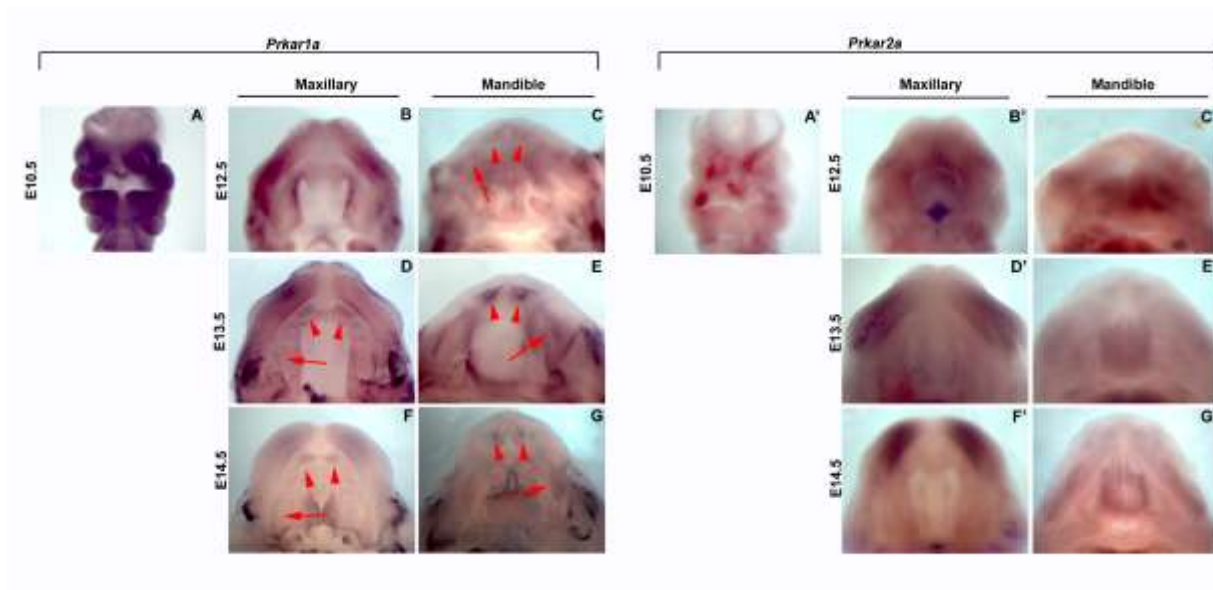


Figure 2

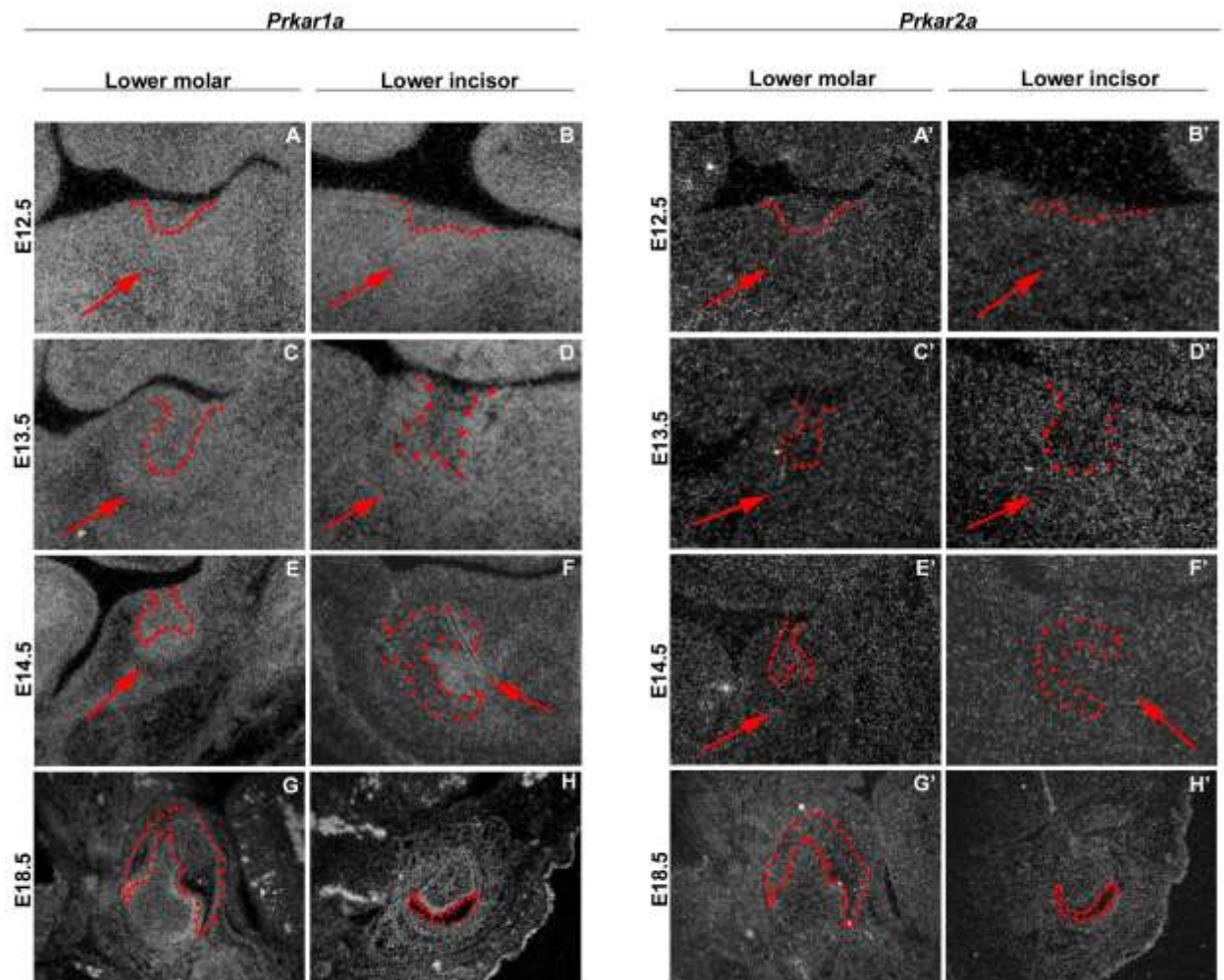


Figure 3

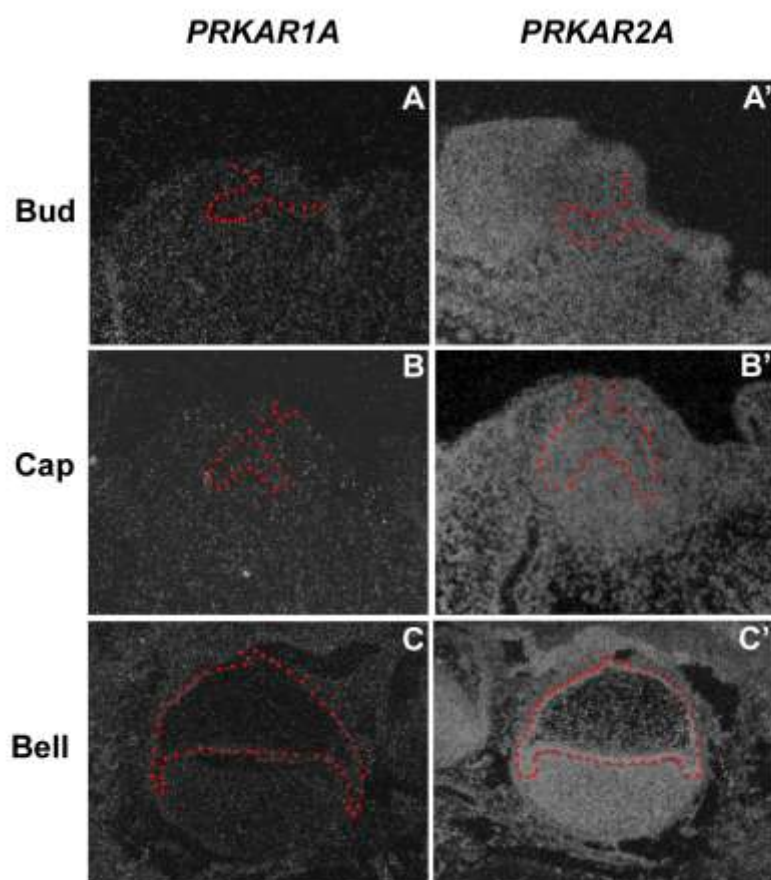
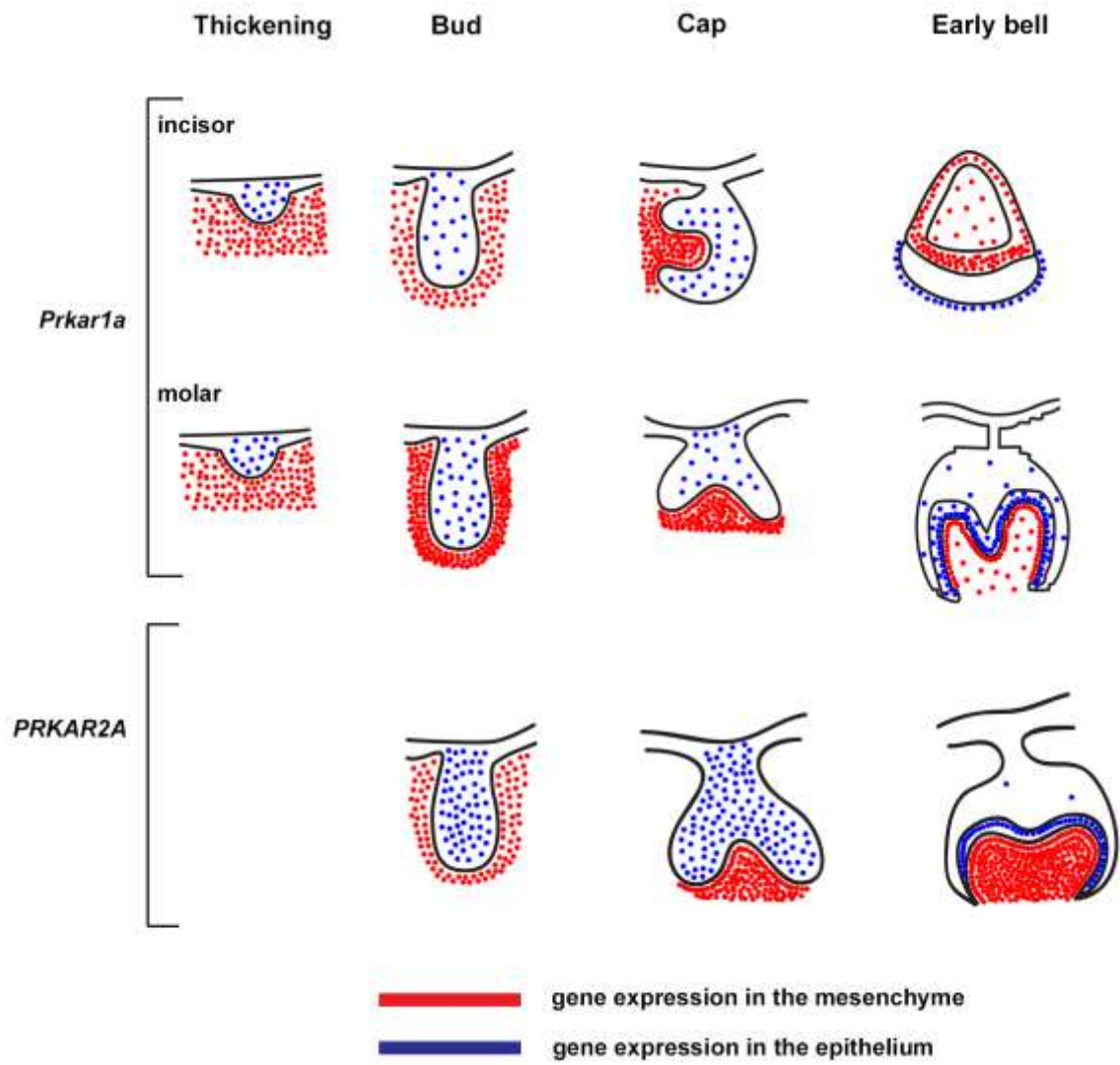


Figure 4



5.2 ARTIGO II:

O artigo desta seção intitulado “**Molecular analysis of *PRKAR1A* and its locus in odontogenic tumours with epithelium and ectomesenchyme reveals 17q LOH, mutations and loss of *PRKAR1A* expression**” será submetido ao periodico *Genes, Chromosomes and Cancer* (ISSN: 1045-2257, Fator de impacto: 3.836).

Title: Molecular analysis of *PRKARIA* and its locus in odontogenic tumors with epithelium and ectomesenchyme reveals 17q LOH, mutations and loss of PRKAR1A expression

Authors:

Sílvia F Sousa¹, Marina G Diniz¹, Vanessa F Bernardes², Flávia FC Soares¹, João Artur R Brito¹, Constantine A Stratakis³, Hélder Antônio R Pontes⁴, Ricardo S Gomez¹, Carolina C Gomes^{2*}

5. Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.
6. Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.
7. Section on Endocrinology and Genetics, Program on Developmental Endocrinology & Genetics (PDEGEN), NIH, Bethesda, United States.
8. João de Barros Barreto University Hospital, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil.

***Corresponding author:**

Carolina C Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais,

Av. Antônio Carlos, 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil CEP 31270-901

Tel: +55 31 34092477; Fax: +55 31 34092430

E-mail: carolinacgomes@ufmg.br

Abstract

The surgical treatment of some odontogenic tumors often leads to tooth and maxillary bone loss as well as facial deformity. Therefore, the identification of genes involved in their pathogenesis may result in alternative molecular therapies. In this sense, the *PRKARIA* shows loss of protein expression, as well as mutations in odontogenic myxomas, an odontogenic ectomesenchymal neoplasm. We assessed by using a combination of qRT-PCR, immunohistochemistry, LOH analysis and direct sequencing of all *PRKARIA* exons if this gene is altered in mixed odontogenic tumors. Thirteen tumors were included, being six ameloblastic fibromas, four ameloblastic fibro-odontomas, one ameloblastic fibrodentinoma and two ameloblastic fibrosarcomas. The epithelial component of the tumors was separated from the mesenchymal by laser microdissection in most of the cases. We further searched for odontogenic tumors in nine *Prkar1a*^{+/-} mice. We show that *PRKARIA* mRNA/protein expression is decreased in the benign mixed odontogenic tumors in association with LOH at markers around *PRKARIA* gene. Conversely, the malignant samples showed these *PRKARIA* alterations at a minor extent. We detected a missense and two synonymous mutations, besides two 5'-UTR and four intronic mutations in the mixed odontogenic tumors. The set of *Prkar1a* heterozygous mice investigated did not show evidence of odontogenic tumor formation. On the basis of our findings, the *PRKARIA* gene and its locus is altered in mixed odontogenic tumors and the expression of the gene is decreased in the subset of tumors investigated, suggesting that alterations in this gene are part of the molecular pathogenesis of the mixed odontogenic tumors.

Key words: mixed odontogenic tumors, ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, ameloblastic fibrodentinoma, ameloblastic fibrosarcoma, loss of heterozygosity.

Introduction:

Odontogenic tumors arise from odontogenic tissues, and they can be aggressive and destructive lesions. The surgical treatment may result in high morbidity, leading to tooth and maxillary bone loss as well as facial deformity. Therefore, elucidate the molecular pathogenesis of these entities may be useful in designing targeted therapies to be used in large, destructive, aggressive or recurrent cases.

The mixed odontogenic tumors are a group of rare tumors and were classified by the World Health Organization (WHO) as odontogenic tumors with odontogenic epithelium and odontogenic ectomesenchyme with or without hard tissue formation (Barnes *et al.*, 2005). This group of tumors comprises the ameloblastic fibroma (AF), ameloblastic fibro-odontoma (AFO), ameloblastic fibrodentinoma (AFD), ontoameloblastoma, deninogenic ghost-cell tumor, calcifying cystic odontogenic tumor as well as the odontomas.

The AF is a rare benign tumor characterized by proliferation of odontogenic ectomesenchyme resembling the dental papilla, with epithelial strands and nests similar to the dental lamina and enamel organ (Barnes *et al.*, 2005). It is regarded a true neoplastic lesion with risk of malignant transformation of the mesenchymal counterpart into ameloblastic fibrosarcoma (AFS) (Philipsen *et al.*, 1997; Bernardes *et al.*, 2012). In previous series including Brazilian as well as Mexican cases, the AF corresponded to about 0.7% of the odontogenic tumors and the AFS corresponded to only 0.13% (Galvão *et al.*, 2012). In the presence of hard tissues such as dentin or enamel, the lesion may be classified as ameloblastic fibrodentinoma (AFD) or ameloblastic fibroodontoma (AFO), respectively (Barnes *et al.*, 2005). AF, AFD and AFO belong to the group of mixed odontogenic tumors. These lesions histopathologically resemble various stages of

tooth formation, although there is still a debate on whether they are separate entities or different stages in the maturation of the same lesion (Praetorius, in Barnes, 2009).

Several studies have focused on the molecular pathogenesis of the odontogenic tumors, however as the mixed odontogenic tumors are rare, studies involving their aetiopathogenesis are scarce. Genes involved in the odontogenesis process and tumor suppressor genes are the main targets of molecular studies of odontogenic tumors (Barreto *et al.*, 2000; Perdigão *et al.*, 2004; Gomes and Gomez, 2011; Farias *et al.*, 2012). In this context, our group described LOH (loss of heterozygosity) at tumor suppressor genes loci in the mixed odontogenic tumors AF and AFO, as well as in AFS (Galvão *et al.*, 2012).

PRKARIA is a tumor-suppressor gene encoding protein kinase A regulatory subunit 1 α . Reduction in cellular levels of R1 α results in increased PKA/cAMP signaling and activation of the processes of proliferation and differentiation (Robinson-White *et al.*, 2006). This gene is mutated in sporadic (Maleszewski *et al.*, 2014) and in syndromic (Carney complex) cardiac myxomas (Kirschner *et al.*, 2000a). On the basis of histologic similarities between the cardiac myxomas and odontogenic myxomas, our group assessed *PRKARIA* gene expression in odontogenic myxomas and described decreased protein expression as well as the presence of one missense mutation and a single deletion (Perdigão *et al.*, 2005).

We recently assessed *PRKARIA* and *PRKAR2A* mRNA expression by quantitative reverse-transcription polymerase chain reaction (qRT-PCR) and *in situ* hybridization during normal human and murine odontogenesis (de Sousa *et al.*, 2014). Considering *PRKARIA* expression in normal tooth development (de Sousa *et al.*, 2014), and its alterations found in the ectomesenchyme of odontogenic myxomas (Perdigão *et al.*, 2005), we questioned whether such molecular alterations are shared by other

odontogenic tumors containing a ectomensechymal component (AF, AFO, AFD and AFS). In the present study we aimed to investigate molecular alterations of *PRKARIA* in a set of mixed odontogenic tumors by using qRT-PCR, immunohistochemistry, LOH analysis and direct sequencing. We further investigated the occurrence of odontogenic tumors in *Prkar1a*^{+/-} mice.

Materials and Methods:

Odontogenic tumors – identification and recruitment

This study was approved by the Ethics Committee of the author's University (protocol #498/11). Fresh tissue samples were collected from patients attended at Oral Diagnosis Service at the Dentistry School of UFMG, after written informed consent signature to participate in this study. Twenty fresh samples were included in the qRT-PCR, consisting of 7 ameloblastomas (AM) as a comparison group, 1 AF (case #1), 1 AFD (case #9), 5 normal oral mucosa (OM) and 6 pericoronal follicle. Pericoronal follicles were obtained from impacted third molars free of clinical inflammation, and normal oral mucosa included was obtained during surgeries of odontogenic tumors.

Due to rarity of the mixed odontogenic tumors, we further included 11 formalin-fixed paraffin embedded (FFPE) samples, being five AF and four AFO, as well as two odontogenic sarcomas (FSA). Table 1 shows the odontogenic tumors investigated and the experiments performed with each one.

All tumors had hematoxylin and eosin (HE) slides revised by at least two pathologists. Diagnoses were based on previously reported criteria (Barnes *et al.*, 2005).

Tissue processing

A portion of each fresh tissue collected was stored in RNA Holder (Bioagency Biotecnologia, São Paulo, SP, Brazil) and in tissue-tek (Sakura Finetek, Torrance, CA, USA). RNA holder samples were stored at 4°C during 24 hours before being frozen in liquid nitrogen, and tissue-tek samples were immediately immersed in nitrogen. A third part was FFPE for diagnosis confirmation.

RNA extraction and quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR)

Total RNA was extracted from the fresh samples of AM (n=7), AF (n=1), AFD (n=1), normal OM (n=5) and pericoronal follicle (n=6) using the TRIZOL reagent method (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and evaluated by comparative CT qRT-PCR. After careful evaluation, a pool of 6 dental follicles were chosen as calibrator, as they homogenously expressed the target and endogenous genes, which was chosen to be 28s rRNA. Target genes were *PRKARIA* (F 5'-TCTGTGTGCAACTAACTGACTCTGTT-3' and R 5'-CCTCTTCCCCAGATTTATACTTCATACT-3'; amplicon size 145 bp) and *PRKAR2A* (F 5'-GGCCCAACCCGTCTATCC-3' and R 5'-GCAGCACCTCCACCGTG TAG-3'; amplicon size 102 bp). The average Ct for three replicates per sample was used to calculate ΔCt . Relative quantification of these genes expressions was calculated using the $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ formula (Livak and Schmittgen, 2001). Melting curve analysis followed each reaction, to ensure specificity. qRT-PCR conditions were carried out using 1x SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Warrington, UK) as described previously by de Sousa *et al.*, 2014. Odontogenic tumor's expressions were compared with normal oral mucosa control group.

Immunohistochemistry (IHC)

On the basis of *PRKARIA* decreased transcriptional levels in the set of odontogenic tumors evaluated, we investigated the immunohistochemical expression of the protein in a larger number of samples, including 7 epithelial (ameloblastomas) and 11 mixed odontogenic tumors. IHC was not carried out in cases #2 and #3 due to small amount of available tissue. 4µm thickness tissue sections were mounted to immunohistochemistry (IHC) on *StarFrost® knittel glass* adhesive slides (Waldemar Knittel Glasbearbeitungs- GmbH, Braunschweig, Germany). Immunohistochemical reactions were performed using a mouse monoclonal antibody against PRKA1A protein (clone 6C7) (OriGene, Rockville, MD, USA). The processes of deparaffinization, hydration, and antigen retrieval were performed by immersing the slides in Trilogy solution (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) and heated to 98°C in a steamer for 20 min. The primary antibody was diluted at 1:80 and incubated for 30 min at room temperature. EnVision™ + Dual Link System-HRP (Dako, Carpinteria, CA, USA) were used as the detection system for 30 min at room temperature. The reactions were revealed by applying 3,3'-diaminobenzidine in chromogen solution (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, USA), and the Mayer's hematoxylin was used for counterstaining. The slides were mounted in Permount (Fisher Scientific, NJ, USA). IHC was performed manually, and normal oral mucosa was used as positive control. Negative controls were carried out by omission of primary antibody.

The IHC results were analyzed by 3 investigators (RSG, SFS and VFB) considering the distribution of antibody staining in the entire lesion section, regardless of staining intensity, categorizing the staining in: strong, in the presence of an evident staining in the majority of tumor cells (>50%); moderate, when a significant proportion

of the neoplastic cells were positive (10-50%); and weak/negative, in the absence of marked cells or occasional cells stained (<10%).

Microdissection

Manual microdissection (MM) and laser capture microdissection (LCM) were performed in all 11 FFPE samples of mixed odontogenic tumors that harboured normal and tumor areas (**Table 1**). For manual microdissection, H&E slide was superimposed against paraffin block for delimitation tumor from the capsule. Ten sections were cut at 10 μm thickness for posterior DNA extraction. For LCM, sections were cut at 12 μm thickness onto a MMI membrane (Olympus, Tokyo, Japan), and air dried. Staining procedures were executed as described previously (Strokes *et al.*, 2011). Stained sections were microdissected using an Olympus IX81 microscope and MMI CellCut Plus (Olympus, Tokyo, Japan) laser microdissection system. Tumor epithelial cells, tumor mesenchymal cells and normal cells (capsule or blood vessels endothelium) were collected into separate sterile cap plastic tube.

DNA isolation

Microdissected tissue fragments were digested with proteinase K. Genomic DNA of fresh and FFPE samples were extracted with the use of DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen, Hilden, Germany) and QiaAmp DNA FFPE tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany), respectively.

Loss of heterozygosity (LOH) analysis

LOH was assessed by using a panel of 4 polymorphic DNA markers located around *PRKARIA* (**Figure 1A**). Primers used were selected according to the online database (www.ncbi.nlm.nih.gov/probe) and they have been previously used by others (Bertherat *et al.*, 2003). PCR for the four markers were performed as follows: 45 cycles at 96°C for 10s, 55°C for 30s and 70°C for 1 min. PCR products were resolved on 6.5% non-denaturing polyacrylamide gels, silver stained. All PCRs were performed for tumor (epithelium and mesenchyme) and normal tissue (capsule) under the same conditions. Amplification products were detected by capillary electrophoresis on an ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA). LOH was calculated as previously described by Farias *et al.*, 2012.

Direct Sequencing

DNA targets were PCR-amplified using primer pairs flanking exons 1 to 10, as previously described (Kirschner *et al.*, 2000b). Amplified products were confirmed by electrophoresis on 6.5% polyacrylamide gels with silver staining. PCR products were purified with GFXTM PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) and sequenced using BigDyeTM Terminator (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) on an ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Electropherograms were manually analyzed with *Sequence Scanner 2* software (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). The reference sequence adopted was NM_002734.4. All mutation and sequence variance found were checked at Catalogue of somatic Mutations in Cancer (COSMIC), Ensembl Genome Browser, and NCBI dbSNP databases.

Prkar1a^{+/-} mice

The heads of *Prkar1a*^{+/-} mice (C57BL/6 background) carrying a deletion of exon 2 (Kirschner *et al.*, 2005) were included in the study. All animal work in this study was carried out in accordance with Institutional Laboratory Animal Care and Use Committee at the NIH, Bethesda, MD, USA. These animals were bred at the National Institute of Child Health and Human Development, (NIH). A total of 5 heads of one month mice and 4 heads of six months mice were dissected and after all skin was removed they were fixed in 4% paraformaldehyde (PFA). The heads were slowly decalcified with EDTA 0.9M at pH 7.5 during a period of 20 days, rinsed with distilled water, sectioned, paraffin embedded and H&E stained. The sections were analyzed under a light optical microscope by RSG, SFS and CCG.

Statistical analysis:

Analyzes were performed using SPSS software version 17.0 (SPSS Inc., Chicago, IL). Normal distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test. Mann-Whitney test was used to compare the relative quantification of *PRKARIA* and *PRKAR2A* in odontogenic tumors and normal oral mucosa. Probability values of <0.05 were considered to be statistically significant.

Results

The results of molecular analysis (mRNA transcription, IHC, LOH, and sequencing) are presented in **Figures 1-4**, and **Table 2**.

qRT-PCR

We started this study assessing the mRNA expression levels of *PRKARIA* and *PRKAR2A* in an epithelial odontogenic tumor (ameloblastomas, n=7) and two samples of fresh mixed odontogenic tumors (one AF and one AFD) and compared these expressions with a control group of five normal oral mucosa samples, using a pool of normal dental follicles as reaction calibrators. Both genes were expressed in all odontogenic tumors evaluated. However, comparing the relative quantification of *PRKARIA*, the odontogenic tumors showed a decreased expression of *PRKARIA* compared to normal oral mucosa ($p < 0.05$) (**Figure 2**), whereas *PRKAR2A* mRNA expression was similar between the tumors and normal mucosa (data not shown).

Immunohistochemistry (IHC)

While all the ameloblastomas showed positive expression of the protein in the epithelial islands, four AF showed weak/negative staining in the ectomesenchymal component (**Figure 3A, B**), and one case exhibited negative staining not only in the ectomesenchyme but also in the epithelium (**Figure 3B**). The AFD sample showed strong expression in both components (**Figure 3C**). Two samples of AFO showed loss of protein expression in the ectomesenchymal component (**Figure 3D**). The blood vessels showed positive staining, which was considered as a positive internal control (**Figure 3A-D**). Results are shown in **Table 2**.

Loss of heterozygosity analysis (LOH)

As the mixed odontogenic tumors exhibited loss of protein expression, we investigated if LOH at the *PRKARIA* locus could be one of the underlying mechanisms of such gene expression loss. We assessed LOH by a panel of 4 polymorphic

microsatellite markers (**Figure 1A**) in a set of 5 AF, 2 AFS, 1 AFD and 2 AFO. In cases # 6, #12 and #13 LOH analysis was not carried out as they did not harbor normal tissue control or due to small amount of available tissue. Four out of five AF exhibited LOH in at least 2 markers evaluated, presenting LOH in the ectomesenchyme and/or epithelium (**Figure 1B**). 1/2 AFO showed LOH. One AFS exhibited LOH in the epithelium for the same markers that showed LOH in the AF. Only 4 cases investigated did not present LOH (**Table 2**).

Direct Sequencing:

As the *PRKARIA* gene is mutated in several human tumors, including the odontogenic myxomas (Perdigão *et al.*,2005), we sequenced DNA from exon 1 to 10 in the epithelium and ectomesenchyme of tumors with enough amount of tissue available (#1, #2, #4, #5, #6, #7, # 9, #10 and #11). Nucleotide numbering reflects cDNA numbering with +1 corresponding to the A of the ATG translation initiation codon in the reference sequence (NM_002734.4). A list of all *PRKARIA* mutations and SNPs identified are summarized in **Table 3**.

We found three mutations in the coding region, being two synonymous mutations and one missense. We found a missense mutation (c.802G>A) in exon 8 in the ectomesenchymal component of case #11. This mutation leads to a nonconservative amino acid substitution (p.A268T). The possible impact of this substitution on the stability and function of protein was predicted as damaging by SIFT (*sift.jcvi.org*) (score 0.01), and by PolyPhen-2 (*genetics.bwh.harvard.edu/pph2/*) (score 1.000).

In addition, we report two mutations in the 5'-UTR and four intronic mutations. We further found three single nucleotide polymorphisms (SNPs). All alterations found are represented in **Figure 4A** and the screen shots from sequencing electropherograms

of the missense mutation, one synonymous and one 5'-UTR mutations found are shown in **Figure 4B, C and D**.

Analysis of H&E staining of the heads PRKARIA^{+/-} mice

H&E stained sections of the heads of the heterozygous mice did not exhibit any evidence of odontogenic tumor or alterations in the tooth apparatus during odontogenesis. Histologically all structures evaluated were in accordance with normal odontogenesis.

Discussion

Scarce investigations about the molecular pathogenesis of the mixed odontogenic tumors exist due to rarity of these tumors. The majority of studies are based on IHC findings of diagnostic and prognostic biomarkers. Following the molecular alterations described in cardiac myxomas (Kirschner *et al.*, 2000a; Kirschner *et al.*, 2000b), *PRKARIA* was shown to be involved in the pathogenesis of odontogenic myxomas after observation of decreased *PRKARIA* protein expression and mutations found by Perdigão *et al.* (2005). The odontogenic myxoma is an odontogenic tumor probably derived from the ectomesenchymal tissue during odontogenesis disruption (reviewed by Gomes *et al.*, 2011). The mixed odontogenic tumors share this ectomesenchymal origin, together with the participation of the odontogenic epithelium. Therefore, it is possible that these tumors share similarities with the odontogenic myxomas in their molecular pathogenesis.

We show in the present report decreased *PRKARIA* mRNA transcription levels in the odontogenic tumors compared to normal oral mucosa and a lack of *PRKARIA*

protein expression in some mixed odontogenic tumors. On the pursuit of the underlying molecular causes of such decreased *PRKARIA* mRNA and protein expression in these tumors, we investigated LOH and direct sequenced the DNA of a panel of mixed odontogenic tumor samples.

About half of the benign tumors exhibited loss of *PRKARIA* protein expression, mainly in the mesenchymal portion. Furthermore, all these cases with decreased protein expression investigated showed LOH at the *PRKARIA* locus in the epithelial and/or mesenchymal component, reinforcing that LOH found in these tumors could be one reason for loss of protein expression found. Conversely, although one AFS exhibited LOH in 2/3 informative markers in the epithelial component, the two cases of AFS showed moderate expression of *PRKARIA* protein and did not reveal the presence of *PRKARIA* mutations. Despite the small AFS sample number, these findings suggest that *PRKARIA* alterations may have a more important role in the pathogenesis of the benign mixed odontogenic tumors. Another possibility is that, as previously hypothesized for adrenocortical adenomas (Bertherat *et al.*, 2003), *PRKARIA* down-regulation may be an early event in tumorigenesis which is quickly bypassed by other pathways more important for cell survival.

We report new missense and synonymous mutations and underreported mutations in noncoding regions of *PRKARIA*, such as the 5'-UTR region and introns in four benign mixed odontogenic tumors. Similarly to the missense mutation found in odontogenic myxomas (Perdigão *et al.*, 2005), the missense mutation we describe occurred in the second cAMP binding domain, what may have effects on the interaction of this protein with its ligand, affecting the functionality of the protein. In consonance with this finding, the effect of this substitution was predicted to be damaging. The absence of LOH and the strong immunopositivity seen in both components of this

sample, suggest that either the substitution p.A268T did not cause a decrease in PRKAR1A protein expression that could be detected by IHC, or the mutation occurred only in a group of cells as a result of a supposed tumor heterogeneity. Although a neoplasia cannot be defined only by the presence of mutations, the missense mutation occurred in the ectomesenchymal part of an AFO case of one of the youngest patients in our series (6 y.o.). The presence of a missense mutation only in the AFO case is interesting, as there is ongoing debate in the literature about the true neoplastic nature of the AFO *vs.* being considered a developing odontoma, i.e., hamartoma (Buchner *et al.*, 2013)

The synonymous mutations found are believed to be silent, as they do not alter the protein sequence. However, recently it has been proposed that these synonymous mutations could affect time or accuracy of mRNA translation and could lead to aberrant splicing, resulting in a frameshifted mRNA, thus affecting gene expression (Supek *et al.*, 2014; Zheng *et al.*, 2014). Also, there is increasing evidence that noncoding DNA changes may affect disease susceptibility (Castillo-Davis, 2005). Some noncoding regions are recurrently mutated in cancer, especially regulatory regions at the 5' end of genes, such as promoters and 5'-UTRs (Weinhold *et al.*, 2014). Although is not clear the significance of the 5'-UTR mutation found, some studies demonstrated that truncations or mutations in the 5'-UTR often lead to impaired protein synthesis, as demonstrated in the analysis of the 5'-UTR *BRCA1* mRNA, which revealed that a G→C mutation close to the end of the 5'-UTR was associated with decreased *BRCA1* gene expression (Signori *et al.*, 2001).

Human tumors often display intratumor heterogeneity in various features including histology, gene expression and genotype (Michor and Polyak, 2010). An interesting finding in our study is the molecular heterogeneity found when we compare

the epithelial component and the mesenchymal cells of the tumors, which showed differences in the LOH and mutation profiles. This could only be achieved by using laser microdissection and it is the first evidence that these tumor parts are different not only in histology, but also molecularly.

The *Prkar1a*^{+/-} mouse heads examined here did not demonstrate any odontogenic tumor formation or normal odontogenesis disruption. Our results are in line with the results of Almeida *et al.* (2010), who provided evidence that *Prkar1a* haploinsufficiency is a relatively weak tumorigenic signal, acting synergistically when combined with other tumor suppressor haploinsufficiency (*Trp53*^{+/-} and *Rb1*^{+/-}) (Almeida *et al.*, 2010).

Taken together our results suggest that as for other tissues/organs *Prkar1a* harbors a weak tumorigenic signal for the odontogenic tissues of mice. In addition, we show that *PRKARIA* mRNA/protein expression is decreased in the benign mixed odontogenic tumors in association with LOH at markers around *PRKARIA* gene. We detected a missense mutation in a AFO and two synonymous mutations (in one AFD and one AF), besides mutations located at noncoding regions, such as the 5'-UTR and introns, suggesting that *PRKARIA* alterations are part of the molecular pathogenesis of the mixed odontogenic tumors.

Acknowledgements:

This study was supported by the follow Brazilian funding agencies: Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil. R.S. Gomez and C.C. Gomes are research fellows at CNPq, and M.G. Diniz is research fellow at CAPES. The authors

acknowledge the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG) for the LMD technical support and Dr. Adriano Loyola for donation of two tumor samples for the study.

References:

1. Almeida MQ, Muchow M, Boikos S, Bauer AJ, Griffin KJ, Tsang KM, Cheadle C, Watkins T, Wen F, Starost MF, Bossis I, Nesterova M, Stratakis CA. Mouse Prkar1a haploinsufficiency leads to an increase in tumors in the Trp53^{+/-} or Rb1^{+/-} backgrounds and chemically induced skin papillomas by dysregulation of the cell cycle and Wnt signaling. *Hum Mol Genet.* 2010;19(8):1387-98.
2. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D eds. WHO Classification of Tumours. Pathology & Genetics. In: Head and Neck Tumours. Chapter 6, Odontogenic tumours. Lyon: IARC Press, 2005;283-318.
3. 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.
4. Bernardes VF, Gomes CC, Gomez RS. Molecular investigation of ameloblastic fibroma: how far have we gone? *Head Neck Oncol.* 2012;4(2):45.
5. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res.* 2003;63(17):5308-19.
6. Buchner A, Kaffe I, Vered M. Clinical and radiological profile of ameloblastic fibro-odontoma: an update on an uncommon odontogenic tumor based on a critical analysis of 114 cases. *Head Neck Pathol.* 2013;7(1):54-63.
7. Castillo-Davis CI. The evolution of noncoding DNA: how much junk, how much func? *Trends Genet* 2005;21(10):533–6.

8. de Sousa SF, Kawasaki K, Kawasaki M, Volponi AA, Gomez RS, Gomes CC, Sharpe PT, Ohazama A. PKA regulatory subunit expression in tooth development. *Gene Expr Patterns*. 2014;15(1):46-51.
9. Farias LC, Gomes CC, Brito JA, Galvão CF, Diniz MG, de Castro WH, Bernardes V de F, De Marco LA, Gomez RS. Loss of heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol*. 2012;43(8):1229-33.
10. Galvão CF, Gomes CC, Diniz MG, Vargas PA, de Paula AM, Mosqueda-Taylor A, Loyola AM, Gomez RS. Loss of heterozygosity (LOH) in tumor suppressor genes in benign and malignant mixed odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(5):389-93.
11. Gomes CC, Gomez RS. PTCH1 gene inactivation is not a keratocystic odontogenic tumor exclusive alteration. *Oral Oncol*. 2011;47(3):226-7.
12. Gomes CC, Diniz MG, Duarte AP, Bernardes VF, Gomez RS. *Oral Oncol*. 2011;47(5):325-8.
13. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet*. 2000a;26(1):89-92.
14. Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns WH 2nd, Carney JA, Westphal H, Stratakis CA. A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res*. 2005;65(11):4506-14.
15. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lip JP, Carney JA, Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the Carney complex. *Hum Mol Genet*. 2000b;9(20):3037-46.

16. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402-8.
17. Maleszewski JJ1, Larsen BT, Kip NS, Castonguay MC, Edwards WD, Carney JA, Kipp BR. PRKAR1A in the Development of Cardiac Myxoma: A Study of 110 Cases Including Isolated and Syndromic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014;38(8):1079-87.
18. Michor F, Polyak K. The origins and implications of intratumor heterogeneity. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(11):1361-4.
19. Perdigão PF, Gomez RS, Pimenta FJGS, De Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncol*. 2004;40(8):841-6.
20. Perdigão PF, Stergiopoulos SG, De Marco LG, Matyakhina L, Boikos SA, Gomez RS, Pimenta FJGS, Stratakis CA. Molecular and immunohistochemical investigation of Protein Kinase A Regulatory Subunit Type 1A (PRKAR1A) in odontogenic myxomas. *Genes Chromosomes Cancer*. 2005;44:(2)204-11.
21. Philipsen HP, Reichart PA, Praetorius F. Mixed odontogenic tumors and odontomas. Considerations on inter-relationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol* 1997;33:86–99.
22. Praetorius F. Odontogenic tumors. In: Barnes L, ed. *Surgical pathology of the head and neck*. 3rd ed. New York, NY: Informa Healthcare USA; 2009:1240-1247.
23. Robinson-White AJ, Leitner WW, Aleem E, Kaldis P, Bossis I, Stratakis CA. PRKAR1A inactivation leads to increased proliferation and decreased apoptosis in human B lymphocytes. *Cancer Res* 2006;66:10603–10612.

24. Signori E, Bagni C, Papa S, Primerano B, Rinaldi M, Amaldi F, Fazio VM. A somatic mutation in the 5'-UTR of BRCA1 gene in sporadic breast cancer causes down-modulation of translation efficiency. *Oncogene*. 2001;20(33):4596-600.
25. Strokes A, Drozdov I, Guerra E, Ouzounis CA, Warnakulasuriya S, Gleeson MJ, McGurk M, Tavassoli M, Odell EW. Copy number and loss of heterozygosity detected by SNP array of formalin-fixed tissues using whole-genome amplification. *PLoS One*. 2011;6(9):e24503.
26. Supek F, Miñana B, Valcárcel J, Galbadón T, Lehner B. Synonymous mutations frequently act as driver mutations in human cancers. *Cell*. 2014;156(6):1324-35.
27. Weinhold N, Jacobsen A, Schultz N, Sander C, Lee W. Genome-wide analysis of noncoding regulatory mutations in cancer. *Nat Genet*. 2014;46(11):1160-5.
28. Zheng S, Kim H, Verhaak RG. Silent mutations make some noise. *Cell*. 2014;156(6):1129-31.

Tables:

Table 1. Demographic data of the odontogenic tumors included and experiments carried out with each of them

<i>Sample</i>	<i>Sex</i>	<i>Age, y</i>	<i>Location</i>	<i>Assay</i>			
				<i>IHC</i>	<i>MD</i>	<i>LOH</i>	<i>SEQ</i>
Ameloblastic fibroma							
*Case #1	F	7	Mandible	✓	LCM	✓	✓
Case #2	M	14	Mandible	—	MM	✓	✓
Case #3	M	13	Mandible	—	LCM	✓	—
Case #4	F	6	Mandible	✓	LCM	✓	✓
Case #5	F	NA	NA	✓	MM	✓	✓
Case #6	F	23	Mandible	✓	—	—	✓
Ameloblastic fibrosarcoma							
Case #7	M	25	Mandible	✓	LCM	✓	✓
Case #8	F	32	Mandible	✓	LCM	✓	—
Ameloblastic fibrodentinoma							
*Case #9	M	9	Maxilla	✓	LCM	✓	✓
Ameloblastic fibro-odontoma							
Case #10	M	9	Mandible	✓	MM	✓	✓
Case #11	M	6	Mandible	✓	LCM	✓	✓
Case #12	F	13	Mandible	✓	—	—	—
Case #13	F	12	Mandible	✓	—	—	—

*Cases 01 and 09 were fresh tumors. Case 06 didn't have a capsule for evaluation of normal tissue. F, Female; M, Male; NA, not available; MD, microdissection; LCM, laser capture microdissection; MM, Manual microdissection; LOH, loss of heterozygosity; IHC, immunohistochemistry; SEQ, sequencing; ✓, performed; —, not possible to be performed.

Table 2. Results of the immunohistochemistry and loss of heterozygosity analysis by sample

LOH Markers	LOH Markers																																		
	D17S1882		D17S942		D17S940		D17S2182		IHC		Samples																								
	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me	Ep	Me							
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	#8	#9	#10	#11	#12	#13	AF						AFS				AFD		AFO									
D17S1882	Red	Red	Black	Red	Red	Red	Blue	Red	Yellow	Red	Blue	Blue	Blue	Black	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue							
D17S942	Red	Red	Blue	Blue	Red	Yellow	Black	Blue	Yellow	Red	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue							
D17S940	Blue	Blue	Blue	Red	Red	Red	Red	Black	Yellow	Black	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue							
D17S2182	Red	Blue	Blue	Yellow	Yellow	Black	Yellow	Yellow	Yellow	Yellow	Black	Blue	Blue	Yellow	Black	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue	Blue							
IHC	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines	Horizontal lines							

Epithelial and mesenchymal tumor cells could not be separated by LCM in cases #2, #5 and #10. LOH, loss of heterozygosity; IHC, immunohistochemistry; Ep, epithelium; Me, mesenchyme; AF, ameloblastic fibroma; AFS, ameloblastic fibrosarcoma; AFD, ameloblastic fibrodentinoma; AFO, ameloblastic fibro-odontoma;

■ LOH; ■ heterozygous; ■ homozygous; ■ not possible to analyze
■ strong immunoexpression; ■ moderate immunoexpression; weak/negative immunoexpression

Table 3: Mutations and SNPs of the *PRKARIA* gene identified in the mixed odontogenic tumors

Mutation	<i>Location</i>	<i>Effect</i>	<i>Diagnosis</i>	<i>Case #</i>	<i>Component</i>
c.-50C>T	Exon 1B	5'-UTR	AF	1	Epithelial
c.-27C>T	Exon 1B	5'-UTR	AF	1	Epithelial
c.159C>T	Exon 2	Synonymous	AFD	9	Epithelial
c.492G>A	Exon 4B	Synonymous	AF	5	Tumor*
c.802G>A	Exon 8	Missense	AFO	11	Mesenchymal
c.503-10C>T	Intron 4B-5	Intronic	AFO	11	Epithelial
c.550-35G>A	Intron 5-6	Intronic	AFO	11	Mesenchymal
c.891+13G>A	Intron 8-9	Intronic	AFO	11	Mesenchymal
c.973+15C>T	Intron 9-10	Intronic	AFO	11	Mesenchymal
SNPs					
c.-453C>A	Exon 1A	5'UTR	AF, AFO	1, 11	Both
c.349-5_349insT	Intron 3-4A	Intronic	AF, AFD, AFO	1, 9, 11	Both
c.770-24G>A	Intron 7-8	Intronic	AF, AFD, AFO	1, 4, 9, 11	Both

AF, ameloblastic fibroma; AFD, ameloblastic fibro-dentinoma; AFO, ameloblastic fibro-odontoma; *Case 5 was manually microdissected in tumor and capsule.

Figure Legends:

Figure 1: Ideogram with the cytogenetic bands of chromosome 17 and polymorphic microsatellite markers and representative results of *PRKARIA* loss of heterozygosity (LOH). **(A)** Polymorphic DNA markers located on the long arm of chromosome 17, including D17S1882 (17q24.1), D17S942 (17q24.2), D17S940 (17q24.2) and D17S2182 (17q24.3) used to assess LOH at the *PRKARIA* genetic locus. **(B, C)** Loss of the long allele at marker D17S1882 in the mesenchyme of case #3 **(B)** and in the tumor of case #5 **(C)** compared to matched normal DNA. *short allele, **long allele.

Figure 2: Transcriptional levels of *PRKARIA* mRNA analyzed by qRT-PCR in the samples of epithelial (ameloblastoma) and mixed odontogenic tumors compared to normal oral mucosa. *PRKARIA* transcription levels in odontogenic tumors were decreased in relation to normal oral mucosa ($p < 0.05$; Mann-Whitney test). X-axis: pool of dental follicles used as reaction calibrator.

Figure 3: Immunostaining pattern of PRKAR1A in mixed odontogenic tumors. **(A and B):** AF; **(C):** AFD; **(D)** AFO. Strong expression in the epithelium is observed in **(A)**, **(C)** and **(D)**. Negative/weak expression in the mesenchyme was visualized in **(A and B)** and **(D)**. One sample of AF also exhibited absence of PRKAR1A expression in the epithelium **(B)**. Arrows indicate vessels as internal positive control. Original magnification $\times 400$ and $\times 100$.

Figure 4: Structure of the *PRKARIA* gene, protein and screen shots of sequencing electropherograms. **(A)** Locations of all mutations and SNPs found in our samples. **(B)** Heterozygous synonymous mutation in exon 4B (c.492G>A) (Wild-type (WT) codon GTG→Mutant codon GTA). **(C)** 5'-UTR mutation in exon 1B (c.-50C>T).

(D) Missense mutation found in exon 8 (c.802G>A) (Wild-type (WT) codon GCT→ Mutant codon ACT) and localization of this mutation in structure of the PRKAR1A protein (NH₂, amino-terminal extremity; COOH, carboxy-terminal extremity; D, dimerization domain; H, hinge region; cAMP1 and cAMP2, cAMP-binding domains).

Figure 1:

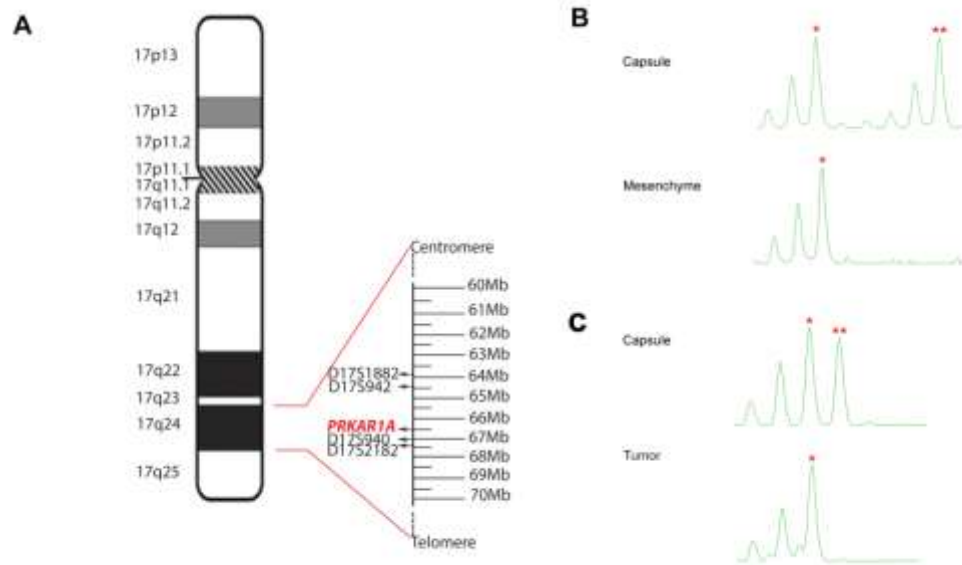


Figure 2

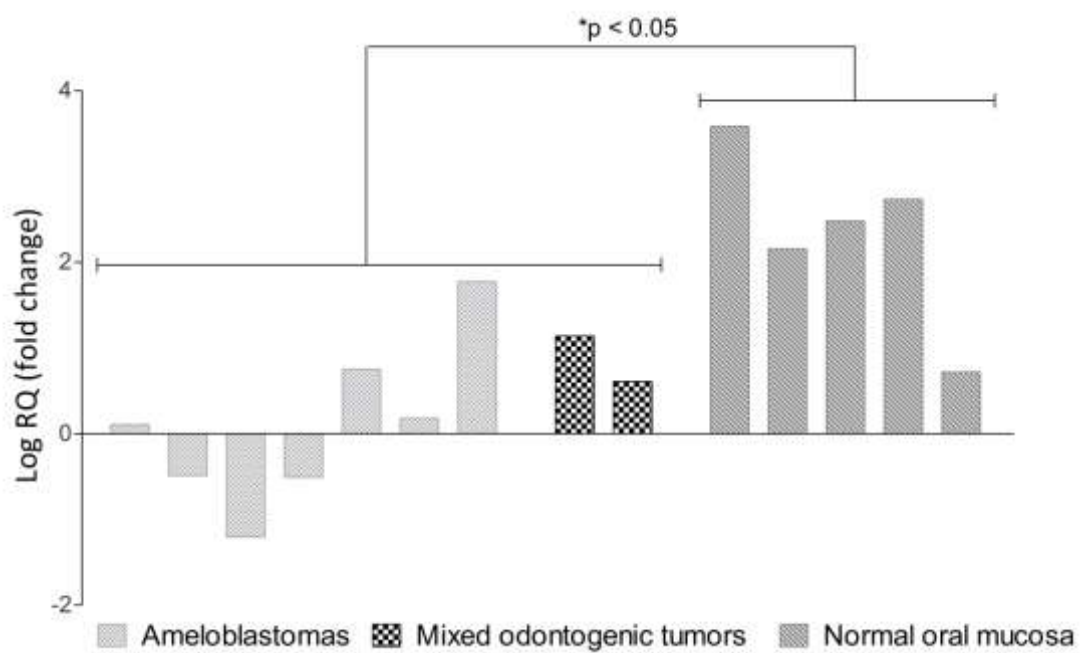


Figure 3

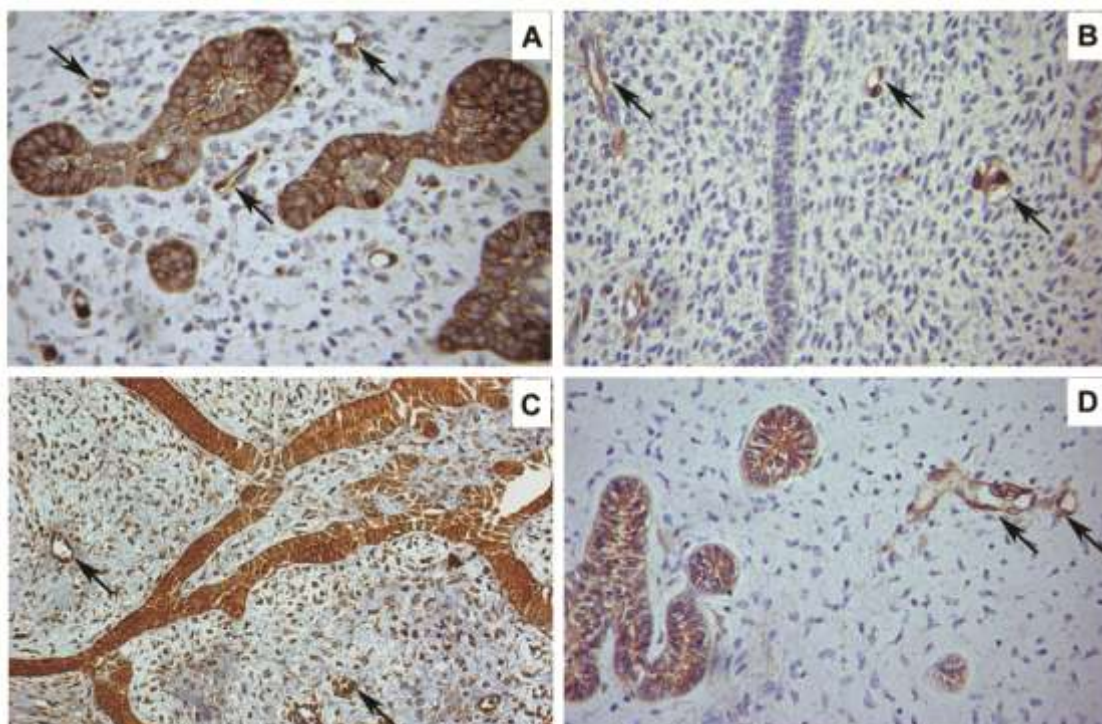
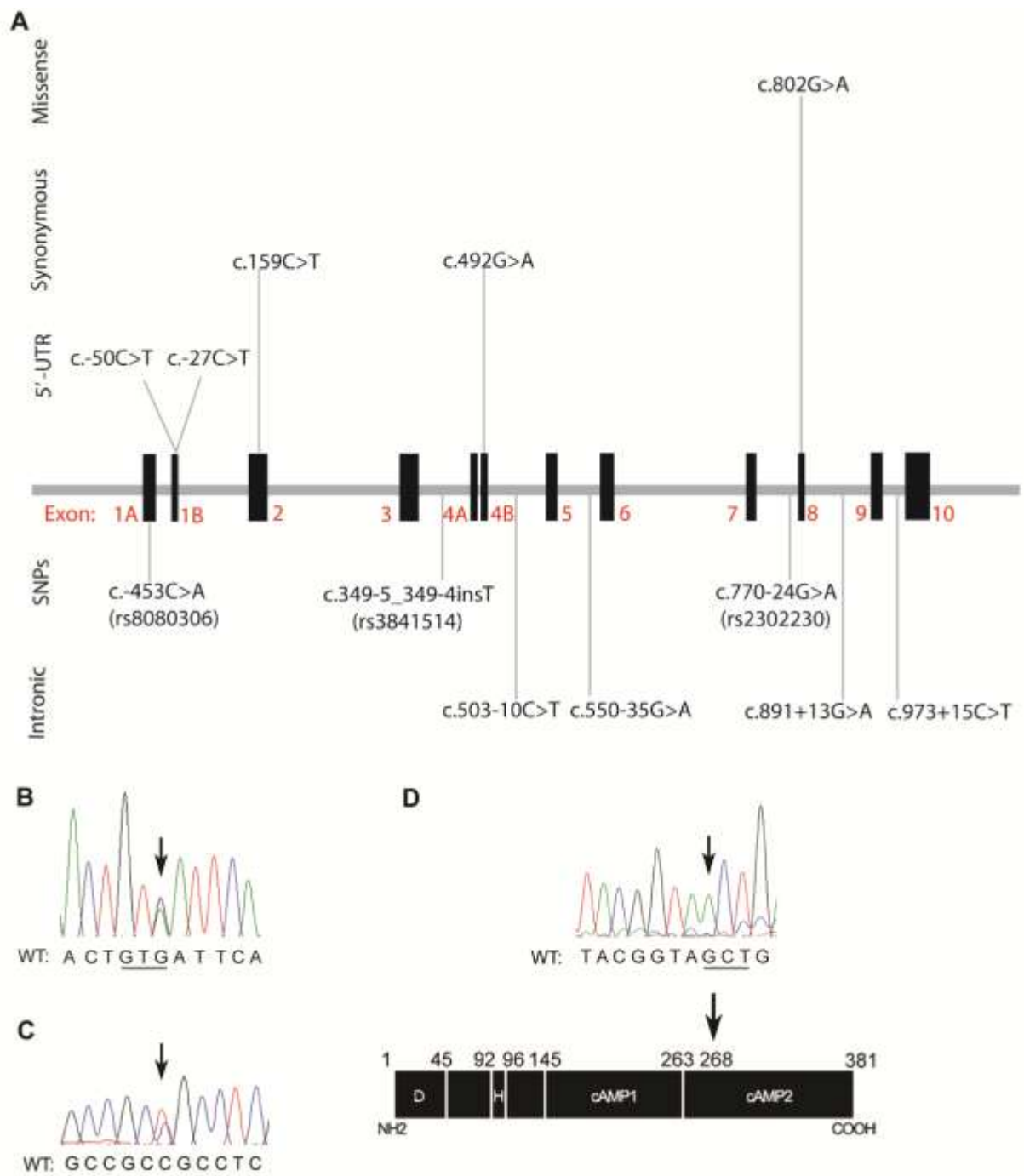


Figure 4



6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo buscou-se, inicialmente, caracterizar a expressão do gene estudado (*PRKAR1A/Prkar1a*) com o processo normal de formação dentária em embriões murinos e humanos. Diante dos achados prévios de que mecanismos compensatórios parecem ocorrer na ausência de uma das subunidades regulatórias da PKA, e de que as subunidades alfa seriam as principais subunidades desta proteína, entendemos que seria interessante investigar tanto a expressão da subunidade R1 α quanto da R2 α , acrescentando assim, o gene *PRKAR2A/Prkar2a* nesta etapa do estudo.

Os achados de padrões de expressão diferentes para os genes *PRKAR1A/Prkar1a* e *PRKAR2A/Prkar2a* na odontogênese normal, nos levou a verificar se essas diferenças se mantinham para os genes humanos *PRKAR1A* e *PRKAR2A* em tumores odontogênicos. A menor expressão de *PRKAR1A* nestes, em relação à mucosa oral normal além dos achados de que o *PRKAR1A* já havia sido encontrado mutado em mixomas odontogênicos, nos deu suporte para focar nosso estudo molecular somente no *PRKAR1A*. Assim, investigamos o gene *PRKAR1A* utilizando diferentes abordagens moleculares; avaliando sua expressão à nível do RNAm, sua expressão proteica, além de buscar possíveis alterações na sequência e no locus do gene em um grupo de tumores odontogênicos que apresentasse componente tecidual semelhante ao do mixoma, e que tivesse apresentação histológica semelhante à dos germes dentários: os tumores odontogênicos mistos como fibroma ameloblástico, fibrodentinoma ameloblástico, fibroodontoma ameloblástico e fibrossarcoma ameloblástico.

A imunistoquímica demonstrou que para a maior parte dos tumores investigados havia perda de expressão proteica pelas células do tumor, principalmente as do ectomesênquima. E os resultados da LOH para os marcadores microssatélites intergênicos investigados demonstram uma instabilidade genética na região do *PRKAR1A* nos tumores avaliados. Sendo que entre os 8 tumores investigados tanto para IHC como para LOH, 5 exibiram LOH, e destes, todos 5 apresentaram redução nos níveis de expressão da proteína em pelo menos um dos componentes. Ao sequenciarmos, encontramos uma mutação *missense* em um FOA, que parece não ter influenciado na expressão da proteína nesse tumor, mas que pode estar interferindo no funcionamento normal desta, visto se tratar de uma mutação predita como danosa e localizada no domínio de ligação do gene com o mediador AMPc. Além disso, encontramos mutações inéditas e com significado incerto em regiões não codificadoras como a 5-UTR (*untranslated region*) e regiões intrônicas. Diante disso, podemos sugerir que os eventos de instabilidade genômica visualizados para o *PRKAR1A* podem ter alguma influência na proliferação celular e no desenvolvimento desses tumores odontogênicos mistos.

No estudo do complexo de Carney, para uma melhor compreensão dos mecanismos pelos quais mutações em *PRKAR1A* causam doenças, foram criados camundongos heterozigotos portadores de alelos nulos do *Prkar1a* (*Prkar1a^{+/-}*) (KIRSCHNER *et al.*, 2005). Seguindo essa mesma proposta, investigamos camundongos com a mesma genotipagem descrita, na tentativa de observar a formação de algum tumor odontogênico nos maxilares desse animais. Embora nossos resultados não apontem para alterações nos tecidos

dentais em camundongos heterozigotos para o *Prkar1a*, é possível que o sinal tumorigênico do *Prkar1a*, quando não associado com um outro gene supressor de tumor inativado, seja fraco e insuficiente para levar a formação de tumores, como demonstrado no estudo de ALMEIDA et al (2010). Uma outra possível razão para a ausência de tumores odontogênicos nos nossos animais, possa ser explicada pelos mecanismos compensatórios da regulação da PKA já descritos (AMIEUX et al., 1997). Assim, podemos pensar que uma outra subunidade regulatória possa estar compensando a ausência da R1 α .

Este trabalho sugere assim que, alterações no *PRKAR1A* fazem parte da patogênese molecular dos tumores odontogênicos mistos.

7 CONCLUSÕES:

- Os genes *PRKAR1A* e *PRKAR2A* apresentam-se expressos com padrões distintos na odontogênese humana e de camundongos.
- Os transcritos dos genes *PRKAR1A* e *PRKAR2A* estão expressos nos tumores odontogênicos mistos avaliados.
- A proteína PRKAR1A apresenta um padrão variável de expressão nos componentes epitelial e ectomesenquimal dos tumores odontogênicos mistos avaliados, mostrando perda de expressão no epitélio e ectomesênquima dos tumores benignos avaliados.
- Há perda de heterozigossidade envolvendo o locus do gene *PRKAR1A* nos tumores odontogênicos mistos avaliados, tanto no epitélio como no ectomesênquima.
- Mutações em *PRKAR1A* ocorrem nos FA e FDA investigados.
- Em camundongos *Prkar1a^{+/-}*, não houve evidência de alteração na odontogênese e formação de tumores odontogênicos na amostra estudada.

REFERÊNCIAS

1. Abraham TW. Preparation of nonradioactive probes for *in situ* hybridization. *Methods*. 2001;23:297-302.
2. Alaeddini M, Etemad-Moghadam S, Baghaili F. Comparative expression of calretinin in selected odontogenic tumours: a possible relationship to histogenesis. *Histopathology*. 2008;52(3):299-304.
3. Almeida MQ, Stratakis CA. How does cAMP/protein kinase A signaling lead to tumors in the adrenal cortex and other tissues? *Mol Cell Endocrinol*. 2011;336(1-2):162–8.
4. Amieux PS, Cummings DE, Motamed K, Brandon EP, Wailes LA, Le K, Idzerda RL, McKnight GS. Compensatory regulation of RI alpha protein levels in protein kinase A mutant mice. *J Biol Chem*. 1997;272(7):3993-8.
5. Amieux PS, Howe DG, Knickerbocker H, Lee DC, Su T, Laszlo GS, Idzerda RL, McKnight GS. Increased basal cAMP-dependent protein kinase activity inhibits the formation of mesoderm-derived structures in the developing mouse embryo. *J Biol Chem*. 2002;277(30):27294-304.
6. Amieux PS, McKnight GS. The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann NY Acad Sci*. 2002;968:75–95.
7. Azevedo MF, Stratakis CA. The transcriptome that mediates increased cyclic adenosine monophosphate signaling in PRKAR1A defects and other settings. *Endocr Pract*. 2011;17(3):2-7.

8. Barnes I, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. WHO classification of tumors. Pathology & Genetics. In head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005.
9. 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.
10. Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA. Molecular and functional analysis of PRKAR1A and its locus (17q22-24) in sporadic adrenocortical tumors: 17q losses, somatic mutations, and protein kinase A expression and activity. *Cancer Res.* 2003;63(17):5308-19.
11. Bluteau G, Luder HU, De Bari C, Mistsiadis TA. Stem cells for tooth engineering. *Eur Cell Mater.* 2008;16:1-9.
12. Bologna-Molina R, Salazar-Rodríguez S, Bedoya-Borella AM, Carreón-Burciaga RG, Tapia-Repetto G, Molina-Frechero N. A histopathological and immunohistochemical analysis of ameloblastic fibrodentinoma. *Case Rep Pathol.* 2013;2013:604560.
13. Bossis I, Stratakis CA. Minireview: PRKAR1A: normal and abnormal functions. *Endocrinol.* 2004;145(12):5452-8.
14. Boynton AL, Whitfield JF. A possible involvement of type II cAMP-dependent protein kinase in the initiation of DNA synthesis by rat liver cells. *Exp Cell Res.* 1980;126: 477–81.

15. Buchner A, Kaffe I, Vered M. Clinical and Radiological Profile of Ameloblastic Fibro-Odontoma: an Update on an Uncommon Odontogenic Tumor Based on a Critical Analysis of 114 Cases. *Head and Neck Pathol.* 2013;7(1):54–63.
16. Buchner A, Vered M. Ameloblastic fibroma: a stage in the development of a hamartomatous odontoma or a true neoplasm? Critical analysis of 162 previously reported cases plus 10 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116(5):598-606.
17. Bunz F. Principles of cancer genetics. Springer. 2008;180-1.
18. Burton KA, Johnson BD, Hausken ZE, Westenbroek RE, Idzerda RL, Scheuer T, Scott JD, Catterall WA, McKnight GS. Type II regulatory subunits are not required for the anchoring-dependent modulation of Ca²⁺ channel activity by cAMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(20):11067-72.
19. Carney JA, Gordon H, Carpenter PC, Shenoy BV, Go VL. The complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Medicine (Baltimore).* 1985;64(4):270-83.
20. Cassidy A, Jones J. Developments in *in situ* hybridisation. *Methods.* 2014 Apr 18.
21. Chen Y, Li TJ, Gao Y, Yu SF. Ameloblastic fibroma and related lesions: a clinicopathologic study with reference to their nature and interrelationship, *J Oral Pathol Med.* 2005;34(10):588–95.
22. Cho-Chung YS, Clair T. The regulatory subunit of cAMP-dependent protein kinase as a target for chemotherapy of cancer and other

- cellular dysfunctional-related diseases. *Pharmacol Ther.* 1993;60:265–88.
23. Chotteau-Lelièvre A, Dollé P, Gofflot F. Expression analysis of murine genes using *in situ* hybridization with radioactive and nonradioactively labeled RNA probes. *Methods Mol Biol.* 2006;326:61-87.
24. Cobourne MT, Sharpe PT. Tooth and jaw: molecular mechanisms of patterning in the first brachial arch. *Arch Oral Biol.* 2003;48(1):1-14.
25. Cobourne MT. The genetic control of early odontogenesis. *Br J Orthod.* 1999;26(1):21-8.
26. Crivelini MM, de Araújo VC, de Sousa SO, de Araújo NS. Cytokeratins in epithelia of odontogenic neoplasms. *Oral Dis.* 2003;9(1):1-6.
27. Cummings DE, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL, McKnight GS. Genetically lean mice result from targeted disruption of the R11b subunit of protein kinase A. *Nature.* 1996;382(6592):622–6.
28. De Riu G, Meloni SM, Contini M, Tullio A. Ameloblastic fibro-odontoma. Case report and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg.* 2010;38(2):141-4.
29. Dong X, Shen B, Ruan N, Guan Z, Zhang Y, Chen Y, Hu X. Expression patterns of genes critical for BMP signaling pathway in developing human primary tooth germs. *Histochem Cell Biol.* 2014 Jul 4. [Epub ahead of print].
30. Farias LC, Gomes CC, Brito JA, Galvão CF, Diniz MG, de Castro WH, Bernardes Vde F, De Marco LA, Gomez RS. Loss of

- heterozygosity of the PTCH gene in ameloblastoma. *Hum Pathol.* 2012;43(8):1229-33.
31. Feliciello A, Gallo A, Mele E, Porcellini A, Troncone G, Garbi C, Gottesman ME, Avvedimento EV. The localization and activity of cAMP-dependent protein kinase affect cell cycle progression in thyroid cells. *J Biol Chem.* 2000;275: 303–11.
32. Ferguson MWJ. The dentition through life. In: RJ Elderton (ed.) *The dentition and dental care, dental series 3.* Heinemann, Oxford, 1990:1-29.
33. Galvão CF, Gomes CC, Diniz MG, Vargas PA, de Paula AM, Mosqueda-Taylor A, Loyola AM, Gomez RS. Loss of heterozygosity (LOH) in tumour suppressor genes in benign and malignant mixed odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(5):389–93.
34. Gaunt WA. The development of enamel and dentine on the molars of the mouse, with an account of the enamel-free areas. *Acta Anat (Basel)* 1956;28(1–2):111–34.
35. Girardi GB, Garg V. Aggressive atypical ameloblastic fibrodentinoma: Report of a case. *Contemp Clin Dent.* 2012;3(1):97-102.
36. Gomes CC, Gomez RS. PTCH1 gene inactivation is not a keratocystic odontogenic tumour exclusive alteration. *Oral Oncol.* 2011;47(3):226-7.
37. Govorko DK, Becic T, Vukojevic K. *et al.* Spatial and temporal distribution of Ki-67 proliferation marker, Bcl-2 and Bax proteins in the developing human tooth. *Arch Oral Biol.* 2010;55(12):1007-16.

38. Horvath A, Bertherat J, Groussin L, Guillaud-Bataille M, Tsang K, Cazabat L, Libe R, Remmers E, René-Corail F, Fauz FR, Clauser E, Calender A, Bertagna X, Carney JA, Stratakis CA. Mutations and polymorphisms in the gene encoding Regulatory Subunit Type 1-alpha of Protein Kinase A (PRKAR1A): An Update. *Hum Mutat.* 2010;31(4):369–79.
39. Ignelzi MA, Liu Y, Maxson RE, Snead ML. Genetically engineered mice: tools to understand craniofacial development. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1995;6(3):181-201.
40. Kadota S, Fantus IG, Deragon G, Guyda HJ, Hersh B, Posner BI. Peroxides of vanadium: a novel and potent insulin-mimetic agent which activates the insulin receptor kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1987;147:259–66.
41. Kapadia H, Mues G, D'Souza R. Genes affecting tooth morphogenesis. *Orthod Craniofac Res.* 2007;10(4):237-44.
42. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto, atlas, correlações clínicas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2012.
43. Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet.* 2000a;26(1):89-92.
44. Kirschner LS, Kusewitt DF, Matyakhina L, Towns WH, Carney JA, Westphal H, Stratakis CA. A mouse model for the Carney complex tumor syndrome develops neoplasia in cyclic AMP-responsive tissues. *Cancer Res.* 2005;65(11):4506-14.

45. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Lip JP, Carney JA, Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutations of the PRKAR1A gene in patients with the Carney complex. *Hum Mol Genet.* 2000b;9(20):3037-46.
46. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and anti-oncogenes. *Cancer Res.* 1985;45(4):1437-43.
47. Kollar EJ, Baird GR. Tissue interactions in developing mouse tooth germs: II The inductive role of the dental papilla. *J Embryol Exp Morphol.* 1970;24(1):173-86.
48. Kotani T, Iemura S, Natsume T, Kawakami K, Yamashita M. Mys protein regulates protein kinase A activity by interacting with regulatory type I α subunit during vertebrate development. *J Biol Chem.* 2010;285(7):5106-16.
49. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. Histological typing of odontogenic tumors. WHO International Histological Classification of Tumors. 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag; 1992.
50. Kumamoto H. Molecular pathology of odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(2):65-74.
51. Kyryachenko S, Kyrylkova K, Leid M, Kioussi C. Determination of gene expression patterns by whole-mount *in situ* hybridization. *Methods Mol Biol.* 2012;887:15-22.
52. Li YC, Korol AB, Fahima T, Nevo E. Microsatellites within genes: structure, function, and evolution. *Mol Biol Evol.* 2004;21:991-1007.

53. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*. 2001;25:402-8.
54. Lesot H, Brook AH. Epithelial histogenesis during tooth development. *Arch Oral Biol* 2009;54 Suppl 1:S25-33.
55. Mafra RP, Vasconcelos RG, Vasconcelos MG, Queiroz LMG, Barboza CAG. Desenvolvimento dental: aspectos morfogenéticos e relações com as anomalias dentárias do desenvolvimento. *Rev. Brás. Odontol.* 2012;69(2):232-7.
56. Maleszewski JJ, Larsen BT, Kip NS, Castonguay MC, Edwards WD, Carney JA, Kipp BR. PRKAR1A in the Development of Cardiac Myxoma: A Study of 110 Cases Including Isolated and Syndromic Tumors. *Am J Surg Pathol*. 2014 Mar 10. [Epub ahead of print].
57. Manor E, Kan E, Bodner L. Ameloblastic fibroodontoma of the mandible with normal karyotype in a pediatric patient. *Case Rep Dent*. 2012;2012:969687.
58. Martins C, Carvalho YR, do Carmo MA. Argyrophilic nucleolar organizer regions (AgNORs) in odontogenic myxomas and ameloblastic fibroma (AF). *J Oral Pathol Med*. 2001;30(8):489-93.
59. Massey D. Potential pitfalls in diagnostic oral pathology. A review for the general surgical pathologist. *Adv Anat Pathol*. 2005;12:332–49.
60. Melo MR, Martins AR, Barbosa IV, Romano P, Shcolnik W. Coleta, transporte e armazenamento de amostras para diagnóstico molecular. *J Bras Patol Med Lab*. 2010;46(5):375-81.

61. Meoli E, Bossis I, Cazabat L, Mavrakis M, Horvath A, Stergiopoulos S, Shiferaw ML, Fumey G, Perlemoine K, Muchow M, Robinson-White A, Weinberg F, Nesterova M, Patronas Y, Groussin L, Bertherat J, Stratakis CA. Protein kinase A effects of an expressed PRKAR1A mutation associated with aggressive tumors. *Cancer Res.* 2008;68(9):3133-41.
62. Migaldi M, Sartori G, Rossi G, Cittadini A, Sgambato A. Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma. *Oral Oncol.* 2008;44:50–60.
63. Mina M, Kollar EJ. The induction of odontogenesis in non dental mesenchyme combined with early murine mandibular arch epithelium. *Arch Oral Biol.* 1987;32(2):123-7.
64. Mori M, Yamada K, Kasai T, Yamada T, Shimokawa H, Sasaki S. Immunohistochemical expression of amelogenins in odontogenic epithelial tumours and cysts. *Virchows Archiv – A Pathological Anatomy and Histopathology.* 1991;418(4):319–325.
65. Muller S, Parker DC, Kapadia SB, Budnick SD, Barnes EL. Ameloblastic fibrosarcoma of the jaws. A clinicopathologic and DNA analysis of five cases and review of the literature with discussion of its relationship to ameloblastic fibroma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(4):469–77.
66. Nanci A. *Ten Cate Histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008.
67. Nelson BL, Folk GS. Ameloblastic fibroma. *Head Neck Pathol.* 2009;3(1):51–3.

68. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral and Maxillofacial Pathology, Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 3rd edition, 2011.
69. Nie X. Developmentally regulated expression of MSX1, MSX2 and Fgfs in the developing mouse cranial base. *Angle Orthod.* 2006;76(6):990-5.
70. Nieminen P, Pekkanen M, Aberg T, Thesleff I. A graphical WWW-database on gene expression in tooth. *Eur J Oral Sci.* 1998;106 Suppl 1:7-11.
71. Ohazama A, Sharpe PT. TFII-I gene family during tooth development: candidate genes for tooth anomalies in Williams syndrome. *Dev Dyn.* 2007;236(10):2884-8.
72. Ohshima H. Overview: Developmental Biology of Hertwig's Epithelial Root Sheath (HERS) and Tooth Root Formation. *J. Oral Biosci.* 2008;50(3):147-53.
73. Pelissier A, Ouhayoun JP, Sawaf MH, Forest N. Evolution of cytokeratin expression in developing human tooth germ, *J Biol Buccale.* 1990;18(2):99-108.
74. Perdigão PF, Gomez RS, Pimenta FJGS, De Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncol.* 2004;40(8):841-6.
75. Perdigão PF, Stergiopoulos SG, De Marco LG, Matyakhina L, Boikos SA, Gomez RS, Pimenta FJGS, Stratakis CA. Molecular and immunohistochemical investigation of Protein Kinase A Regulatory Subunit Type 1A (PRKAR1A) in odontogenic myxomas. *Genes Chromosomes Cancer.* 2005;44:(2)204-11.

76. Philipsen HP, Reichart PA, Praetorius F. Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol.* 1997;33(2):86–99.
77. Philipsen HP, Reichart PA, Slootweg PJ, Slater LJ. Neoplasms and tumour-like lesions arising from the odontogenic apparatus and maxillofacial skeleton: introduction. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *Pathology and genetics of head and neck tumours*. Lyon: IARC press, 2005; 283–6.
78. Pinzani P, Orlando C, Pazzagli M. Laser-assisted microdissection for real time PCR sample preparation. *Mol Asp Med.* 2006;27:140-59.
79. Pontes HA, Pontes FS, Silva BS, Cury SE, Fonseca FP, Salim RA, *et al.* Immunoexpression of Ki67, proliferative cell nuclear antigen, and Bcl-2 proteins in a case of ameloblastic fibrosarcoma. *Ann Diagn Pathol.* 2010;14(6):447-52.
80. Popp A, Urbach A, Witte OW, Frahm C. Adult and embryonic GAD transcripts are spatiotemporally regulated during postnatal development in the rat brain. *PLoS One.* 2009;4(2):e4371
81. Porntaveetus T, Ohazama A, Choi HY, Herz J, Sharpe PT. Wnt signaling in the murine diastema. *Eur J Orthod.* 2012;34(4):518-24.
82. Porntaveetus T1, Otsuka-Tanaka Y, Basson MA, Moon AM, Sharpe PT, Ohazama A. Expression of fibroblast growth factors (Fgfs) in murine tooth development. *J Anat.* 2011;218(5):534-43.
83. Praetorius F. Odontogenic Tumors. In: Barnes L. *Surgical pathology of the head and neck*. 3rd ed. India: Informa; 2009.

84. Quon KC, Berns A. Haplo-insufficiency? Let me count the ways. *Genes Dev.* 2001;15(22):2917-21.
85. Reichart PA, Philipsen HP. *Odontogenic Tumors and Allied Lesions.* London: Quintessence; 2004.
86. Robinson-White AJ, Leitner WW, Aleem E, Kaldis P, Bossis I, Stratakis CA. PRKAR1A inactivation leads to increased proliferation and decreased apoptosis in human B lymphocytes. *Cancer Res.* 2006;66(21):10603–12.
87. Rohlf C, Clair T, Cho-Chung YS. 8-Cl-cAMP induces truncation and down-regulation of the RI alpha subunit and up-regulation of the RII beta subunit of cAMP-dependent protein kinase leading to type II holoenzyme-dependent growth inhibition and differentiation of HL-60 leukemia cells. *J Biol Chem.* 1993;268:5774–82.
88. Rothenbuhler A, Stratakis CA. Clinical and molecular genetics of Carney complex. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2010;24(3):389-99.
89. Sankireddy S, Kaushik A, Krishna BA, Reddy AL, Vinod VC, Sridevi V. Ameloblastic fibrodentinoma involving anterior maxilla: a rare case report. *J Indian Soc Pedod Prev Dent.* 2013;31(4):275-8.
90. Sano K, Yoshida S, Ninomiya H, Ikeda H, Ueno K, Sekine J, *et al.* Assessment of growth potential by MIB-1 immunohistochemistry in ameloblastic fibroma and related lesions of the jaws compared with ameloblastic fibrosarcoma. *J Oral Pathol Med.* 1998;27(2):59-63.
91. Schmittgen TD, Livak KJ. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method. *Nature Protocols.* 2008;3(6):1101-8.

92. Sciubba JJ, Fantasia JE, Kahn LB. Tumors and cysts of the jaws. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology, 2001;71–127.
93. Silva-Valenzuela MG, Almeida FCS, Matizonkas-Antonio LFM, Libório TN, Acquafreda T, Cazal C, Ferraz A, Nunes FD. Hibridização *in situ* com sonda não-radioativa para mRNA: princípios e aplicações em patologia. J Bras Pathol Med. 2006;42(3):207-13.
94. Sloomweg PJ. An analysis of the interrelationship of the mixed odontogenic tumors ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and the odontomas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1981;51(3):266-76.
95. Solberg R, Sandberg M, Natarajan V, Torjesen PA, Hansson V, Jahnsen T, Taskén K. The Human Gene for the Regulatory Subunit R1a of Cyclic Adenosine 3',5'-Monophosphate-Dependent Protein Kinase: Two Distinct Promoters Provide Differential Regulation of Alternately Spliced Messenger Ribonucleic Acids. Endocrinology. 1997;138(1):169-81.
96. Sreenath G, Indira Reddy Y, Sreenivasreddy P, Ravi Prakash A. Ameloblastic Fibro-odontome (AFO) of the Mandible: A Case Report. J Clin Diagn Res. 2014;8(1):260-2.
97. Stokes A, Drozdov I, Guerra E, Ouzounis CA, Warnakulasuriya S, Gleeson MJ, McGurk M, Tavassoli M, Odell EW. Copy number and loss of heterozygosity detected by SNP array of formalin-fixed tissues using whole-genome amplification. PLoS One 2011;6(9):e24503.
98. Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and

- recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(9):4041-6.
99. Takeda Y. Ameloblastic fibroma and related lesions: current pathologic concept. *Oral Oncol.* 1999;35(6):535-40.
100. Thesleff I, Keränen S, Jernvall J. Enamel knots as signaling centers linking tooth morphogenesis and odontoblast differentiation. *Adv Dent Res.* 2001;15:14-8.
101. Thesleff I. Epithelial-mesenchymal signalling regulating tooth morphogenesis. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 9):1647-8.
102. Tomich CE. Benign Mixed Odontogenic tumors. *Semin Diagn Pathol.* 1999;16(4):308-16.
103. Tortora G, Clair T, Cho-Chung YS. An antisense oligodeoxynucleotide targeted against the type II beta regulatory subunit mRNA of protein kinase inhibits cAMP-induced differentiation in HL-60 leukemia cells without affecting phorbol ester effects. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1990;87:705–8.
104. Tucker A, Sharpe, P. The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet.* 2004;5(7):499-508.
105. Van Houten VM, Van Den Brekel MW, Denkers F, Colnot DR, Westerga J, Van Diest PJ, Snow GB, Brakenhoff RH. Molecular diagnosis in head and neck cancer. *Recent Results Cancer Res.* 2000;157:90-106.
106. Velasco A, Pallares J, Santacana M, Yeramian A, Dolcet X, Eritja N, Puente S, Sorolla A, Llecha N, Matias-Guiu X. Loss of

- heterozygosity in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol*. 2008;27(3):305-17.
107. Walsh DA, Perkins JP, Krebs EG. An adenosine 3',5'-monophosphate-dependant protein kinase from rabbit skeletal muscle. *J Biol Chem*. 1968;243(13):3763-5.
108. Wang S, Shi H, Wang P, Yu Q. Ameloblastic fibro-odontosarcoma of the mandible: Imaging findings. *Dentomaxillofac Radiol*. 2011;40(5):324-7.
109. William W. Wilfinger, Karol Mackey, and Piotr Chomczynski. Effect of pH and Ionic Strength on the Spectrophotometric Assessment of Nucleic Acid Purity: *BioTechniques* 1997;22:474-81.
110. Yao S, Wise GE. Protein kinase A expression and its possible roles in regulating tooth eruption genes in the dental follicle. *Med Sci Monit*. 2003;9(5):BR160-7.
111. Yen AH, Sharpe PT. Stem cells and tooth tissue engineering. *Cell Tissue Res*. 2008;331(1):359-72.
112. Zawadzki KM, Taylor SS. 2004 cAMP-dependent protein kinase regulatory subunit type II beta: active site mutations define an isoform-specific network for allosteric signaling by cAMP. *J Biol Chem*. 279(8):7029–36.
113. Zeichner-David M, Diekwisch T, Fincham A, Lau E, MacDougall M, Moradian-Oldak J, *et al*. Control of ameloblast differentiation. *Int J Dev Biol*. 1995;39(1):69–92.

114. Zhang YD, Chen Z, Song YQ, Liu C, Chen YP. Making a tooth: growth factors, transcription factors, and stem cells. *Cell Res.* 2005;15(5):301-16.

ANEXO I:

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
 SBN, Quadra 02, Lote 06, Bloco L
 70.040-020 - Brasília, DF
 Brasil



RICARDO SANTIAGO GOMES
 Pró-Reitor
 UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 Av. Antonio Carlos, 6627
 Pampulha
 Belo Horizonte - MG
 31270901

Brasília, 17 de Fevereiro de 2012
 Processo: BEX 1264/12-5

Prezado(a) Senhor(a),

Informamos que a Capes atendeu sua solicitação de concessão de bolsas de estudos, no âmbito do Programa Institucional de Bolsas de Doutorado Sanduiche no Exterior, à (so) pós-graduando (a) **SILVIA FERREIRA DE SOUSA**.

Encaminhamos, em anexo, os documentos abaixo relacionados:

- carta de concessão individual;
- duas vias do Termo de Compromisso, devendo uma delas ser assinada e devolvida à Capes;
- Orientações ao bolsista, disponível no link <http://www.capes.gov.br/bolsas/bolsas-no-exterior/bolsistas-ativos/estagio-de-doutorando>, que deverão ser lidas atentamente.

Atenciosamente

MARIA DE FÁTIMA BATTAGLIN
 Coordenação Geral de Bolsas no Exterior

JUNTA DE APERFEIÇOAMENTO DE PESSOAL DE NÍVEL SUPERIOR
 NA PRPG EM 01/02/2012
 ASS: Selma

ANEXO II



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

Projeto: CAAE – 0498.0.203.000-11

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 01 de novembro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise do gene PRKAR1A em tumores odontogênicos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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



Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO III**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Av Antônio Carlos, 6627 - Pampulha – Belo Horizonte – MG, CEP: 31270-901

DEPARTAMENTO DE CLÍNICA, PATOLOGIA E CIRURGIA ODONTOLÓGICAS

DISCIPLINA DE PATOLOGIA E SEMIOLOGIA ODONTOLÓGICAS

Belo Horizonte, 21 de Setembro de 2011.

Ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

Carta de Anuência da Coordenação da Clínica de Patologia e Semiologia
Odontológicas - Faculdade de Odontologia da UFMG

Autorizo a aluna Sílvia Ferreira de Sousa, doutoranda do Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular - Faculdade de Medicina/UFMG a realizar, na clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFMG, coletas de fragmentos de tumores odontogênicos, bem como fragmento ou raspado de mucosa bucal clinicamente normal. Tal procedimento ocorrerá após cirurgia de biópsia de indivíduos acometidos pelo tumor. A coleta deverá ser realizada mediante a permissão do indivíduo e/ou responsável através da assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, onde o mesmo será informado sobre os objetivos do estudo, bem como garantida a confidencialidade das informações.

Os materiais biológicos coletados serão utilizados para fins do projeto “**Análise do gene *PRKAR1A* em tumores odontogênicos**” no qual o Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez participa como Pesquisador Responsável.

Prof. Dr^a. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo**Coordenadora da Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas****da Faculdade de Odontologia/UFMG**

APÊNDICE I.A

Termo de consentimento destinado a indivíduos maiores de 18 anos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do gene *PRKAR1A* em tumores odontogênicos”. Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores.

Caso você queira participar desta pesquisa, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que possamos estudar as alterações que ocorrem dentro das células envolvidas no desenvolvimento desses tumores. Este pequeno pedaço será removido após a cirurgia. Este procedimento não envolve nenhuma alteração na técnica cirúrgica ou interferência na escolha do tratamento da lesão e, por se tratar de um pequeno fragmento, este procedimento também não compromete o diagnóstico do tumor.

Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletada. Esta coleta poderá ser feita durante a realização dos pontos da cirurgia, quando possível, ou esta coleta será feita raspando-se uma região da boca com uma escovinha estéril. Só coletaremos durante os pontos da cirurgia se houver a existência de algum tecido que o cirurgião julgue necessário de ser removido para facilitar a cicatrização adequada da região. Este tecido removido pelo cirurgião é descartado, não sendo utilizado para o diagnóstico do tumor, mas pode servir de material para nosso estudo. Por ser um material já descartado pelo cirurgião, esta coleta não oferece nenhum risco a você, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Entretanto, na ausência da necessidade de remoção de tecido durante os pontos da cirurgia, será então realizado um raspado de uma região da boca para coleta de saliva com uma escovinha macia, estéril e descartável. Durante o movimento da raspagem, você pode sentir algum tipo de leve desconforto, decorrente do movimento. Entretanto, esse movimento não provoca nenhum tipo de dor. A coleta deste material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor.

Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino. Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade para se recusar a participar ou para retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Garantimos que todas as informações são confidenciais.

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

RICARDO SANTIAGO GOMEZ (ORIENTADOR)

SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA (PESQUISADORA)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

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

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Sílvia Ferreira de Sousa. Telefone: (31) 3409-2477
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º
Andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

APÊNDICE I.B

Termo de consentimento destinado a adolescentes (13 a 18 anos)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar da pesquisa “Análise do gene *PRKAR1A* em tumores odontogênicos”. Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores.

Caso você queira participar desta pesquisa, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que possamos estudar as alterações que ocorrem dentro das células envolvidas no desenvolvimento desses tumores. Este pequeno pedaço será removido após a cirurgia. Este procedimento não envolve nenhuma alteração na técnica cirúrgica ou interferência na escolha do tratamento da lesão e, por se tratar de um pequeno fragmento, este procedimento também não compromete o diagnóstico do tumor.

Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletada. Esta coleta poderá ser feita durante a realização dos pontos da cirurgia, quando possível, ou esta coleta será feita raspando-se uma região da boca com uma escovinha estéril. Só coletaremos durante os pontos da cirurgia se houver a existência de algum tecido que o cirurgião julgue necessário de ser removido para facilitar a cicatrização adequada da região. Este tecido removido pelo cirurgião é descartado, não sendo utilizado para o diagnóstico do tumor, mas pode servir de material para nosso estudo. Por ser um material já descartado pelo cirurgião, esta coleta não oferece nenhum risco a você, além daqueles próprios da cirurgia a que você será submetido. Entretanto, na ausência da necessidade de remoção de tecido durante os pontos da cirurgia, será então realizado um raspado de uma região da boca para coleta de saliva com uma escovinha macia, estéril e descartável. Durante o movimento da raspagem, você pode sentir algum tipo de leve desconforto, decorrente do movimento. Entretanto, esse movimento não provoca nenhum tipo de dor. A coleta deste material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor.

Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino. Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade para se recusar a participar ou para retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado. Garantimos que todas as informações são confidenciais.

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

RICARDO SANTIAGO GOMEZ (ORIENTADOR)

SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA (PESQUISADORA)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

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

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO PACIENTE

ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Sílvia Ferreira de Sousa. Telefone: (31) 3409-2477
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º
Andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

APÊNDICE I.B**Termo de consentimento destinado a responsável por adolescentes (13 a 18 anos)****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O seu filho(a) _____ está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "**Análise do gene PRKAR1A em tumores odontogênicos**". Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores.

Caso você queira participar desta pesquisa, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que possamos estudar as alterações que ocorrem dentro das células envolvidas no desenvolvimento desses tumores. Este pequeno pedaço será removido após a cirurgia e não comprometerá o diagnóstico do tumor. Este procedimento não envolve nenhuma alteração na técnica cirúrgica ou interferência na escolha do tratamento da lesão e, por se tratar de um pequeno fragmento, este procedimento também não compromete o diagnóstico do tumor.

Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletada. Esta coleta poderá ser feita durante a realização dos pontos da cirurgia, quando possível, ou esta coleta será feita raspando-se uma região da boca com uma escovinha estéril. Só coletaremos durante os pontos da cirurgia se houver a existência de algum tecido que o cirurgião julgue necessário de ser removido para facilitar a cicatrização adequada da região. Este tecido removido pelo cirurgião é descartado, não sendo utilizado para o diagnóstico do tumor, mas pode servir de material para nosso estudo. Por ser um material já descartado pelo cirurgião, esta coleta não oferece nenhum risco, além daqueles próprios da cirurgia a que seu filho(a) será submetido. Entretanto, na ausência da necessidade de remoção de tecido durante os pontos da cirurgia, será então realizado um raspado de uma região da boca para coleta de saliva com uma escovinha macia, estéril e descartável. Durante o movimento da raspagem, o seu filho(a) pode sentir algum tipo de leve desconforto, decorrente do movimento. Entretanto, esse movimento não provoca nenhum tipo de dor. A coleta deste material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

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

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

RICARDO SANTIAGO GOMEZ (ORIENTADOR)

SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA (PESQUISADORA)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

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

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Sílvia Ferreira de Sousa. Telefone: (31) 3409-2477
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

APÊNDICE I.C**Termo de consentimento destinado a menores de idade (7 a 12 anos)****UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

O seu filho(a) _____ está sendo convidado(a) a participar da pesquisa “**Análise do gene PRKAR1A em tumores odontogênicos**”. Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores.

Caso você queira participar desta pesquisa, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que possamos estudar as alterações que ocorrem dentro das células envolvidas no desenvolvimento desses tumores. Este pequeno pedaço será removido após a cirurgia e não comprometerá o diagnóstico do tumor. Este procedimento não envolve nenhuma alteração na técnica cirúrgica ou interferência na escolha do tratamento da lesão e, por se tratar de um pequeno fragmento, este procedimento também não compromete o diagnóstico do tumor.

Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletada. Esta coleta poderá ser feita durante a realização dos pontos da cirurgia, quando possível, ou esta coleta será feita raspando-se uma região da boca com uma escovinha esteril. Só coletaremos durante os pontos da cirurgia se houver a existência de algum tecido que o cirurgião julgue necessário de ser removido para facilitar a cicatrização adequada da região. Este tecido removido pelo cirurgião é descartado, não sendo utilizado para o diagnóstico do tumor, mas pode servir de material para nosso estudo. Por ser um material já descartado pelo cirurgião, esta coleta não oferece nenhum risco, além daqueles próprios da cirurgia a que seu filho(a) será submetido. Entretanto, na ausência da necessidade de remoção de tecido durante os pontos da cirurgia, será então realizado um raspado de uma região da boca para coleta de saliva com uma escovinha macia, esteril e descartável. Durante o movimento da raspagem, o seu filho(a) pode sentir algum tipo de leve desconforto, decorrente do movimento. Entretanto, esse movimento não provoca nenhum tipo de dor. A coleta deste material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

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

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

RICARDO SANTIAGO GOMEZ (ORIENTADOR) SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA (PESQUISADORA)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

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

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Sílvia Ferreira de Sousa. Telefone: (31) 3409-2477
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º
Andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.

APÊNDICE I.D

Termo de consentimento destinado a responsável por crianças com idade inferior a 6 anos

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O seu filho(a) _____ está sendo convidado(a) a participar da pesquisa "**Análise do gene PRKAR1A em tumores odontogênicos**". Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acomete indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores.

Caso você queira participar desta pesquisa, será necessária a coleta de um pequeno pedaço do tumor para que possamos estudar as alterações que ocorrem dentro das células envolvidas no desenvolvimento desses tumores. Este pequeno pedaço será removido após a cirurgia e não comprometerá o diagnóstico do tumor. Este procedimento não envolve nenhuma alteração na técnica cirúrgica ou interferência na escolha do tratamento da lesão e, por se tratar de um pequeno fragmento, este procedimento também não compromete o diagnóstico do tumor.

Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletada. Esta coleta poderá ser feita durante a realização dos pontos da cirurgia, quando possível, ou esta coleta será feita raspando-se uma região da boca com uma escovinha estéril. Só coletaremos durante os pontos da cirurgia se houver a existência de algum tecido que o cirurgião julgue necessário de ser removido para facilitar a cicatrização adequada da região. Este tecido removido pelo cirurgião é descartado, não sendo utilizado para o diagnóstico do tumor, mas pode servir de material para nosso estudo. Por ser um material já descartado pelo cirurgião, esta coleta não oferece nenhum risco, além daqueles próprios da cirurgia a que seu filho(a) será submetido. Na ausência da necessidade de remoção de tecido durante os pontos da cirurgia, será então realizado um raspado de uma região da boca para coleta de saliva com uma escovinha macia, estéril e descartável. Durante o movimento da raspagem, o seu filho(a) pode sentir algum tipo de leve desconforto, decorrente do movimento. Entretanto, esse movimento não provoca nenhum tipo de dor. A coleta deste material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor. Todos os resultados serão utilizados para pesquisa e ensino.

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

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

RICARDO SANTIAGO GOMEZ (ORIENTADOR) SÍLVIA FERREIRA DE SOUSA (PESQUISADORA)

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

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

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

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____

Nº: _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Sílvia Ferreira de Sousa. Telefone: (31) 3409-2477
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Avenida Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º
Andar, sala 2005. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901. Tel.: (31) 3409-4592.