

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia Bioquímica e Molecular

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTUDO DAS MÚLTIPLAS ISOFORMAS DO GENE
***PATCHED1* EM CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

MARINA GONÇALVES DINIZ

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós - Graduação em Ciências Biológicas:
Farmacologia Bioquímica e Molecular

MARINA GONÇALVES DINIZ

ESTUDO DAS MÚLTIPAS ISOFORMAS DO GENE
***PATCHED1* EM CERATOCISTO ODONTOGÊNICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado em Farmacologia, Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em Farmacologia, Bioquímica e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

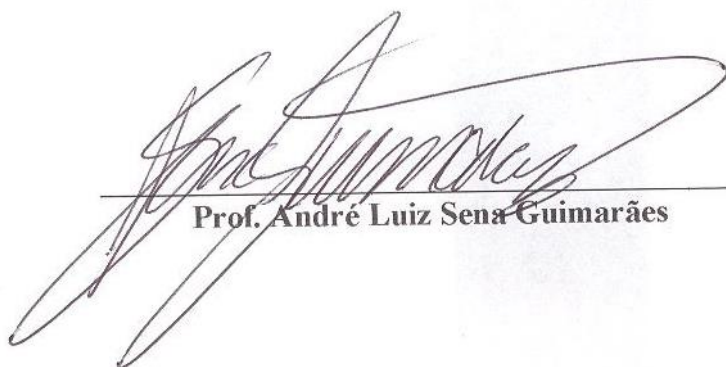
BELO HORIZONTE

2008

Dissertação defendida e aprovada, em 04 de julho de 2008, pela
Banca Examinadora constituída pelos professores:



Prof. Ricardo Santiago Gomez (Orientador)



Prof. André Luiz Sena Guimarães



Prof. Rodrigo Villamarin Soares



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-Graduação Farmacologia Bioquímica e Molecular
Instituto de Ciências Biológicas
Cep 30270-901 - Belo Horizonte - MG
Telefax: 0xx (31) 3409 2983
e-mail: colposfarbimol@icb.ufmg.br

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS para os devidos fins que, **Marina Gonçalves Diniz** concluiu o Mestrado em Ciências Biológicas: Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas desta Universidade, tendo defendido sua dissertação intitulada "**Estudo das múltiplas isoformas do gene *patched1* em ceratocisto odontogênico,**" aprovada em 04/07/08.

Belo Horizonte, 04 de julho de 2008.

SÔNIA MARA DE OLIVEIRA COSTA
Chefe da Secretaria do Colegiado de Pós-Graduação
em Farmacologia Bioquímica e Molecular

Prof. Luiz Armando De Marco
Coordenador do Programa de Pós-Graduação
Farmacologia Bioquímica e Molecular - UFMG

Aos meus pais, Maria Tereza e Otávio.

“O desconhecido só se pode manifestar quando o conhecido é compreendido,
dissolvido, abandonado.”

(Krishnamurti)

Aos meus irmãos, Gustavo, Lucas e Letícia.

AGRADECIMENTOS

Ao professor Ricardo Santiago Gomez pela orientação, e mais do que isso, pelo seu exemplo de pesquisador e de ser humano.

Ao professor André Luiz Sena Guimarães pela inestimável contribuição para a minha formação de mestre.

Aos meus familiares pelo carinho e apoio incondicionais.

Ao Fernando, pelo amor, pela companhia, pelas palavras, por tudo e à sua família pelo acolhimento.

Aos bons amigos de todos os dias e àqueles que mesmo longe se fazem presentes.

Aos colegas e amigos do laboratório de patologia molecular da faculdade de odontologia da UFMG: Cláudia, Luciano, Renata, Érica, Carla, Carlos, Anna, Lincoln, Daniele e em especial à Carolina, João, Fabrício, Paula, Jeane e Flávio, pelos bons momentos e ensinamentos diversos.

Aos professores e a todos os que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho

Aos portadores de ceratocisto odontogênico que gentilmente concordaram em participar desta pesquisa.

RESUMO

O ceratocisto odontogênico (CO) é uma neoplasia benigna que possui um comportamento biológico agressivo. O CO está associado a alterações no gene homólogo 1 ao gene *patched* de *Drosophila* (*PTCH1*). Este gene possui diversas isoformas geradas pelo uso alternativo do primeiro exon (1b, 1d e 1e). As isoformas podem possuir diferenças na sua expressão, na capacidade de agir como receptor da proteína sinalizadora Hedgehog (Hh) e na inibição da própria via. Levando em consideração que a via Hh pode estar envolvida na patogênese do CO, o objetivo deste estudo foi avaliar a presença dos diferentes RNAm do gene *PTCH1* nesta lesão. Foram incluídos no estudo 40 CO, sendo 12 esporádicos e 28 associados à Síndrome do Carcinoma Basocelular nevóide (SCBN). Destas lesões, 17 eram primárias, 17 eram marsupializadas e 6 eram recorrentes. O estudo da expressão dos exons 1 alternativos do gene *PTCH1* foi realizado através da técnica da Transcriptase Reversa – PCR (RT – PCR). Os resultados demonstram que 90% dos CO, esporádicos e associados à SCBN, expressam o transcrito 1b enquanto nenhum folículo dentário (controle) apresenta a expressão desta isoforma. O RNAm do 1d é expresso na maioria dos CO e em todos os controles. Foi detectada a expressão do transcrito 1b em todas as lesões primárias, porém isso não ocorreu em 4 (24%) lesões marsupializadas. O perfil de expressão dos transcritos na mucosa adjacente à lesão é semelhante ao do CO. Concluímos que a via Hh está superativada no CO e na mucosa adjacente e que a marsupialização pode alterar a expressão das isoformas.

LISTA DE ABREVIATURAS

CO – Ceratocisto odontogênico

cDNA – DNA complementar

G1 – Gap 1

G2 – Gap 2

GAPDH – Gliceraldeido - 3 - fosfato desidrogenase

Hh – Hedgehog

M – Mitose

pb – Pares de base

PTCH1 – Gene *patched* homologo 1 (*Homo sapiens*)

PCR – Reação em cadeia da polimerase

RNA_m – RNA mensageiro

RT -PCR – Transcriptase Reversa - PCR

S – Síntese

SCBN – Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1 Ceratocisto odontogênico	12
1.2 Via Hedgehog	14
1.3 Isoformas do gene <i>PTCH1</i>	18
1.4 Objetivos	21
2. ARTIGO – Isoformas do <i>PTCH1</i> em ceratocisto odontogênico	23
3. CONSIDERAÇÕES FINAIS	41
4. CONCLUSÕES	45
5. REFERÊNCIAS	47
6. APÊNDICES	54
Apêndice A – RT - PCR dos exons 1 alternativos e gráfico da região do gene <i>PTCH1</i>	54
Apêndice B – Exon 1b em CO e mucosa adjacente	55
Apêndice C – Dados clínicos	56
Apêndice D – Termo de consentimento Livre e Esclarecido	57
7. ANEXOS	59
Anexo A – Sinalização Hedgehog	59
Anexo B – Aprovação pelo COEP (comitê de ética em pesquisa)	60

1.INTRODUÇÃO

1.Introdução

1.1 Ceratocisto Odontogênico

O ceratocisto odontogênico (CO) foi reclassificado de cisto para neoplasia odontogênica benigna de origem epitelial pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (2005). Esta mudança ocorreu após a publicação de vários trabalhos demonstrando que as características do CO são mais compatíveis com as de uma neoplasia benigna do que de um cisto odontogênico (AGARAM et al., 2004; SHEAR, 2002).

Em geral, acredita-se que tipos diferentes de cistos odontogênicos originam-se de restos epiteliais do tecido odontogênico formados em diferentes estágios do desenvolvimento dental. Há uma concordância de que o CO se origina da lâmina dental ou de seus remanescentes, mas atualmente há poucas provas que comprovam isso. A lamina dental é um epitélio embrionário que conecta o botão dental à cavidade oral e é formada no início da odontogênese, quando o ectoderma invagina-se no mesênquima subjacente para formar o botão dos dentes decíduos. Posteriormente, as extensões linguais e distais da lâmina originam os germes dentários dos dentes permanentes. No estágio de sino do desenvolvimento dentário, a lâmina desintegra, mas grupos de células epiteliais ainda permanecem nos pertúitos ósseos (EDUARDO KATCHBURIAN & VICTOR ARANA, 1999).

Ao estudar embriões humanos, microcistos foram encontrados se formando a partir de remanescentes epiteliais da lamina dental (STOELINGA, 2003). Apesar dos microcistos não possuírem características compatíveis com CO, este achado é um indício da capacidade de proliferação atípica da lâmina dental.

O CO é uma lesão intra-óssea que tende a crescer no sentido antero-posterior nos espaços medulares. Há uma leve predileção pelo sexo masculino e ocorrem na em 60 a 80% dos casos. As lesões podem ser únicas ou

múltiplas, multi ou uniloculadas, pequenas ou extensas (NEVILLE et al., 2004). Histologicamente o CO é caracterizado por epitélio estratificado pavimentoso queratinizado de espessura uniforme delimitado por uma cápsula fibrosa fina. A camada basal está disposta em paliçada e é composta por células colunares ou cuboidais. Cistos satélites são achados comuns na cápsula do CO (HODGKINSON et al., 1978; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU & NICOLATAU, 1990).

Um procedimento usual no tratamento do CO é a marsupialização. Este procedimento descrito há bastante tempo consiste basicamente na comunicação e união da lesão com o meio bucal e em alguns casos leva a regressão do cisto (NAKAMURA, 2002; POGREL, 2005; POGREL & JORDAN, 2004). Após a marsupialização alguns CO podem apresentar aspecto microscópico semelhante ao epitélio bucal (NAKAMURA, 2002) além de alterações no seu componente epitelial (AGARAM, 2004; SHEAR, 2002). Entretanto há controvérsia sobre a taxa de recorrência a longo prazo (POGREL, 2007).

Embora os mecanismos relacionados à patogênese do CO não tenham sido completamente elucidados, estudos apontam para a desregulação da via Hedgehog (Hh) causada por mutação no gene homólogo 1 ao gene *patched* de *Drosophila* (*PTCH1*), um regulador negativo da via.

A conexão entre mutações no gene *PTCH1* e o câncer foi feita depois da observação de que mutação germinativa neste gene levava à Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBN) (HAHN et al., 1996b; JOHNSON et al., 1996). Essa descoberta motivou diversos pesquisadores a investigarem o papel dos genes da via Hh em diversos tumores. A SCBN é uma condição autossômica dominante rara caracterizada por múltiplas anomalias em tecidos e órgãos e predisposição ao desenvolvimento de CO e carcinomas basocelulares (GORLIN, 1995; HAHN et al., 1996b; JOHNSON et al., 1996).

Mutação no gene *PTCH1* em CO associados à SCBN foi descoberta originalmente por Lench et al. (LENCH et al., 1997) e subseqüentemente uma mutação somática em CO esporádico foi descrita pelo nosso grupo (BARRETO et al., 2000). Mutações neste mesmo gene já haviam sido encontradas em pelo menos 30% dos carcinomas basocelulares esporádicos (GAILANI et al., 1996) e quando

foram analisados os níveis do RNAm do receptor Hh e de outros genes alvo Hh neste tumor, os resultados indicaram hiperatividade da sinalização Hh (GAILANI et al., 1996; UNDÉN et al., 1997; DAHMANE 1997).

1.2 Via Hedgehog

Os componentes da via Hh foram descobertos originalmente por Nüsslein-Volhard e Wieschaus (1980) quando realizavam “screen” genético em populações mutadas de larvas de *Drosophila*. Mais tarde genes homólogos foram encontrados ao longo dos filos e, apesar das diferenças cruciais, a maquinaria celular de recebimento, transdução e interpretação da sinalização Hh é largamente conservada durante a evolução divergente dos insetos e mamíferos.

O gene que dá nome à via, *Hedgehog (Hh)*, codifica uma proteína ligante sinalizadora e possui três homólogos em humanos, *Sonic hedgehog (SHH)*, *Indian hedgehog (IHH)* e *Desert hedgehog (DHH)* (ECHELARD et al., 1993). O gene *patched* de *Drosophila (ptc)* codifica uma proteína transmembranar receptora de Hh (STONE et al., 1996); em humanos foram encontrados dois homólogos: *PTCH1* e *PTCH2*. O *PTCH1* é mais similar ao *Ptc* enquanto a expressão do *PTCH2* é mais restrita e poucos fenótipos são associados à sua perda (RAHNAMA et al., 2004). O *cubitus interruptus (ci)* codifica uma proteína “zinc finger” que atua como fator de transcrição da via (ALEXANDRE et al., 1996). A função deste gene ancestral invertebrado foi dividida entre três proteínas nos vertebrados: Gli1, Gli2 e Gli3 (BAI et al., 2004; PLATT et al., 1997). Gli2 ativa os genes alvos, incluindo Gli1 que é um fator de transcrição secundário. Gli3 é um tipo de repressor da transcrição (RUIZ I ALTABA et al., 1997)

A cascata de sinalização inicia-se com a ligação da proteína secretada Hh no seu receptor transmembranar PTCH1 da célula alvo (MARIGO et al., 1996; STONE et al., 1996). Antes de ser secretado, o peptídeo Hh é modificado em sua calda N- e C-terminal pela adição de palmitoil e colesterol (MANN et al., 2004). A secreção de Hh necessita da proteína transmembranar do tipo transportadora Dispatched (Disp)

(BURKE et al., 1999). Devido à sua dupla modificação lipídica e conseqüentemente afinidade de associação com membranas, a proteína secretada Hh age diretamente em células distantes no tecido.

Na ausência do ligante Hh, PTCH1 age cataliticamente na inibição de Smoothened (Smo), um receptor acoplado a proteína G (TAIPALE et al., 2002). No citoplasma, proteínas quinases como PKA, GSK3 β e CK1 α levam a clivagem de Gli mediada por proteossomo em uma forma N-terminal truncada. Essa forma clivada age como repressor da expressão dos genes alvos (RUIZ I ALTABA et al., 1997). Supressor de Fused (Sufu) também age como um regulador negativo da via se ligando ao Gli nuclear e citoplasmático, inibindo a ativação dos genes Hh alvos (DING et al., 1999).

Na presença do ligante Hh, a repressão de Smo, que é o responsável por intermediar a sinalização Hh dentro da célula, é inibida (HUANGFU & ANDERSON, 2006; JIA & JIANG, 2006). A presença do ligante permite a acumulação de Smo que inibe a clivagem proteolítica de ci em *drosophila*; este processo envolve a interação direta com Costal-2 e seqüestro do complexo contendo a proteína ci, impedindo a proteólise do fator de transcrição (COLLINS & COHEN, 2005).

Em vertebrados, a ativação do Smo culmina na acumulação de Gli ativado no núcleo e transcrição de genes alvos (VON OHLEN et al., 1997). A seqüência de eventos moleculares que conecta Smo ao Gli ainda é pobremente compreendida. A quantidade de Hh disponível para se ligar ao PTCH1 é firmemente regulada pela proteína de interação com Hh 1 (Hhip1). Hhip1 seqüestra o ligante Hh, mas ao contrário do PTCH1, não possui efeito na atividade da proteína Smo (JEONG & MCMAHON, 2005).

Os alvos da sinalização Hh incluem genes importantes para a proliferação celular – protooncogenes – assim como fatores de transcrição e o próprio *PTCH1*. A transcrição do *PTCH1* e Hhip1 promovem “feedback” negativo dentro da via (INGHAM et al., 1991). O aumento dos níveis de PTCH1 evita a transcrição de *Gli1* e *PTCH1*, dois genes que tem sua expressão normalmente induzida por Shh (GOODRICH et al., 1999). O gene *PTCH1* é sempre ativado pela sinalização Hh,

assim, a sua transcrição é uma indicação real da resposta celular ao sinal Hh (ANEXO A).

A via Hh possui participação essencial na embriogênese, determinando a diferenciação celular e/ou a morfogênese de diversos órgãos e tecidos, incluindo o epitélio dental (CHIANG et al., 1996; HARDCASTLE et al., 1998; CHIANG et al., 1999; HEBROK et al., 2000). Componentes da via Hh coordenam a invaginação do epitélio oral no tecido embrionário subjacente durante a fase inicial de formação dos dentes (HARDCASTLE et al., 1998).

Outra evidência da importância dessa via na formação e desenvolvimento dos dentes foi feita através de experimento com alelos condicionais que tornou possível a remoção da atividade de expressão do Hh apenas no germe dentário de camundongos. Esse experimento demonstrou que a ausência deste sinalizador no tecido odontogênico provoca severo retardamento do crescimento do dente, levando à disposição anômala destes na mandíbula e interrupção da morfogênese (DASSULE et al., 2000).

A sinalização Hh assume também um papel homeostático pós-embrionário na manutenção e proliferação de células troncos do tecido adulto (TAIPALE & BEACHY, 2001; MACHOLD et al., 2003). As células multipotentes do cabelo, que possuem semelhanças desenvolvimentais com o dente, expressam genes Hh durante a fase de proliferação (ORO & HIGGINS, 2003). A perda da sinalização Hh evita a proliferação ao passo que o aumento do sinal resulta na formação do carcinoma basocelular (PASCA DI MAGLIANO & HEBROK, 2003).

A sinalização Hh também parece controlar a morte celular. Evidências de que a apoptose envolvida na formação dos dígitos das extremidades de camundongos *Shh*^{-/-} é perdida em animais *Shh*^{-/-};*Gli3*^{-/-}, indicam que o fragmento repressor *Gli3* pode agir como indutor da apoptose (WANG et al., 2007). Outro experimento com células 293T demonstrou que a superexpressão da proteína *PTCH* induz a morte apoptótica na ausência do ligante *Shh* (THIBERT et al., 2003)

A sinalização Hh funciona de uma maneira dose-dependente (INGHAM & MCMAHON, 2001). Sendo assim, níveis específicos são cruciais para o

desenvolvimento e funcionamento adequado de diferentes tecidos; o aumento ou diminuição da atividade da via resulta em defeitos severos. A superatividade da via, seja ela causada pela mutação de algum componente Hh ou via superexpressão do ligante é uma marca molecular de diversos grupos de tumores, incluindo carcinoma basocelular, meduloblastoma, câncer de pâncreas, de pulmão e de próstata (DAHMANE et al., 1997; RAFFEL et al., 1997; THAYER et al., 2003; WATKINS et al., 2003; SANCHEZ et al., 2004).

Embora a desregulação da via Hh tenha sido associada a diversos tipos de tumores, o mecanismo molecular e celular por trás disso ainda é pouco compreendido. Várias pesquisas desta década vêm apontando uma relação direta da via Hh com a transcrição de genes relacionados com a proliferação celular e a apoptose.

Alguns estudos demonstraram participação efetiva da via Hh nos dois momentos específicos do ciclo celular denominados “checkpoints”. Os “checkpoints” acontecem na transição G1-S e na transição G2-M do ciclo. Estes pontos permitem à célula certificar-se da sua integridade e se as condições do microambiente encontram-se favoráveis à sua sobrevivência.

Barnes et al., (2001) demonstraram que PTCH1 endógeno e ciclina B1 endógena interagem *in vivo* no citoplasma da célula sugerindo que PTCH pode ter um papel na regulação da localização do fator promotor da fase M (MPF). Este fator é constituído de ciclina B1 e cdc2 e é importante no “checkpoint” G2-M. A entrada de MPF no núcleo é um evento que precede a mitose celular.

Em cerebelo de mamíferos foi observado que Shh regula níveis de transcrição do RNAm de ciclinas do tipo D e ciclinas E (KENNEY & ROWITCH, 2000). Mais tarde Duman-Scheel et al. (2004) demonstraram, em *Drosophila*, que a superexpressão do fator de transcrição ci causa o aumento da regulação de ciclina D. Este estudo também revelou que a sinalização Hh induz a expressão de ciclina E através da ligação do fator de transcrição ao promotor da ciclina E.

A ciclina D e ciclina E têm um papel importante no “Checkpoint” G1-S. A ciclina D se liga a CDK-4 ou CDK-6 no início da fase G1 do ciclo celular para

fosforilar e inativar a atividade inibitória da proteína do retinoblastoma (pRB). A inativação de pRB libera os fatores de transcrição E2F que promove a transcrição de genes alvos como o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e a ciclina E (HUNTER & PINES, 1994; OHTANI et al., 1995). A ciclina E se liga a CDK-2 também na fase G1 do ciclo celular e este complexo constitui um regulador específico desta fase (DULIĆ et al., 1992).

Bigelow et al., (2004) demonstraram um link entre a via e a transcrição do gene *bcl-2* em queratinócitos que elucidam um mecanismo molecular da via Hh na apoptose. O gene *bcl-2* possui um sítio funcional de ligação Gli e este fator de transcrição é capaz de regular positivamente a expressão de *bcl-2* endógeno de maneira dose-dependente na epiderme de camundongos transgênicos (BIGELOW et al. 2004). Bcl-2 é uma proteína antiapoptótica frequentemente encontrada em altos níveis em carcinoma basocelular (RODRIGUEZ-VILLANUEVA et al., 1995; DELEHEDDE et al., 1999).

1.3 Isoformas do *PTCH1*

Mecanismos que possibilitam a expressão de múltiplos RNAs por um único gene são de grande importância para a geração de diferentes proteínas funcionais e para a regulação gênica (AYOUBI & VAN DE VEN, 1996). Um dos mecanismos é chamado recomposição ou “splicing”. Este mecanismo consiste na modificação do RNA depois da transcrição e é poderoso para o controle da expressão gênica e possibilita a diversificação funcional das proteínas (LOPEZ, 1998). “Splicings”, porém, ocorrem 74% das vezes em regiões não transcritas dos genes (JOHNSON et al., 2003). Outro mecanismo é o uso de diferentes promotores que influenciam quantitativamente e qualitativamente a expressão gênica em diferentes células.

Promotor é uma estrutura modulatória do DNA que contém elementos necessários para iniciação eficiente da transcrição e para controlar a expressão do gene (AYOUBI & VAN DE VEN, 1996). Múltiplos promotores são responsáveis pela transcrição alternativa do primeiro exon, como acontece nos genes *DICER* e

NPY -Y1 (IRVIN-WILSON & CHAUDHURI, 2005; BALL et al., 2005). O gene humano DICER codifica uma enzima que participa do processo de silenciamento de genes ao nível do transcrito, chamado de RNA de interferência ou RNAi. O uso dos diferentes promotores geram RNA de tamanhos diferentes e diferentes seqüências na região 5' e o promotor utilizado é diferente em células do câncer de mama e em células não mamárias (IRVIN-WILSON & CHAUDHURI, 2005). O gene NPY-Y1 codifica o receptor do neuropeptídeo Y, importante na regulação de diversas funções biológicas. Diferentes RNAm de diferentes tamanhos são transcritos sob o controle de pelo menos três promotores diferentes ativados de maneira específica dependendo do tecido (BALL et al., 2005)

Hanh et al. (1996a; 1996b) noticiaram inicialmente a presença de pelo menos dois exons 1 na região 5' do gene *PTCH1* e nomearam o original como 1 e o adicional como 1A. Estes dois exons são diferentes ainda do primeiro exon noticiado por Johson et al. (1996), que foi nomeado 1B. A técnica 5' RACE, ou "Rapid Amplification of cDNA Ends", e o posterior sequenciamento de clones possibilitou a descoberta ainda de outros exons 1 alternativos na região 5' e o estudo das isoformas do gene *PTCH1* originadas pelo uso destes diferentes primeiros exons (KOGERMAN et al., 2002; SHIMOKAWA et al., 2004; NAGAO et al., 2005; SHIMOKAWA et al., 2007). Nós adotamos a nomenclatura das formas alternativas do primeiro exon proposta por Nagao et al. (2005) com base na ordem 5' - 3' dos exons no gene, assim, os anteriores 1B, 1 e 1A correspondem ao exon 1b, 1d e 1e.

A técnica 5' RACE consiste na produção de uma cópia de cDNA da região do RNA usando a transcrição reversa – PCR. Neste processo, a porção 5' não conhecida do transcrito é copiada utilizando uma seqüência conhecida do centro do transcrito. Seguidamente à síntese de cDNA, a enzima TdT (terminal desoxinucleotídeo transferase) é usada para adicionar uma calda homopolimérica à região 3' do cDNA, ou seja, uma calda de nucleotídeos idênticos. Uma reação de PCR convencional é então realizada utilizando primers *anti-sense* específicos para a região conhecida e primer *sense* que se liga à calda homopolimérica adicionada à extremidade 3' do cDNA para a amplificar o produto cDNA na sua região 5' não conhecida.

As isoformas do *PTCH1* mais prevalentes são *PTCHb*, *PTCHd* e *PTChE*, geradas pelo uso dos primeiros exons 1b, 1d e 1e respectivamente. Estas variantes são governadas pela presença de promotores alternativos e estes promotores mostraram diferentes padrões de atividade em diferentes tipos de células. Estes dados sugerem que as transcrições das variantes *PTCH1* são reguladas diferentemente nos diversos tecidos (AGREN et al., 2004).

As variantes *PTCHd* e *PTChE* são ubiquamente expressas entre os tecidos (KOGERMAN et al., 2002; SHIMOKAWA et al., 2004; NAGAO et al., 2005), sendo que o exon 1d é encontrado em maior quantidade (NAGAO et al., 2005). O transcrito 1b é prevalente durante o desenvolvimento embrionário (NAGAO ET AL., 2005; SHIMOKAWA et al., 2007) e codifica uma proteína integral capaz de bloquear completamente a atividade do fator de transcrição Gli1 (SHIMOKAWA et al., 2007). O nível de expressão de *PTChE* é o menor entre os tecidos e, juntamente com *PTCHd*, pode ser importante para a homeostase do tecido ou como supressor de tumor (NAGAO et al., 2005). Todas as isoformas são capazes de inibir a atividade de Smo (KOGERMAN et al., 2002; SHIMOKAWA et al., 2004).

A detecção dos vários exons 1 por Transcriptase Reversa – PCR (RT – PCR) em amostras de cDNA total de carcinoma basocelular e de tecido normal, mostrou níveis similares dos transcritos 1d e 1e em todas as amostras e níveis exclusivamente aumentados de 1b em carcinoma basocelular, muitas vezes refletindo a superatividade da via neste tipo de tumor (KOGERMAM et al., 2002). Este achado, juntamente com a revelação de estudos *in vitro* de que a atividade transcricional do gene *PTCH1* mediada pela via Hh é dependente de um único sitio de ligação GLI na região upstream do *PTCHb*, sugerem que apenas *PTCHb* é autoregulado pela sinalização Hh.

1.4 Objetivos

O objetivo geral deste trabalho foi investigar a expressão das formas alternativas do primeiro exon do *PTCH1* em CO.

Os objetivos específicos foram:

- Identificar a expressão dos múltiplos transcritos em CO esporádicos e associados à SCBN.
- Comparar a expressão do *PTCHb* em CO e em folículo dental.
- Identificar a expressão dos exons 1 alternativos do *PTCH1* na mucosa adjacente ao CO e na mucosa de pacientes saudáveis.
- Avaliar o impacto da marsupialização na expressão dos transcritos

2.ARTIGO – ISOFORMAS DO GENE

***PACHED1* EM CERATOCISTO**

ODONTOGÊNICO

PTCH1 isoforms in odontogenic keratocysts

Marina Gonçalves Diniz ^a

Érica Rievers Borges ^a

André Luiz Sena Guimarães ^b

Paula Rocha Moreira ^a

João Artur Ricieri Brito, DDS ^a

Marcus Vinícius Gomez, VM ^c

Luiz De Marco ^d

Ricardo Santiago Gómez ^a

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

^b Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, Brazil

^c Department of Pharmacology, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

^d Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding author:

Dr. Ricardo Santiago Gomez

Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antonio Carlos, 6627

Belo Horizonte-MG

Brasil CEP 31270 901

Tel: +55 31 34992477 Fax: +55 31 34992430

rsgomez@ufmg.br

Abstract

Odontogenic keratocyst (OKC) is an aggressive benign odontogenic neoplasm associated with *PTCH1* alteration. *PTCH1* has several isoforms generated by use of different first exon (1b, 1d and 1e). These isoforms code for proteins with different functions, expression profiles and transcriptional regulation. The aim of the present study was to investigate the expression of *PTCH1* first exons in OKC tumors to shed light on scenery whereby *PTCH1* coordinates OKC tumorigenesis. Forty OKC, including 12 sporadic and 28 associated with BCNS, were included in the study. The variants 1b, 1d and 1e were investigated by RT-PCR. The exon 1b was detected in 90% of OKC and none of the dental follicle (control). Most of the OKC, sporadic and syndromic, and all of the samples of dental follicles demonstrated the expression of 1d mRNA. All primary OKC had 1b mRNA while 4 (24%) lesions marsupialized lost 1b expression. In addition, the pattern of exon 1 expression observed in oral mucosa adjacent to the OKC was similar to the OKC tumor. In conclusion, this report showed overactivity of Hedgehog (HH) pathway in OKC lesion and at adjacent oral mucosa. We also demonstrated that marsupialization could alter *PTCH1* variants profiling in some OKC cases.

Keywords: Odontogenic keratocyst, *PTCH* tumor suppressor gene, alternative first exons, Hedgehog pathway.

Introduction

The Hedgehog (HH) signaling is pivotal to patterning, morphogenesis and growth in numerous tissues, including teeth ^{1,2,3}. The human homologue of the *Drosophila Patched* gene (*PTCH1*) codifies a 12-pass-transmembrane receptor for Sonic Hedgehog (SHH) and other Hedgehog proteins and normally represses the functions of the signaling effector Smoothened (SMO), a member of the seven-transmembrane receptor superfamily. Binding of HH on the *PTCH1*-SMO complex releases SMO and signaling is transduced, leading to activation of target genes by the GLI family of transcription factors. The target genes include *PTCH1* itself, and this creates a negative feedback loop that restores the balance between HH and *PTCH1* activities ⁴.

The discovery that germline mutations of *PTCH1* are the underlying cause of Gorlin's syndrome, also known as Nevoid Basal Cell Carcinoma Syndrome (NBCCS) ^{5,6}, prompted several authors to investigate the role of the HH pathway in the pathogenesis of a number of tumors associated with this syndrome. NBCCS is a rare autosomal-dominant condition characterized by multiple basal cell carcinomas (BCC), medulloblastoma, skeletal anomalies such as fused, bifid and splayed ribs and odontogenic keratocyst (OKC) of the jaws ⁷. Odontogenic Keratocyst is a benign neoplasm with an aggressive biological behavior thought to arise from the primitive odontogenic epithelium, essentially the dental lamina ⁸. Mutations of *PTCH1* in OKC associated with Gorlin's syndrome were first described by Lench et al. (1997) ⁹. Subsequently, our group reported one somatic *PTCH1* gene mutation in the epithelial

lining of human OKC ¹⁰. However, as no *PTCH1* mutations were found in two other sporadic OKCs, the mechanisms that lead to OKC formation are still obscure.

Alternative expression of mRNAs generated by a single gene is an important mechanism to make different proteins and to regulate genes in a time-dependent manner ¹¹. In addition, gene variants at 5' end have been shown to be important in tumor formation ¹². To date, different groups have reported the presence of several *PTCH1* isoforms generate by splice variants of the first exon. These isoforms have different expression profiles, function and transcriptional regulation ^{13,14,15,16,17}. The most prevalent isoforms are *PTCHb*, *PTCHd* and *PTChE*, generated by first exon 1b, 1d and 1e, respectively. The variant *PTCHd* was predominantly expressed among adult tissues ^{13,14,16}. *PTCHb*, a transcript prevalent during mouse embryonic development ^{16,17}, encodes a full-length PTCH protein that completely blocks the transcription factor GLI1 activity ¹⁷. *PTChE* was present at in low levels among human tissues and, together with *PTCHd*, may be important for tissue homeostasis or tumor suppression ¹⁶. All isoforms can inhibit HH protein activity; however, only 1b has an additional capacity to completely inhibit SMO activity ^{13,14}. Furthermore, transcripts 1b were found to be exclusively upregulated in nodular BCC ¹³.

Therefore, taking into account the *PTCH1* involvement in OKC tumorigenesis and the importance of the alternative splicing of the first exon to generate different functional PTCH isoforms, the aim of this study was to investigate the expression of these variants in sporadic and syndromic OKC tumors.

Material and Methods

Human Tissue

Forty fresh samples of OKC tumors, 12 sporadic and 28 NBCCS-associated, were included in this study. The age of the patients with sporadic lesions ranged from 15 to 62 years, with a male to female ratio 1:3. The number of lesions on the five patients (two male and three female) affected by NBSCCS varied from two to eight. Among all 40 OKC lesions included in this report analysis, 17 were primary lesions, 17 were obtained by enucleation of marsupialized cysts and six were recurrent cases. All samples were collected at the time of surgery, a section of the lesion was immediately snap frozen and stored at -80°C and the other part was subjected to histopathological diagnostic procedures. Twelve fragments of oral mucosa adjacent to the cystic lesion were also obtained during incisional biopsy or enucleation. As these fragments were too small they were not subjected to histopathological analysis. In addition, five dental follicles (control) and five samples of normal oral mucosa were obtained from healthy volunteers during non-neoplastic or preprosthetic surgical procedures. The present study was approved by the local Ethics Committee and a signed informed consent was obtained from all patients as well as healthy volunteers.

Reverse transcription–PCR analysis

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA), according to the manufacturer's protocol. The RNA was prepared from 25 mg of human frozen samples and treated with DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA). For reverse transcription, Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) was used and the single strand cDNA was employed for PCR. The PCR was performed with primers 3' and 5' from exons 1b, 1d e 1e previously described (NAGAO et al., 2005). Each reaction consisted of 2.5 μ l 10X PCR buffer, 5 μ l dNTP-mix (1mM of each), 1 μ l Magnesium Chloride (50mM), 0.5 μ l of each primer (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) (20pmol), 0.3 μ l Platinum *Taq* DNA polymerase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA) (5U/ μ l) and 500 ng cDNA in a total volume of 25 μ l. The tubes were transferred to a thermocycler (Eppendorf AG, Germany) and the steps for amplification were initial denaturation at 94° for 5 min followed by 35 cycles of 94°C for 15 sec, 58°C for 30 sec for exon 1b or 55° for 30 sec for exons 1d and 1e and 72°C for 45 sec, followed by a final extension at 72°C for 5 min. The products were visualized in silver stained 6.5% polyacrilamyde gel.

Results

PTCHb is upregulated in odontogenic keratocyst

In this report, we focused on the isoforms *PTCHb*, *PTCHd* and *PTChE* generated by the use of different first exon named 1b, 1d and 1e¹⁶. The splicing variants of the first exon were amplified using specific primers in a cDNA panel. An illustrative figure of exon 1 expression and the percentage of positive cases for each exon in sporadic and syndromic-associated OKC tumors and dental follicles are shown in the Figures 1 and 2. Exon 1b was not present in any of the dental follicle samples (Fig. 1A) but was identified in 36 (90%) out of 40 OKC lesions (Fig. 1B and 2). Most of the OKC cases, sporadic and syndromic, and all samples of dental follicles showed expression of exon 1d mRNA (Fig. 2). We found that the expression of exon 1e transcript in both groups of OKCs (35%) was similar to dental follicles (40%) (Fig. 2).

PTCHb is more evident in primary OKC then OKC treated by marsupialization lesions

We evaluated whether marsupialization alters the PTCH mRNA expression profile. To answer this question, we compared the RT-PCR results in 17 OKC treated

by marsupialization, 17 primary and six recurrent cases. Surprisingly, while all primary OKC had exon 1b mRNA, four out of 17 (23.5%) marsupialized lesions had no exon 1b mRNA (Fig. 3). In addition, exon 1d was the most prevalent isoform in OKC submitted to marsupialization. The exon 1b and 1d were detected in all recurrent OKC cases (Fig 3).

Hedgehog Pathway is overactive in OKC overlying mucosa

The expression pattern of exon 1 was also studied in the oral mucosa adjacent to OKC tumor. Interestingly, 10 out of 12 (83%) samples of oral mucosa adjacent to OKC lesions revealed a band corresponding to exon 1b and none of the samples of oral mucosa from healthy individuals expressed this transcript (Fig. 1C and 1D). Therefore, the pattern of exon 1 expression observed in oral mucosa adjacent to the OKC was distinct from normal oral mucosa and was comparable to the OKC lesion.

Discussion

Deregulating HH signaling is a molecular hallmark of several subsets of tumors. The discovery of the tumor suppressor gene *Patched 1* (*PTCH1*) mutation in sporadic and familial OKC provided the starting point at understanding the molecular pathogenesis of this tumor. The *PTCH1* gene has different 5' end followed by 22 commons exons that are translated into alternative mRNAs. These isoforms have been named in a different way by different authors and in our report, we adopted the nomenclature proposed by Nagao et al. (2005) ¹⁶. Thus, we have investigated the expression pattern of different *PTCH1* isoforms in forty OKC cases to determine the role of *PTCH1* gene in OKC tumorigenesis.

Firstly, we examined the expression pattern of the *PTCH* variants and we observed that the transcript 1b is increased in the epithelium of the sporadic and syndromic OKCs compared to controls (Fig. 1 and 2). The protein encoded by *PTCHb* is the only one that can completely inhibit SMO activity and its mRNA is increased in embryonic tissues and basal cell carcinomas ^{13,16,17}. Taken together, our data indicates that HH pathway is overactive in OKC and supports the notion that expression of this isoform is an attempt to restore the balance of the pathway ^{13,17}.

A subset of familiar and sporadic OKC and BCC harbors *PTCH1* mutations leading to constitutive activation of the embryonic HH signaling ^{10,18}. Experiments with transgenic mice that conditionally express the HH effector Gli2 showed that sustained HH signaling is required for growth of BCC ¹⁹ and that epithelium-specific HH signaling could reprogram residual odontogenic cells to proliferate, stratify, and

differentiate ²⁰. It is also known that HH signaling regulates the proliferation of distinct cell types via direct activation of genes that are involved in the progression of the cell cycle ²¹. Therefore, it is plausible that the increased proliferative activity observed in OKC compared to other odontogenic cysts ²² is associated with the uncontrolled HH activity pathway.

The usual clinical management for OKC is marsupialization that, by definition, consists of the conversion of the lesion into a pouch connected to the oral mucosa. It has been shown that this procedure can decrease the size of lesion and in some circumstances cause its regression but there are conflicting data regarding the effectiveness of this procedure ^{23,24}. Some of the OKC lesions in our study showed a different expression pattern of exon 1 after this procedure. These lesions lost exon 1b expression and exhibited exon 1d transcript, a similar pattern observed in dental follicles. It is important to note that exon 1d variant seems to be associated with the constitutive activation of the HH signaling ^{13,16}. Our finding indicates that linking the cyst with the oral mucosa alters the HH pathway regulation in some lesions, but not in all tumors.

Finally, we examined the expression profile of exon 1 in the oral mucosa adjacent to OKC lesions. Interestingly, this mucosa showed expression of the exon 1b (Fig. 1C) that was not present in the healthy mucosa. This implies that runaway activation of HH pathway also occurs in OKC adjacent area. This fact could be explained by the presence of clusters of epithelial islands and microcysts, which are believed to origin new cyst or recurrences. These islands and microcysts have been found in a large group of overlying mucosa connected to the OKC through a bony perforation ²⁵. As the fragments of oral mucosa adjacent to OKC tumors included in

the study were too small, it was not possible to perform their histopathological analysis. Taken together, our data is in agreement with the previous concept that the oral mucosa adjacent to the cyst lesion has a high potential to develop new cyst or recurrences and should be removed during the enucleation of the lesion ²⁵.

In conclusion, this report showed overactivity of the HH pathway in both groups of OKC lesion (sporadic and syndromic) as well as at the adjacent oral mucosa, demonstrated by *PTCHb* upregulation. We also provide evidence that marsupialization alters *PTCH1* variants profiling in a subset of cases. Further studies are necessary to delineate the status of the downstream components of the HH pathway in OKC lesions.

References

1. Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development* 2000;127(22):4775-85.
2. Oro AE, Higgins K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev Biol* 2003;255(2):238-48.
3. Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development* 2000;127(22):4905-13.
4. Hooper JE, Scott MP. Communicating with Hedgehogs. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2005;6(4):306-17.
5. Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, et al. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem* 1996;271(21):12125-8.
6. Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, et al. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science* 1996;272(5268):1668-71.
7. Gorlin RJ. Nevoid basal-cell carcinoma syndrome. *Medicine* 1987;66(2):98-113.
8. World Health Organization Classification of Tumours. Odontogenic Tumours. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. Pathology and Genetics of head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press, 2005. p. 306-307.
9. Lench NJ, Telford EA, High AS, Markham AF, Wicking C, Wainwright BJ. Characterisation of human patched germ line mutations in naevoid basal cell carcinoma syndrome. *Hum Genet* 1997;100(5-6):497-502.

10. 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.
11. Ayoubi TA, Van De Ven WJ. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J* 1996;10(4):453-60. Review.
12. Wang XQ, Rothnagel JA. Post-transcriptional regulation of the gli1 oncogene by the expression of alternative 5' untranslated regions. *J Biol Chem* 2001;276(2):1311-6.
13. Kogerman P, Krause D, Rahnema F, Kogerman L, Undén AB, Zaphiropoulos PG, Toftgård R. Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the PTCH1 protein. *Oncogene* 2002;21(39):6007-16.
14. Shimokawa T, Rahnema F, Zaphiropoulos PG. A novel first exon of the Patched1 gene is upregulated by Hedgehog signaling resulting in a protein with pathway inhibitory functions. *FEBS Lett* 2004;578(1-2):157-62.
15. Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene* 2004;330:101-14.
16. Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons. *Genomics* 2005;85(4):462-71.
17. Shimokawa T, Svärd J, Heby-Henricson K, Teglund S, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of first exon variants of the tumor-suppressor Patched1 in Hedgehog signaling. *Oncogene* 2007;26(34):4889-96.
18. Unden AB, Holmberg E, Lundh-Rozell B, Stähle-Bäckdahl M, Zaphiropoulos PG, Toftgård R, Vorechovsky I. Mutations in the human homologue of Drosophila patched (PTCH) in basal cell carcinomas and the Gorlin syndrome: different in vivo mechanisms of PTCH inactivation. *Cancer Res* 1996;56(20):4562-5.

19. Hutchin ME, Kariapper MS, Grachtchouk M, Wang A, Wei L, Cummings D, Liu J, Michael LE, Glick A, Dlugosz AA. Sustained Hedgehog signaling is required for basal cell carcinoma proliferation and survival: conditional skin tumorigenesis recapitulates the hair growth cycle. *Genes Dev.* 2005;19(2):214-23.
20. Grachtchouk M, Liu J, Wang A, Wei L, Bichakjian CK, Garlick J, Paulino AF, Giordano T, Dlugosz AA. Odontogenic keratocysts arise from quiescent epithelial rests and are associated with deregulated hedgehog signaling in mice and humans. *Am J Pathol* 2006;169(3):806-14.
21. Duman-Scheel M, Weng L, Xin S, Du W. Hedgehog regulates cell growth and proliferation by inducing Cyclin D and Cyclin E. *Nature* 2002;417(6886):299-304.
22. Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol* 2002;38(4):323-31.
23. Pogrel MA, Jordan RC. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg* 2004;62(6):651-5; discussion 655-6.
24. Pogrel MA. Decompression and marsupialization as definitive treatment for keratocysts--a partial retraction. *J Oral Maxillofac Surg* 2007;65(2):362-3.
25. Stoelinga PJ. Long-term follow-up on keratocysts treated according to a defined protocol. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2001;30(1):14-25.

Figures

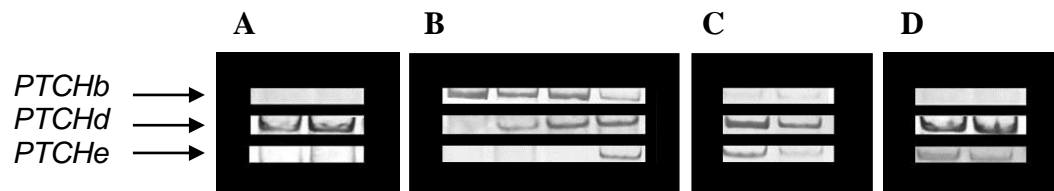


Fig.1. Illustrative expression profile of *PTCH1* alternative first exon (1b, 1d and 1e). Amplification of exon 1 in a cDNA panel subjected to RT-PCR. Electrophoresis in polyacrylamide gel 6.5% was performed to detect the transcripts. While Absence of transcript 1b was observed in all dental follicles (A), an evident band was noted in most of the odontogenic keratocyst lesions (B). Oral mucosa adjacent to the OKC lesion showed a weak *PTCHb* gel band (C) that is not noticed at mucosa of health volunteers (D).

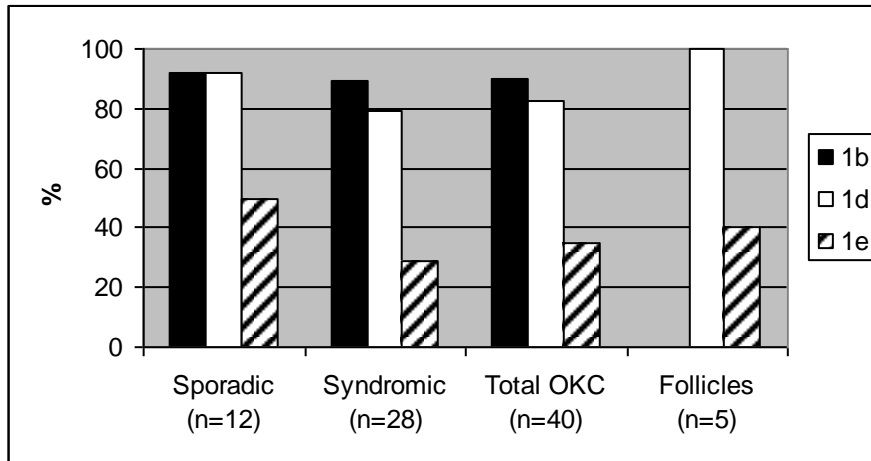


Fig. 2. RT-PCR graphic showing the exons variants profiling in OKC and control case. While most of the OKC cases presented exon 1b, none of the dental follicles showed this variant.

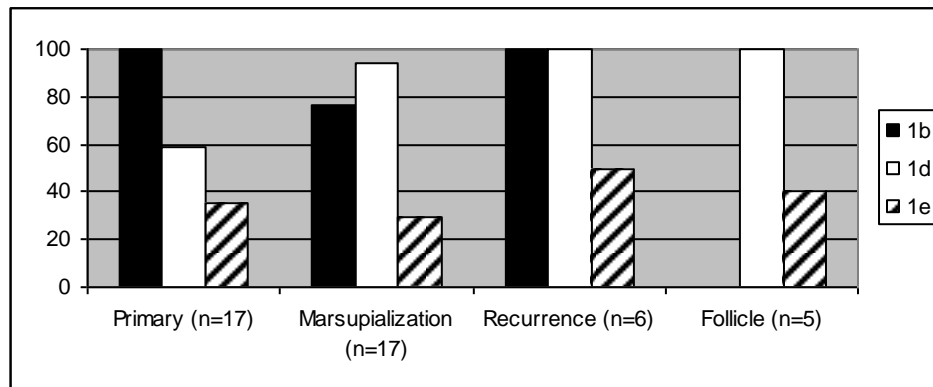


Fig. 3. RT-PCR graphic showing the presence of alternative exons in primary, marsupialized and recurrent (OKC). Note that some of the odontogenic keratocyst tumors treated by marsupialization (4 out of 17) did not express exon 1b transcript.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

3. Considerações finais

Em muitos casos, neoplasias parecem ser causadas pela desregulação de vias que estão normalmente envolvidas no processo de diferenciação celular primária de grupos de células, tecidos ou órgãos, o que depois afeta a determinação celular. A via Hh é uma via importante na regulação da proliferação e diferenciação de células nos embriões e em adultos. Quando esta via é ativada ou mantida inapropriadamente, vários tumores podem se desenvolver.

Achados prévios de mutações no gene *PTCH1* em CO sugeriram primeiramente que a desregulação da via Hh estaria relacionada com a tumorigênese do CO. Em nosso estudo demonstramos a superexpressão da isoforma *PTCHb* em 90% dos casos de CO. Este dado, juntamente com a observação de que apenas *PTCHb* apresenta regulação aumentada pela via Hh, é um indício de que esta via está constitutivamente ativada em CO.

Em nosso estudo incluímos 40 casos de CO (APÊNDICE C). A expressão dos três exons 1 alternativos foi encontrada em CO (APÊNDICE A Figura 1) mas em proporções desiguais. As duas isoformas *PTCHd* e *PTCh* transcrevem RNAm diferentes mas a proteína traduzida é a mesma (*PTCHs*). Esta proteína é diferente da proteína traduzida por *PTCHb* (*PTCHL*) (APÊNDICE A Figura 2). Isso sugere que a os RNAm que contém 1d e 1e são regulados diferentemente mas a função da proteína codificada é a mesma.

Dois diferentes grupos estudaram a funcionalidade das proteínas traduzidas pelas isoformas. O primeiro demonstrou que *PTCHL* induz apoptose em células 293T que expressam transitoriamente *PTCHb*, mas, por outro lado, a atividade luciferase em constructos demonstrou que *PTCHs* não suprime significativamente a resposta ao Gli ou induz apoptose (NAGAO et al., 2005). No outro estudo, a co-transfecção de um constructo de expressão Gli com as isoformas individuais demonstrou a maior capacidade de *PTCHL* em bloquear a atividade Gli (SHIMOKAWA et al., 2007). Em ambos os trabalhos estes resultados são explicados devido a maior instabilidade de

PTCHs, isso implica que a propriedade inibitória do PTCHL pode ser devido a maior expressão protéica do que diferenças funcionais intrínsecas.

Os resultados da expressão dos exons 1 alternativos na mucosa adjacente mostraram que esta área, assim como a lesão, expressa o gene *PTCHb*. Analisando as bandas do gel notamos que as amostras de mucosa adjacente sempre apresentavam bandas menos intensas, podendo indicar menor atividade da via Hh (APÊNDICE B), mas, uma limitação do nosso estudo é que a técnica de RT – PCR não permite a quantificação da expressão das isoformas. Uma análise por PCR em tempo real pode dar respostas mais concisas para a relação da hiperatividade da via Hh e o potencial de formação de novos cistos da mucosa da área adjacente.

Em nosso estudo, observamos a ausência de expressão do *PTCHb* em 4 amostras de CO marsupializados, sendo que um era de CO esporádico e três eram de CO associados à SCBN. Em duas dessas amostras, uma de CO esporádico e uma de CO associado à SCBN, nós tínhamos coletado fragmentos císticos antes e depois da marsupialização. Nestes casos pode-se afirmar que houve perda da expressão do exon 1b. Apesar das controvérsias, a marsupialização é um procedimento que pode levar a regressão do cisto e atualmente nada se sabe a respeito dos mecanismos moleculares por trás disso. É importante ressaltar que para todas as reações de RT – PCR um controle positivo com primers para o gene constitutivo GAPDH foi realizado para confirmar a qualidade do cDNA e evitar falsos negativos.

Estudos de comparação entre o CO esporádicos e associados à SCBN têm fornecidos dados significativos, como maior atividade mitótica das células epiteliais e a maior prevalência de cistos satélites nos CO associados à síndrome (WOOLGAR et al., 1987). Neste estudo, porém, não percebemos diferenças relevantes entre estes dois tipos de CO. A via Hh parece ser importante para a patogênese de ambos.

Sugerimos que as conseqüências da desregulação da via Hh em CO podem ser a regulação aumentada de genes relacionados com a proliferação e sobrevivência celular já descrito na literatura. Através de ensaios de Imunoistoquímica foi demonstrada a superexpressão de ciclina D, maior

positividade do PCNA e de bcl-2 em CO comparadamente a outros cistos da mandíbula (SHEAR, 2002; PIATTELLI et al., 1998 404). Assim, novos estudos analisando por biologia molecular a correlação entre a desregulação da via Hh e a expressão alterada de ciclina D e do gene alvo de E2F, PCNA, assim como a proteína antiapoptótica bcl-2 seria interessante para elucidar esta associação sugerida e confrontar com a hipótese de que a expressão da ciclina D acontece no passo da progressão neoplásica que precede a alteração no gene p53 (SHEAR, 2002).

Nosso estudo estreita a participação da via Hh na formação do CO. Estudos que avaliem o impacto da via Hh ou de seus componentes no desenvolvimento e manutenção do CO são muito importantes e podem fornecer dados interessantes para futuros alvos terapêuticos.

4.CONCLUSÕES

4. Conclusões

Através deste estudo podemos concluir:

- A maioria dos CO esporádicos e associados à SCBN expressam o exon 1b e 1d.
- A expressão do *PTCHb* está aumentada em CO comparado ao folículo dental.
- Comparado a mucosa normal de pacientes saudáveis, a via Hh está ativada na mucosa adjacente ao CO, demonstrado através do aumento da expressão do exon 1b.
- A marsupialização pode alterar a expressão do primeiro exon do *PTCH1* em alguns casos.

5.REFERÊNCIAS

5. Referências

Agaram NP, Collins BM, Barnes L, Lomago D, Aldeeb D, Swalsky P, Finkelstein S, Hunt JL. Molecular analysis to demonstrate that odontogenic keratocysts are neoplastic. *Pathol Lab Med.* 2004; 128(3):313-7.

Agren M, Kogerman P, Kleman MI, Wessling M, Toftgård R. Expression of the PTCH1 tumor suppressor gene is regulated by alternative promoters and a single functional Gli-binding site. *Gene.* 2004; 330:101-14.

Alexandre C, Jacinto A, Ingham PW. Transcriptional activation of hedgehog target genes in *Drosophila* is mediated directly by the cubitus interruptus protein, a member of the GLI family of zinc finger DNA-binding proteins. *Genes Dev.* 1996; 10(16):2003-13.

Ayoubi TA, Van De Ven WJ. Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J.* 1996; 10(4):453-60.

Bai CB, Stephen D, Joyner AL. All mouse ventral spinal cord patterning by hedgehog is Gli dependent and involves an activator function of Gli3. *Dev Cell.* 2004; 6(1):103-15.

Ball HJ, Shine J, Herzog H. Multiple promoters regulate tissue-specific expression of the human NPY-Y1 receptor gene. *J Biol Chem.* 1995; 270(45):27272-6.

Barnes EA, Kong M, Ollendorff V, Donoghue DJ. Patched1 interacts with cyclin B1 to regulate cell cycle progression. *EMBO J.* 2001; 20(9):2214-23.

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.

Bigelow RL, Chari NS, Uden AB, Spurgers KB, Lee S, Roop DR, Toftgard R, McDonnell TJ. Transcriptional regulation of bcl-2 mediated by the sonic hedgehog signaling pathway through gli-1. *J Biol Chem.* 2004; 279(2):1197-205.

Burke R, Nellen D, Bellotto M, Hafen E, Senti KA, Dickson BJ, Basler K. Dispatched, a novel sterol-sensing domain protein dedicated to the release of cholesterol-modified hedgehog from signaling cells. *Cell.* 1999; 99(7):803-15.

Collins RT, Cohen SM. A Genetic Screen in *Drosophila* for Identifying Novel Components of the Hedgehog Signaling Pathway. 2005. *Genetics.* 170:173-184

Chiang C, Swan RZ, Grachtchouk M, Bolinger M, Litingtung Y, Robertson EK, Cooper MK, Gaffield W, Westphal H, Beachy PA, Dlugosz AA. Essential role for Sonic hedgehog during hair follicle morphogenesis. *Dev Biol.* 1999; 205(1):1-9.

Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. Activation of the transcription factor Gli1 and the Sonic hedgehog signalling pathway in skin tumours. Dahmane N, Lee J, Robins P, Heller P, Ruiz i Altaba A. *Nature*. 1997; 389(6653):876-81.

Dassule HR, Lewis P, Bei M, Maas R, McMahon AP. Sonic hedgehog regulates growth and morphogenesis of the tooth. *Development*. 2000; 127(22):4775-85.

Delehedde M, Cho SH, Sarkiss M, Brisbay S, Davies M, El-Naggar AK, McDonnell. Altered expression of bcl-2 family member proteins in nonmelanoma skin cancer. *Cancer*. 1999; 85(7):1514-22.

Ding Q, Fukami S, Meng X, Nishizaki Y, Zhang X, Sasaki H, Dlugosz A, Nakafuku M, Hui C. Mouse suppressor of fused is a negative regulator of sonic hedgehog signaling and alters the subcellular distribution of Gli1. *Curr Biol*. 1999; 9(19):1119-22.

Dulic V, Lees E, Reed SI. Association of human cyclin E with a periodic G1-S phase protein kinase. *Science*. 1992; 257(5078):1958-61

Duman-Scheel M, Johnston LA, Du W. Repression of dMyc expression by Wingless promotes Rbf-induced G1 arrest in the presumptive *Drosophila* wing margin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(11):3857-62.

Echelard Y, Epstein DJ, St-Jacques B, Shen L, Mohler J, McMahon JA, McMahon AP. Sonic hedgehog, a member of a family of putative signaling molecules, is implicated in the regulation of CNS polarity. *Cell*. 1993 Dec 31;75(7):1417-30.

Eduardo Katchburian, Victor Arana. *Histologia e Embriologia Oral*. 1ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 1999. Capítulo 6, odontogênese; p.153-79.

Gailani MR, Ståhle-Bäckdahl M, Leffell DJ, Glynn M, Zaphiropoulos PG, Pressman C, Undén AB, Dean M, Brash DE, Bale AE, Toftgård R. The role of the human homologue of *Drosophila* patched in sporadic basal cell carcinomas. *Nat Genet*. 1996; 14(1):78-81.

Goodrich LV, Jung D, Higgins KM, Scott MP. Overexpression of *ptc1* inhibits induction of Shh target genes and prevents normal patterning in the neural tube. *Dev Biol*. 1999; 211(2):323-34.

Gorlin RJ. Nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Dermatol Clin*. 1995; 13(1):113-25.

Hahn H, Christiansen J, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Chidambaram A, Gerrard B, Vorechovsky I, Bale AE, Toftgård R, Dean M, Wainwright B. A mammalian patched homolog is expressed in target tissues of sonic hedgehog and maps to a region associated with developmental abnormalities. *J Biol Chem*. 1996a; 271(21):12125-8.

Hahn H, Wicking C, Zaphiropoulos PG, Gailani MR, Shanley S, Chidambaram A, Vorechovsky I, Holmberg E, Unden AB, Gillies S, Negus K, Smyth I, Pressman C, Leffell DJ, Gerrard B, Goldstein AM, Dean M, Toftgård R, Chenevix-Trench G,

Wainwright B, Bale AE. Mutations of the human homolog of *Drosophila* patched in the nevoid basal cell carcinoma syndrome. *Cell*. 1996b; 85(6):841-51.

Hardcastle Z, Mo R, Hui CC, Sharpe PT. The Shh signalling pathway in tooth development: defects in Gli2 and Gli3 mutants. *Development*. 1998; 125(15):2803-11.

Hebrok M, Kim SK, St Jacques B, McMahon AP, Melton DA. Regulation of pancreas development by hedgehog signaling. *Development*. 2000; 127(22):4905-13.

Hodgkinson DJ, Woods JE, Dahlin DC, Tolman DE. Keratocysts of the jaw. Clinicopathologic study of 79 patients. *Cancer*. 1978; 41(3):803-13.

Huangfu D, Anderson KV. Signaling from Smo to Ci/Gli: conservation and divergence of Hedgehog pathways from *Drosophila* to vertebrates. *Development*. 2006; 133(1):3-14.

Hunter T, Pines J. Cyclins and cancer. II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. *Cell*. 1994; 79(4):573-82.

Ingham PW, McMahon AP. Hedgehog signaling in animal development: paradigms and principles. *Genes Dev*. 2001; 15(23):3059-87.

Ingham PW, Taylor AM, Nakano Y. Role of the *Drosophila* patched gene in positional signaling. *Nature*. 1991; 353(6340):184-7.

Irvin-Wilson CV, Chaudhuri G. Alternative initiation and splicing in dicer gene expression in human breast cells. *Breast Cancer Res*. 2005; 7(4):R563-9.

Jeong J, McMahon AP. Growth and pattern of the mammalian neural tube are governed by partially overlapping feedback activities of the hedgehog antagonists patched 1 and Hhip1. *Development*. 2005; 132(1):143-154

Jia J, Jiang J. Decoding the Hedgehog signal in animal development. *Cell Mol Life Sci*. 2006; 63(11):1249-65.

Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD. Genome-wide survey of human alternative pre-mRNA splicing with exon junction microarrays. *Science*. 2003; 302(5653):2141-4.

Johnson RL, Rothman AL, Xie J, Goodrich LV, Bare JW, Bonifas JM, Quinn AG, Myers RM, Cox DR, Epstein EH Jr, Scott MP. Human homolog of patched, a candidate gene for the basal cell nevus syndrome. *Science*. 1996; 272(5268):1668-71.

Kakarantza-Angelopoulou E, Nicolatou O. Opinions regarding odontogenic keratocysts. *J Oral Maxillofac Surg*. 1990; 48(12):1353-4.

Kenney AM, Rowitch DH. Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol.* 2000; 20(23):9055-67.

Kogerman P, Krause D, Rahnema F, Kogerman L, Undén AB, Zaphiropoulos PG, Toftgård R. Alternative first exons of PTCH1 are differentially regulated in vivo and may confer different functions to the PTCH1 protein. *Oncogene.* 2002; 21(39):6007-16.

Lench NJ, Telford EA, High AS, Markham AF, Wicking C, Wainwright BJ. Characterisation of human patched germ line mutations in naevoid basal cell carcinoma syndrome. *Hum Genet.* 1997; 100(5-6):497-502.

Lopez AJ. Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu Rev Genet.* 1998; 32:279-305.

Machold R, Hayashi S, Rutlin M, Muzumdar MD, Nery S, Corbin JG, Gritli-Linde A, Dellovade T, Porter JA, Rubin LL, Dudek H, McMahon AP, Fishell G. Sonic hedgehog is required for progenitor cell maintenance in telencephalic stem cell niches. *Neuron.* 2003; 39(6):937-50.

Mann RK, Beachy PA. Novel lipid modifications of secreted protein signals. *Annu Rev Biochem.* 2004; 73:891-923.

Marigo V, Davey RA, Zuo Y, Cunningham JM, Tabin CJ. Biochemical evidence that patched is the Hedgehog receptor. *Nature.* 1996; 384(6605):176-9.

Nagao K, Toyoda M, Takeuchi-Inoue K, Fujii K, Yamada M, Miyashita T. Identification and characterization of multiple isoforms of a murine and human tumor suppressor, patched, having distinct first exons. *Genomics.* 2005; 85(4):462-71.

Nakamura N, Mitsuyasu T, Mitsuyasu Y, Taketomi T, Higuchi Y, Ohishi M. Marsupialization for odontogenic keratocysts: long-term follow-up analysis of the effects and changes in growth characteristics. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2002; 94(5):543-53.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* 2ª ed. Moreira LC, Moleri AB, Rabelo DA, Merly F, Cunha JM, tradutor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Capítulo 15, Cistos e Tumores Odontogênicos; p.570-73

Nüsslein-Volhard C, Wieschaus E. Mutations affecting segment number and polarity in *Drosophila*. *Nature.* 1980; 287(5785):795-801.

Ohtani K, DeGregori J, Nevins, JR. Regulation of the cyclin E gene by transcription factor E2F1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995; 92(26):12146-50.

Oro AE, Higgins K. Hair cycle regulation of Hedgehog signal reception. *Dev Biol.* 2003; 255(2):238-48.

Pasca di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(12):903-11.

Piattelli A, Fioroni M, Rubini C. Differentiation of odontogenic keratocysts from other odontogenic cysts by the expression of bcl-2 immunoreactivity. *Oral Oncol*. 1998; 34(5):404-7.

Platt KA, Michaud J, Joyner AL. Expression of the mouse Gli and Ptc genes is adjacent to embryonic sources of hedgehog signals suggesting a conservation of pathways between flies and mice. *Mech Dev*. 1997; 62(2):121-35.

Pogrel MA, Jordan RC. Marsupialization as a definitive treatment for the odontogenic keratocyst. *J Oral Maxillofac Surg*. 2004; 62(6):651-5.

Pogrel MA. Decompression and marsupialization as definitive treatment for keratocysts--a partial retraction. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 65(2):362-3.

Pogrel MA. Treatment of keratocysts: the case for decompression and marsupialization. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005; 63(11):1667-73.

Raffel C, Jenkins RB, Frederick L, Hebrink D, Alderete B, Fults DW, James CD. Sporadic medulloblastomas contain PTCH mutations. *Cancer Res*. 1997; 57(5):842-5.

Rahnama F, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of PTCH2 splice variants in Hedgehog signalling. *Biochem J*. 2004; 378(Pt 2):325-34.

Rodriguez-Villanueva J, Colome MI, Brisbay S, McDonnell TJ. The expression and localization of bcl-2 protein in normal skin and in non-melanoma skin cancers. *Pathol Res Pract*. 1995; 191(5):391-8.

Ruiz i Altaba A. Catching a Gli-mpse of Hedgehog. *Cell*. 1997; 90(2):193-6.

Sanchez P, Hernández AM, Stecca B, Kahler AJ, DeGueme AM, Barrett A, Beyna M, Datta MW, Datta S, Ruiz i Altaba A. Inhibition of prostate cancer proliferation by interference with SONIC HEDGEHOG-GLI1 signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004; 101(34):12561-6.

Shear M. The aggressive nature of the odontogenic keratocyst: is it a benign cystic neoplasm? Part 2. Proliferation and genetic studies. *Oral Oncol*. 2002; 38(4):323-31.

Shimokawa T, Rahnama F, Zaphiropoulos PG. A novel first exon of the Patched1 gene is upregulated by Hedgehog signaling resulting in a protein with pathway inhibitory functions. *FEBS Lett*. 2004; 578(1-2):157-62.

Shimokawa T, Svärd J, Heby-Henricson K, Teglund S, Toftgård R, Zaphiropoulos PG. Distinct roles of first exon variants of the tumor-suppressor Patched1 in Hedgehog signaling. *Oncogene*. 2007; 26(34):4889-96.

Stoelinga PJ. Excision of the overlying, attached mucosa, in conjunction with cyst enucleation and treatment of the bony defect with carnoy solution. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am.* 2003; 15(3):407-14.

Stone DM, Hynes M, Armanini M, Swanson TA, Gu Q, Johnson RL, Scott MP, Pennica D, Goddard A, Phillips H, Noll M, Hooper JE, de Sauvage F, Rosenthal A. The tumour-suppressor gene patched encodes a candidate receptor for Sonic hedgehog. *Nature.* 1996; 384(6605):129-34.

Taipale J, Beachy PA. The Hedgehog and Wnt signalling pathways in cancer. *Nature.* 2001; 411(6835):349-54.

Taipale J, Cooper MK, Maiti T, Beachy PA. Patched acts catalytically to suppress the activity of Smoothened. *Nature.* 2002; 418(6900):892-7.

Thayer SP, di Magliano MP, Heiser PW, Nielsen CM, Roberts DJ, Lauwers GY, Qi YP, Gysin S, Fernández-del Castillo C, Yajnik V, Antoniu B, McMahon M, Warshaw AL, Hebrok M. Hedgehog is an early and late mediator of pancreatic cancer tumorigenesis. *Nature.* 2003; 425(6960):851-6.

Thibert C, Teillet MA, Lapointe F, Mazelin L, Le Douarin NM, Mehlen P. Inhibition of neuroepithelial patched-induced apoptosis by sonic hedgehog. *Science.* 2003; 301(5634):843-6.

Undén AB, Zaphiropoulos PG, Bruce K, Toftgård R, Ståhle-Bäckdahl M. Human patched (PTCH) mRNA is overexpressed consistently in tumor cells of both familial and sporadic basal cell carcinoma. *Cancer Res.* 1997; 57(12):2336-40.

Von Ohlen T, Lessing D, Nusse R, Hooper JE. Hedgehog signaling regulates transcription through cubitus interruptus, a sequence-specific DNA binding protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94(6):2404-9.

Wang C, Rütter U, Wang B. The Shh-independent activator function of the full-length Gli3 protein and its role in vertebrate limb digit patterning. *Dev Biol.* 2007; 305(2):460-69.

Watkins DN, Berman DM, Burkholder SG, Wang B, Beachy PA, Baylin SB. Hedgehog signalling within airway epithelial progenitors and in small-cell lung cancer. *Nature.* 2003; 422(6929):313-7.

Woolgar JÁ, Rippin JW, Browne RM. A comparative histological study of odontogenic keratocysts in basal cell naevus syndrome and control patients. *J Oral Pathol.* 1987; (2):75-80.

World Health Organization Classification of Tumours [Organização Mundial de Saúde]. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours [Patologia e Genética de Tumores de Cabeça e Pescoço]. Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D, editores. 1ª ed. Lyon (França): IARC Press; 2005. Chapter 6, Odontogenic Tumours [Capítulo 6, Tumores Odontogênicos]; p. 306-7. Inglês

6. Apêndices

APÊNDICE A – RT - PCR dos exons 1 alternativos e gráfico da região do gene *PTCH1*

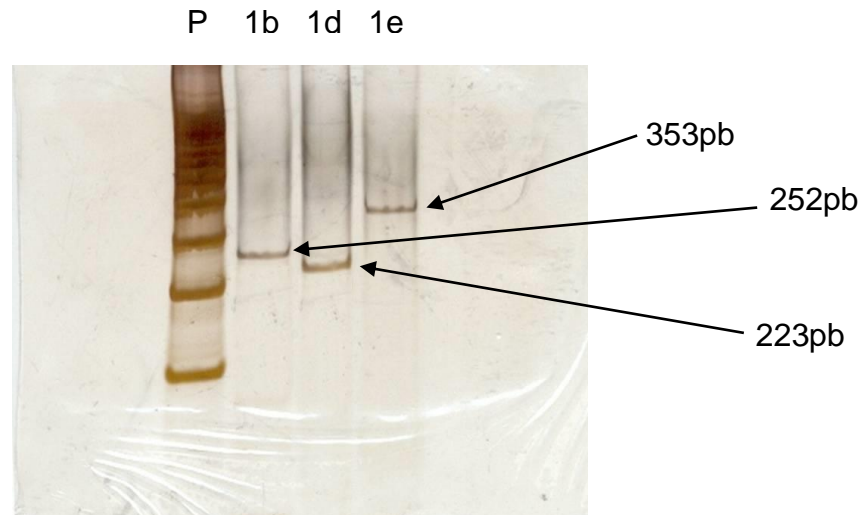


Figura 1: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%: Produto da RT - PCR em CO. Observa-se o padrão (P) seguido da banda de 252pb referente ao exon 1b ; banda de 223pb referente ao exon 1d e a banda de 353pb referente ao exon 1e (c).



Figura 2: Região genômica, transcritos e produtos alternativos do *PTCH1*. Em azul é a região transcrita mas não traduzida em proteína. Em vermelho, região traduzida. NM_000264+3: numero de acesso do transcrito variante 1b; NM_001083606+1: transcrito variante 1d; NM_001083607+1: transcrito variante 1e; NP_000255+2: proteína L; NP_001077075+1: proteína S; NC_000009.10: cromossomo 9. Fonte: modificado ENTREZ GENE [Internet]

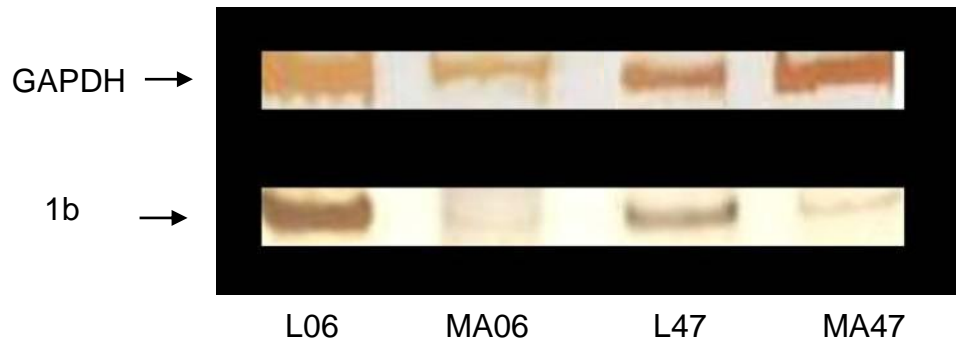
APÊNDICE B – Exon 1b em CO e mucosa adjacente

Figura 3: Bandas ilustrativas referentes ao produto da RT – PCR. L: Lesão; MA: mucosa adjacente.

APÊNDICE C – Dados clínicos

Tabela I – Dados clínicos dos casos de CO incluídos no estudo

<i>Esporádicos</i>	¹ Pacientes		² Lesões (n=40)		
	Sexo	*Idade	P	M	R
1	M	21	+		
2	F	?	+		
3	M	21	+		
4	F	36		+	
5	M	24		+	
6	M	44		+	
7	M	26		+	
8	M	15		+	
9	M	?	+		
10	F	25		+	
11	M	61		+	
12	M	25		+	
<i>Associados à SCBN</i>					
1	M				
		14	+	+	
		14	+	+	
		14	+	+	
		14	+		
		14		+	
2	F				
		19	+	+	
		20	+		
		20	+		+
		20	+	+	
3	M				
		34	+	+	
		34	+		
		34	+		
		37	+		
		37			+
4	F				
		10	+		
		11	+		
		11		+	+
		11		+	
5	F				
		?		+	
		?		+	

¹Pacientes: M: Masculino; F: Feminino; SCBN: Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide. *Idade na primeira cirurgia

²Lesões: P: Lesões primárias; M: Lesões coletadas após enucleação de cisto marsupializado; R: Lesões recorrentes.

APÊNDICE D – Termo de consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “Avaliação das Múltiplas Isoformas do gene *Patched* em Ceratocisto Odontogênico”.

Esta pesquisa tem o objetivo de estudar as várias formas que o gene chamado PTCH aparece no ceratocisto odontogênico (CO). Isso será importante para que possamos entender melhor como o ceratocisto se desenvolve e futuramente melhorar seu diagnóstico e tratamento.

Para esse estudo, preciso da sua autorização para utilizar parte do material coletado durante as cirurgias do seu tratamento. Este material será pesquisado em laboratório. A sua participação não oferecerá riscos à sua saúde e caso você não esteja de acordo em participar desta pesquisa o seu tratamento continuara normalmente.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a utilização de parte do fragmento do tumor para este projeto de pesquisa, assim como a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento.

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____ .

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: _____ No. _____

Pesquisador: **Marina G. Diniz** _____. Telefone: **(31) 8899 9953 (31) 3499 2477** _____

Pesquisador orientador: **Ricardo Gomez** _____. Telefone: **(31) 3499 2477** _____

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (**COEP**). Em caso de dúvida, você pode ligar para o **COEP** através do número (31) 3499 4592.

Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG.
31270-901

7.ANEXOS

ANEXO A – Sinalização Hedgehog

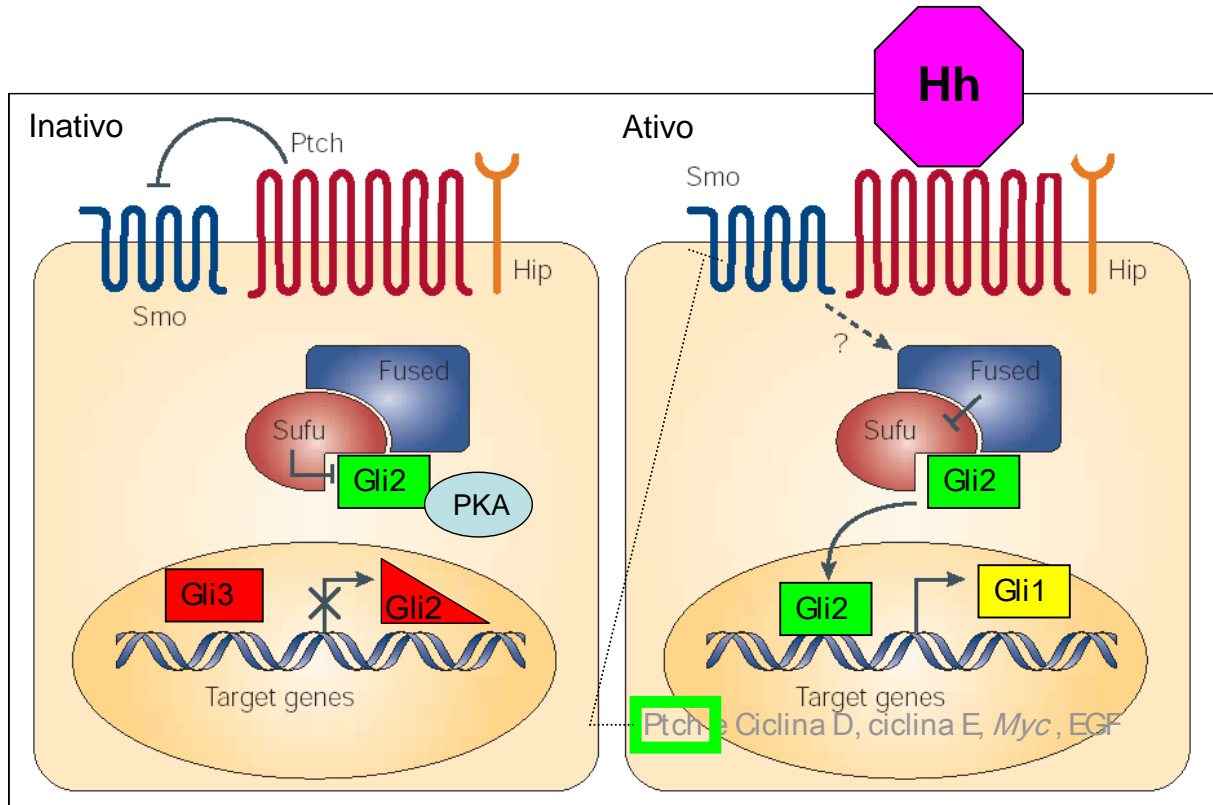


Figura 4. Diagrama da sinalização Hh em mamíferos. Na ausência do ligante, Ptch inibe Smo e via é inativa. O fator de transcrição Gli2 é impedido de entrar no núcleo através de interações com as proteínas citoplasmáticas Fused e Sufu (Supressor de Fused). PKA promove a proteólise de Gli2 e formação de um repressor da transcrição. A ativação da via inicia-se pela ligação da Proteína Hh. Isso culmina na ativação de uma cascata que leva a translocação de Gli2 integro ao núcleo. Gli nuclear ativa genes alvos, incluindo o fator de transcrição secundário Gli1, genes envolvidos no controle da proliferação celular e o próprio Ptch que promove um feedback negativo da via. Fonte: modificado de MAGLIANO et al., 2003.