

# ***1- INTRODUÇÃO***

## 1.1 TUMORES ODONTOGÊNICOS EPITELIAIS

Os tumores odontogênicos eram classificados de acordo com suas características histológicas e origem embrionária em: tumores odontogênicos epiteliais, com ou sem ectomesênquima associados, e tumores de origem ectomesenquimal (Pindborg, 1958; Kramer, Pindborg e Shear, 1992, Philipsen e Reichart, 2002). Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS) reclassificou os tumores odontogênicos. De acordo com essa nova classificação (Barnes *et al.*, 2005), os tumores odontogênicos epiteliais dividem-se em:

1. Tumores com epitélio odontogênico e tecido conjuntivo maduro: ameloblastoma, tumor odontogênico adenomatóide, tumor odontogênico epitelial calcificante, tumor odontogênico escamoso;

2. Tumores com epitélio odontogênico com ectomesênquima com ou sem tecido duro: cisto odontogênico calcificante, fibroma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico dentre outros.

Os tumores odontogênicos epiteliais formam um grupo histogeneticamente relacionado aos remanescentes do epitélio odontogênico, podendo-se incluir a lâmina dentária, órgão do esmalte e bainha epitelial de Hertwing (Schafer *et al.*, 1998).

O órgão do esmalte é uma estrutura epitelial derivada do ectoderma responsável por determinar: a forma da coroa; o início da formação da dentina; estabilizar a junção dentogengival; formar o esmalte no desenvolvimento do germe dentário (Smith, 1998). Remanescentes da lâmina dentária permanecem dentro dos ossos maxilares após a odontogênese, durante um período indeterminado da vida. Devido a essa presença prolongada pensava-se que alguns cistos e tumores

odontogênicos originavam-se dos resíduos dessas células no osso e tecido mole da cavidade bucal (Melrose, 1999).

Os tumores odontogênicos epiteliais podem apresentar comportamento agressivo como é o caso do ameloblastoma, tumor relativamente comum de etiologia e patogênese desconhecidas, ou ter característica hamartomatosa como é o caso do tumor odontogênico adenomatóide (Kameyama *et al*, 1987; Reichart, Philipsen e Sonner, 1995; Gardner, 1996; Bataineh, 2000).

O ameloblastoma é o tumor odontogênico epitelial mais comum, originário dos remanescentes epiteliais da odontogênese. Caracteriza-se por ser benigno, mas localmente invasivo, com alto risco de recorrência (Kramer, Pindborg e shear 1992; Melrose, 1999; Sciubba, Fantasia, Kahn, 2001).

Os ameloblastomas classificam-se de acordo com suas características clínicas e radiográficas, em: sólidos ou multicísticos, unicísticos e periféricos (Gardner, 1996; Waldron e el-Mofty, 1987). O tipo sólido é o mais comum, 86% dos casos, sendo também o mais agressivo. O tipo unicístico representa cerca de 13% de todos os casos de ameloblastomas intra-ósseos. O periférico é o mais raro, representando cerca de 1% dos tumores (Gardner, 1996).

Histologicamente, os ameloblastomas apresentam células colunares altas, polaridade nuclear invertida, vacuolização subnuclear, lembrando os ameloblastos indiferenciados, e um tecido conjuntivo fibroso diferenciado (Gardner e Pecak, 1980; Schafer *et al.*, 1998; Philipsen e Reichart, 2002).

Segundo Kramer (1992), os ameloblastomas apresentam vários tipos histológicos como: folicular, plexiforme, acantomatoso, células granulares, células basais e desmoplásico.

De acordo com Philipsen e Reichart (1999), o tumor odontogênico adenomatóide (TOA) representa de 3% a 7% dos tumores odontogênicos. Esses autores consideraram que, devido ao seu crescimento lento, ele se caracteriza mais como um hamartoma do que como uma neoplasia verdadeira.

Os TOAs são tumores assintomáticos, acometem principalmente indivíduos jovens, localizando-se, na maioria das vezes, na região anterior da maxila e podem associar-se a um dente impactado (Damm *et al.*, 1983).

O cisto odontogênico calcificante (COC) é uma lesão incomum, que apresenta considerável diversidade histopatológica e comportamento clínico variável. O COC pode se associar-se a outros tumores odontogênicos como os odontomas, TOA, ameoloblastomas (Buchner, 1991; Hong, Ellis, Hartman, 1991).

O tumor odontogênico escamoso é uma neoplasia benigna rara descrita pela primeira vez em 1975 por Pullon *et al.* Essa neoplasia tem sido encontrada em uma ampla faixa etária: de 8 a 74 anos, acometendo qualquer região dos ossos maxilares; radiograficamente aparece como uma lesão radiolúcida bem delimitada lateralmente à raiz ou às raízes dos dentes (Philipsen e Reichart, 1996; Kusama *et al.*, 1998).

Os tumores odontogênicos têm sido amplamente estudados na tentativa de se entender sua etiopatogênese.

A primeira mutação descrita em ameloblastomas foi no gene da *AMBN* em 2000. Toyosawa *et al.* (2000) estudaram três tumores e encontraram mutações silenciosas e não silenciosas, mostrando uma possível relação desse gene com o tumor.

Takata *et al.* (2000) avaliaram a imunolocalização da bainhelina, uma proteína análoga a ameloblastina em tumores odontogênicos. Os autores

observaram que a marcação era positiva nos odontomas, nos fibro-odontomas ameloblásticos, nas células fantasmas do cisto odontogênico calcificante e no material eosinofílico que aparecia ao redor do epitélio odontogênico. A imunolocalização foi negativa nos ameloblastomas e nos tumores odontogênicos epiteliais calcificantes, tanto nas células, quanto na matriz extra celular. Os autores observaram que essa proteína era um bom marcador para avaliar a diferenciação funcional dos ameloblastos e da matriz do esmalte em tumores odontogênicos. Através desse estudo, os autores puderam concluir que as células dos ameloblastomas parecem não ter atingido a maturidade funcional.

Estudos como os de Heikinheimo *et al.* (2002) demonstraram o perfil de expressão de alguns genes em ameloblastomas. Alguns genes como *c-fos* e *TNFRSF1A* (receptor 1A do fator de necrose tumoral) mostraram uma super-expressão nesses tumores, entretanto, os genes *SHH* (sonic hedgehog), *TGFB1* (fator de crescimento transformador 1 beta) dentre outros apresentaram uma sub-expressão em ameloblastomas.

Um estudo recente mostrou a perda de alelos de genes supressores de tumores como *L-myc* e *PTEN* em ameloblastomas e em carcinomas ameloblásticos. Essa perda alélica foi relativamente freqüente em ameloblastomas e em carcinomas ameloblásticos e não estava relacionado com a idade, gênero, tipo histológico ou prognóstico. O trabalho mostrou que, provavelmente, a patogênese dos ameloblastomas e dos carcinomas ameloblásticos é acumulativa e esporádica. Os autores concluíram que outros mecanismos genéticos e epigenéticos, que não a perda alélica dos genes estudados poderiam ser responsáveis pelo comportamento desses tumores (Nodit *et al.*, 2004).

Mutações no gene *p53* são raras em ameloblastomas, mas parece haver uma superexpressão da proteína nos tumores (Shibata *et al.*, 2002; Appel *et al.*, 2004). A imunolocalização da *p53* tem sido relacionada com a recorrência de ameloblastomas, sugerindo que tumores recorrentes apresentam um aumento da marcação dessa proteína. Seu uso, portanto, poderia auxiliar no prognóstico desses tumores (Appel *et al.* 2004).

Autores como Kumamoto, Ohki e Ooya (2005) mostraram que o aumento da expressão do *p63* e de *p73*, homologos do *p53*, em ameloblastomas, sugeriu que tais proteínas desempenham um importante papel na diferenciação e na proliferação das células epiteliais odontogênicas.

O aumento da expressão de proteínas como K-ras, Raf1, MEK e ERK1/2 em ameloblastomas indica que a via Ras/MAPK pode regular a proliferação celular e a diferenciação do epitélio odontogênico normal e neoplásico (Kumamoto *et al.*, 2004).

Sandra *et al.* (2005) avaliaram a capacidade indutora de apoptose do TNF- $\alpha$  e das vias induzidas por TNF- $\alpha$ , Akt e MAPK, na apoptose de ameloblastomas. Os autores observaram que o TNF- $\alpha$  induziu tanto a sobrevivência celular quanto a via de apoptose em ameloblastoma. O potencial do TNF- $\alpha$  em induzir a apoptose melhorou pela inibição das vias anti-apoptóticas AKT e via p44/42 MAPK.

O polimorfismo do gene *PTCH1* foi estudado em pacientes com ameloblastomas. O objetivo do estudo foi avaliar se pacientes com ameloblastoma apresentavam repetições trinucleotídicas (CGG) na região 5' não traduzida do gene. Os autores realizaram um estudo, com caso-controle, em 14 ameloblastomas, e notaram que o polimorfismo presente na região não traduzida do gene, era mais prevalente nos pacientes com ameloblastomas do que nos pacientes-controle.

Concluiu-se então, que a presença desse polimorfismo em pacientes com ameloblastomas, poderia sugerir um aumento do risco para esse tumor (Kosugi *et al.*, 2005).

Kumamoto e Ooya (2005) demonstraram a imunolocalização da beta-catenina e da proteína APC em ameloblastomas, importantes sinalizadores da via Wnt. Esses autores avaliaram a imunomarcagem dessas proteínas em 10 germes dentários, 40 ameloblastomas benignos e 5 ameloblastomas malignos. Concluíram que a imunolocalização da beta-catenina e APC em germes dentários e em ameloblastomas sugere que uma aberração na via de sinalização Wnt desenvolveria um papel na oncogenese e citodiferenciação do epitélio odontogênico e desregulação da proliferação celular.

## **1.2 MIXOMAS ODONTOGÊNICOS E NÃO ODONTOGÊNICOS**

Os mixomas odontogênicos são neoplasias benignas derivadas do ectomesênquima odontogênico, que afetam os maxilares. Essa neoplasia acomete predominantemente adultos jovens, não tem predileção por sexo e a região posterior da mandíbula e da maxila são as áreas onde ela mais se manifesta (Hendler *et al.*, 1979; Kaffe *et al.*, 1997; Curran *et al.*, 2002; Hisatomi *et al.*, 2003). Histologicamente, a neoplasia compõe-se de células fusiformes, estreladas e ovais em um estroma mixóide frouxo, contendo pequenas ilhas de restos epiteliais odontogênicos inativo (Lombardi *et al.*, 1992; Quintal *et al.*, 1994; Ladeinde *et al.*, 2005).

Os mixomas odontogênicos são localmente invasivos e podem recidivar, principalmente se tratados de forma incorreta e incompleta (Kaffe *et al.*, 1997;

Simon *et al.*, 2005; Ladeinde *et al.*, 2005). O tratamento geralmente requer a ressecção óssea, o que evita a recidiva (Barker, 1999).

Boson *et al.* (1998), após o estudo do gene  $Gs\alpha$  em 23 mixomas odontogênicos, concluíram que esse gene não está associado à tumorigênese dos mixomas odontogênicos.

Bast, Pogrel e Regezi (2003) avaliaram a expressão das proteínas apoptóticas Bcl-2, Bcl-XL, Bak, Bax e Ki-67 e das metaloproteinases MMP-2, MMP-3 e MMP-9 em mixomas odontogênicos. Os autores concluíram que as células do tumor odontogênico não mostraram aumento na sua divisão. Menos de 1% dos tumores e das células-controle foram positivas para o Ki-67. As células dos mixomas mostraram um aumento das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2 e Bcl-X) e da metaloproteinases MMP-2. O estudo sugeriu que os mixomas odontogênicos utilizavam a produção de proteínas anti-apoptóticas e a secreção de metaloproteinases da matriz como mecanismos para a sua progressão.

Os mixomas cardíacos, os da epiderme e de outros locais não são substancialmente diferentes, do ponto de vista histológico, dos mixomas odontogênicos. As mesmas células fusiformes aparecem em um estroma de material mixóide (Acebo *et al.*, 2003). Assim como os odontogênicos, os outros mixomas ocorrem de forma esporádica, não são neoplasias metastáticas, não apresentam predileção por sexo e tendem a recidivar quando tratados incorretamente (Amaro *et al.*, 2003). Segundo Altundag (2005), os mixomas cardíacos são os tumores benignos mais comuns do coração. Noventa e três por cento dos casos são esporádicos e, geralmente, ocorrem em mulheres com mais de 30 anos.

Os mixomas cardíacos originam-se dos remanescentes das células de reserva da formação vascular subendocardial, ou das células mesenquimais multipotentes primitivas ao redor do endocárdio, que diferenciam-se em uma variedade de células como: células epiteliais, hematopoiéticas e musculares (Reynen, 1995; Blondeau, 1990).

Casos de mixoma cardíaco, na sua maioria, são descobertos acidentalmente pelo exame de ecocardiografia. Entretanto, muitos pacientes apresentam sintomas associados com a liberação de IL-6, obstrução intra-cardíaca do fluxo sanguíneo e embolia (Centofanti *et al.*, 1999). De acordo com a literatura, os mixomas cardíacos são neoplasias benignas de crescimento lento e a existência de sua contraparte maligna é controversa. Todavia, existem relatos de recorrência e de metástase após a excisão cirúrgica (Yoon & Roberts, 2002).

Apesar da etiologia do mixoma odontogênico ainda ser desconhecida, a causa de outros tipos não odontogênicos, como o cardíaco, o muscular e o de epiderme têm sido relacionada a mutações na subunidade regulatória R1- $\alpha$  da PKA. Mutações no gene *PRKAR1A* não foram ainda relatadas em mixomas esporádicos, somente nos associados ao Complexo de Carney: uma síndrome com uma variedade de neoplasias endócrinas ou não, pigmentação na pele e vários tipos de mixomas (Carney *et al.*, 1986; Dijkhuizen *et al.*, 2001; Fogt *et al.*, 2002) causada também por mutações germinativas na *PRKAR1A* (Kirschner *et al.*, 2000a; Kirschner *et al.*, 2000b).

### 1.3 AMELOBLASTINA (AMBN)

As proteínas da matriz do esmalte, sintetizadas pelos ameloblastos, podem ser classificadas em dois grandes grupos; a das amelogeninas, que correspondem a aproximadamente 90% da matriz e a das proteínas não amelogeninas, incluindo-se a ameloblastina (AMBN), enamulina e tuftelina, sialoproteína óssea, MMP-20 (enamelsina) entre outras (Smith, 1998).

A AMBN é uma das proteínas não amelogeninas mais importantes e abundantes presentes no esmalte, constituindo 8 a 10% da matriz (Fong *et al.* 1996; Krebsbach *et al.*, 1996). Tem peso molecular de 62Kda e parece ser secretada pela face não secretora do processo de Tomes (Uchida *et al.*, 1997).

A AMBN recebe o nome de amelina em camundongos e de bainhelina em suínos. Apesar dos diferentes nomes, essas proteínas mantêm seus domínios conservados, sendo semelhantes, senão idênticas (Cerney *et al.*, 1996; Hu *et al.*, 1997). O gene da *AMBN* localiza-se no cromossoma 4q21, contém 13 exons, que codificam 447 aminoácidos (Toyosawa *et al.*, 2000). Existem duas variantes possíveis, em humanos, para esse gene; uma com uma janela de leitura de 1341pb e uma isoforma com uma deleção de 36pb no exon 6 (GenBank AF209780).

As proteínas do esmalte têm um papel significativo na amelogenese, como início da calcificação e no controle do crescimento dos cristais do esmalte (Doi *et al.*, 1984; Aoba *et al.*, 1987; Fincham *et al.*, 1991).

Autores como MacDougall *et al.* (1997) e Mardh *et al.* (2001) sugeriram que o gene da *AMBN* poderia estar relacionado com a amelogênese imperfeita, mas nenhuma mutação nesse gene, em humanos, foi encontrada. Outros genes como a enamulina, amelogenina, enamelsina e kalikreina, que também codificam proteínas do esmalte, já foram relacionados à amelogênese imperfeita. As mutações nesses

genes possivelmente sejam a causa da doença (Lagerstrom *et al.*, 1991 e 1995; Aldred *et al.*, 1992; Lench e Winter, 1995; Collier *et al.*, 1997 e Rajpar *et al.*, 2001; Hart *et al.*, 2004).

Recentemente, Paine *et al.* (2003) comprovaram que a super expressão de AMBN em camundongos transgênicos causou o aparecimento de amelogenese imperfeita, sugerindo a importância da AMBN na formação do esmalte.

Apesar da função da AMBN ainda não ser conhecida, provavelmente ela esteja envolvida na formação do esmalte interprismático e sinalização celular epitélio-mesênquima. Essa proteína é considerada um importante marcador de diferenciação dos ameloblastos, agindo de forma específica nos estágios precoces e tardios de citodiferenciação (Cerny *et al.*, 1996; Begue-Kim *et al.*, 1998; Toyosawa *et al.*, 2000).

Altos níveis de expressão de AMBN ocorrem no estágio secretor e diminui na maturação. A AMBN também é expressa de forma transitória na matriz dentinária e nas células epiteliais da bainha de Hertwig, mas seu papel na formação da dentina e cemento ainda não foi esclarecido (Fong *et al.* 1996; Bosshardt e Nanci, 1998; Simmons *et al.* 1998).

A imunolocalização das proteínas do esmalte foram estudadas em tumores odontogênicos, por Yagishita *et al.* (2001). Esses autores mostraram que o epitélio odontogênico em fibromas ameloblásticos participa da formação dos tecidos duros presentes durante o seu desenvolvimento.

Kumamoto *et al.* (2001) avaliaram a marcação da proteína amelogenina em: 33 ameloblastomas, três tumores odontogênicos epiteliais calcificantes, dois tumores odontogênicos de células claras e cinco ameloblastomas malignos. Os autores observaram que houve marcação da amelogenina presente em todos os

tumores odontogênicos epiteliais, sugerindo que os tumores odontogênicos apresentam diferenciação ameloblástica e propriedades epiteliais odontogênicas.

Fukumoto *et al.* (2004) mostraram que a AMBN é uma molécula de adesão celular essencial na amelogênese e tem um importante papel nos estágios de secreção e na diferenciação dos ameloblastos, unindo-os e iniciando sua proliferação. Os autores utilizaram camundongos mutantes e nulos para a AMBN; verificaram que os mutantes apresentaram várias anomalias dentárias incluindo-se a falta de esmalte. Nos camundongos nulos e mutantes, o epitélio dental diferenciou-se em ameloblastos secretores de esmalte, mas as células se soltaram da superfície da matriz e perderam sua polaridade. Nesse estudo, os autores concluíram que AMBN é uma molécula de adesão chave para a formação do esmalte e sugeriram que ela desenvolve um papel importante na manutenção do fenótipo diferenciado dos ameloblastos secretores.

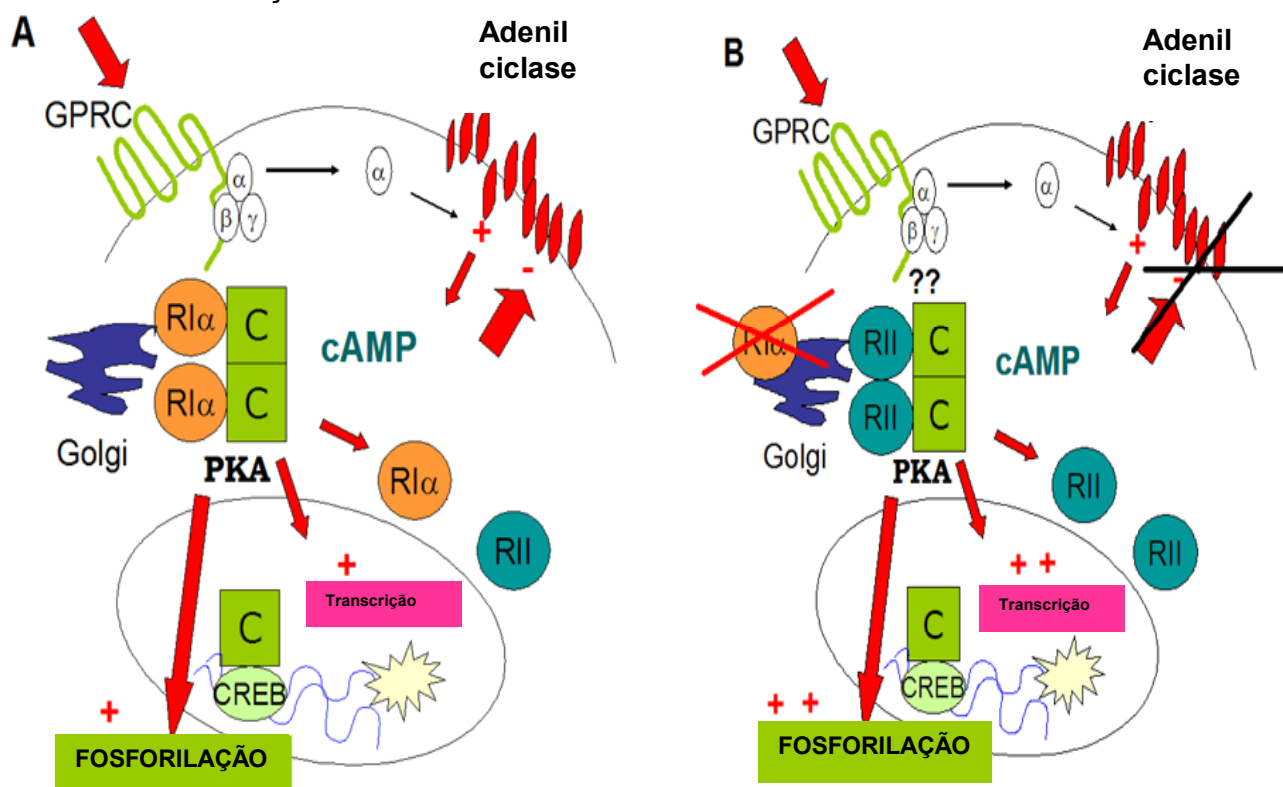
#### **1.4 SUBUNIDADE REGULADORA R1- $\alpha$ DA PROTEÍNA QUINASE A (PRKAR1A)**

O gene *PRKAR1A* codifica a subunidade regulatória 1 alfa (R1- $\alpha$ ) da proteína quinase A (PKA), que é o principal mediador da sinalização de AMPc (monofosfato de adenosina cíclico) em mamíferos (Scott, 1991). A PKA é uma proteína tetrâmica e constitui-se de dois dímeros: um composto de subunidades regulatórias; o outro de duas subunidades catalíticas inativas. Quando duas moléculas de AMPc se ligam nas subunidades regulatórias, ocorrem a dissociação e a liberação das duas subunidades catalíticas. As subunidades catalíticas dissociadas são enzimaticamente ativas e fosforilam o fator transcricional CREB no seu resíduo serina. O CREB é uma proteína ligadora de uma seqüência de

nucleotídeos dos genes responsivos ao AMPc. Após a ativação do CREB pela fosforilação, eles se dimerizam e ligam-se ao DNA, estimulando, assim, a transcrição dos genes que são responsivos ao AMPc (Tasken *et al.*, 1993) (Fig 1).

FIGURA 1

Sinalização da via AMPc/PRKAR1A. (A) Após a ativação dos receptores ligados à proteína  $G_{s\alpha}$ , ocorre aumento dos níveis de AMPc e ativação da PKA pelo AMPc. Após a ativação da PKA ocorre dissociação das subunidades regulatórias e catalíticas, que se difundem para o núcleo. As subunidades catalíticas dissociadas fosforilam o fator transcricional CREB no seu resíduo serina. O CREB é uma proteína ligadora de uma seqüência de nucleotídeos dos genes responsivos ao AMPc. Após a ativação do CREB pela fosforilação, eles se dimerizam e ligam-se ao DNA, estimulando, assim, a transcrição dos genes que são responsivos ao AMPc. (B) Quando ocorre mutação no PRKAR1A, provavelmente uma outra subunidade reguladora tenta fazer o papel da R1- $\alpha$ . Mas a via só é regulada pela R1- $\alpha$ , sendo assim ocorre um aumento da transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular e perda do controle dessa transcrição, devido a ausência da R1- $\alpha$ , que controla a liberação de AMPc.



A sinalização da PKA é essencial na diferenciação do mesoderma e ectoderma embrionários e interage com uma série de outros caminhos na morfogênese inicial (Amieux *et al.*, 2002; Bossis *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2004).

Existem quatro genes codificadores das diferentes subunidades regulatórias (R1- $\alpha$ , R1- $\beta$ , R2- $\alpha$ , R2- $\beta$ ) e três que codificam as subunidades catalíticas (C $\alpha$ , C $\beta$ , C $\gamma$ ) (Foss *et al.*, 1994). Os quatro tipos de subunidades regulatórias apresentam diferentes padrões de expressão em mamíferos. Enquanto R1- $\alpha$  tem uma ampla distribuição, R1- $\beta$  se expressa primariamente no cérebro, testículos e linfócitos T e B (Clegg *et al.*, 1998; Scott, 1991). Similarmente, a subunidade R2- $\alpha$  também tem uma ampla distribuição nos tecidos, enquanto R2- $\beta$  se expressa no tecido cerebral, adipócitos e em alguns tecidos endócrinos (Skalhegg e Tasken, 1997).

As subunidades regulatórias são responsáveis por duas das principais isoformas de PKA, PKA tipo 1 e PKA tipo 2. Cada isoforma compõe-se de duas subunidades regulatórias e duas catalíticas. A PKA tipo 1 pode conter a subunidade R1- $\alpha$  ou R1- $\beta$  na sua estrutura, enquanto a PKA tipo 2 se forma pelas subunidades R2- $\alpha$  ou R2- $\beta$  (McKnight *et al.*, 1998; Scott, 1991; Tasken *et al.*, 1997).

As diferentes isoformas das subunidades regulatórias desempenham papéis específicos. A R1- $\alpha$  se envolve no controle da proliferação celular e transformação neoplásica. Ela também desempenha um importante papel na transição da fase G1 para S do ciclo celular (Sewing e Muller, 1994; Tortora *et al.*, 1997). As subunidades R2- $\alpha$  e  $\beta$  participam principalmente do controle da diferenciação, crescimento e indução da apoptose (Cho-Chung *et al.*, 1995). A superexpressão de R1- $\alpha$  tem sido freqüentemente detectada nas células cancerosas (Ciardiello e Tortora, 1998).

A subunidade R1- $\alpha$  é a principal reguladora da PKA dependente de AMPc, quando a via R1- $\alpha$  da PKA ativa-se leva a inibição da proliferação de várias linhagens celulares (Cho Chung *et al.*, 1999).

O aumento da expressão da subunidade R1- $\alpha$  foi demonstrado em vários carcinomas humanos, incluindo o retinoblastoma, carcinoma renal, câncer de mama e vários tumores de ovário (McDaid *et al.*, 1999).

Para que ocorra o controle da proliferação celular várias proteínas da via AMPc/PKA fosforilam o sítio tirosina quinase Src ativando Rap1 e bloqueando a ativação de Raf-1, através do Ras, consequentemente, inibindo a mitose. A PKA também induz apoptose em células B CD+ quando induzida pela forquolina; a ativação da PKA diminui a expressão de Mcl-1, uma anti-apoptótica proteína da família do Bcl (Myklebust *et al.*, 1999).

O presente estudo investigou a relação dos genes *AMBN* e *PRKAR1A* com a etiopatogênese das neoplasias odontogênicas. Essas neoplasias apresentam comportamento clínico diferente entre si, algumas ocorrem com elevada frequência na cavidade bucal e outras não parecem neoplasias verdadeiras. Devido a essas características e a etiopatogênese incerta, nós estudamos genes que poderiam estar envolvidos na tumorigênese desses tumores. Nossos resultados mostraram que o gene da *AMBN* estava alterado em seis dos oito tumores odontogênicos epiteliais estudados. Por sua vez, o gene *PRKAR1A* apresentou mutações em dois casos de mixomas odontogênicos e uma diminuição da imunolocalização da proteína PRKAR1A. Através de nossos resultados concluímos que esses genes poderiam estar relacionados com a patogênese dos tumores odontogênicos, favorecendo outros estudos que poderam explicar mais sobre o mecanismo dessas neoplasias.

## ***2 - OBJETIVOS***

## OBJETIVOS

1. Investigar alterações no gene da *AMBN* em tumores odontogênicos epiteliais;
2. Investigar alterações no gene da *PRKAR1A* em mixomas odontogênicos;
3. Avaliar a imunolocalização das subunidades R1- $\alpha$ , R2- $\alpha$ , R1- $\beta$  da PKA em mixomas odontogênicos.

# ***3 - MATERIAIS E MÉTODOS***

### 3.1 COLETA DAS AMOSTRAS

No estudo utilizaram-se amostras de tumores odontogênicos congeladas a -70°C e blocos de parafina de mixomas odontogênicos dos arquivos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da FO-UFMG. Parte do material colhido durante o procedimento cirúrgico foi enviado para diagnóstico histopatológico e parte foi congelada. Todos os casos estudados tinham o diagnóstico histológico confirmado pelo laboratório. Estavam disponíveis para o estudo molecular as seguintes amostras congeladas: quatro casos de ameloblastoma; um caso de tumor odontogênico adenomatóide; dois de cisto odontogênico calcificante; um tumor odontogênico escamoso; dois mixomas odontogênicos. Para o estudo imunohistoquímico, foram utilizados dezessete casos de mixomas odontogênicos em blocos de parafina.

Como controle do estudo molecular, coletou-se o DNA da mucosa bucal contralateral dos próprios pacientes com os tumores. Para o controle das reações de imunohistoquímica, utilizaram-se folículos pericoronários e mixomas não odontogênicos também contidos em blocos de parafina.

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG-COEP, aprovou o projeto de pesquisa sob o número ETIC 301/04.

## 3.2 ESTUDO MOLECULAR

### 3.2.1 Extração de DNA

Extraíu-se o DNA genômico a partir das células tumorais microdissecadas e da mucosa contralateral dos pacientes, adaptando-se o método descrito por Boom *et al.* (1990).

Os tumores congelados foram cortados em fatias de 10 $\mu$ m no aparelho criostato. Em seguida, os cortes foram corados pelo azul de toluidina, uma substância que não interfere na estrutura do DNA (Ehrig *et al.*, 2001). Após a coloração, os cortes eram lavados com água destilada e visualizados em um aumento de 100X no microscópio óptico. Os melhores cortes foram selecionados e submetidos à microdissecção, removendo-se o maior número de células epiteliais tumorais. A microdissecção foi realizada com um material cortante do tipo holeback número 3 estéril, e as células foram colocadas em tubo tipo *ependorf* contendo solução de lise, que rompe a célula e expõe o DNA.

Seguindo o método de Boom *et al.* (1990), 900  $\mu$ l de tampão de lise e 40  $\mu$ l de suspensão de sílica foram misturados às células tumorais. Após a lise das células e exposição do material nuclear, o DNA se liga à sílica. Consecutivas lavagens com tampões de lavagem, etanol a 70% e acetona foram realizadas, para remover todos os componentes celulares, deixando-se somente o DNA aderido à sílica. Descartou-se todo o sobrenadante e secou-se a sílica em banho de areia a 56°C, por 3 a 5 minutos. Para ressuspender o DNA adicionou-se 150 a 200  $\mu$ l de tampão TE (Tris pH 7,4 10mM + EDTA pH 8,0 0,1mM + 100mL de H<sub>2</sub>O) ao complexo DNA-sílica, que ficou incubado 18 horas no banho de areia.

Após 18 horas, centrifugou-se a solução formada pela sílica, TE e DNA em uma velocidade de 1500 x g por 2 minutos, e o sobrenadante contendo DNA foi transferido para outro tubo de eppendorf. O DNA extraído foi utilizado nas reações de amplificação dos exons dos genes estudados pela técnica da PCR.

### 3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

O DNA extraído foi utilizado para amplificar os exons do gene *AMBN* e *PRKAR1A*, pela PCR. Os *primers* empregados para o estudo do gene *AMBN* foram os desenhados por nós (tabela 1). Para o estudo do gene *PRKAR1A*, os *primers* citados por Kirschner *et al.* (2000)(tabela 2).

A técnica de PCR consiste na replicação “*in vitro*” de fragmentos específicos de DNA pela enzima *Thermus aquaticus* (*Taq*) DNA polimerase (Saiki *et al.*, 1988). A amplificação pela PCR envolve ciclos repetidos de desnaturação do DNA de 95°C a 97°C, anelamento dos primers ou iniciadores às suas seqüências complementares e extensão da fita de DNA pela *Taq* DNA polimerase. A cada ciclo a quantidade de DNA sintetizada é duplicada, resultando em um acúmulo exponencial ( $2^n$ ) de fragmentos amplificados, em que n representa o número de ciclos (Saiki *et al.*, 1988).

Amplificou-se o DNA em um volume final de 50 µl de reação contendo: 200 µM de dNTPs; 10 picomoles dos iniciadores de cada fita de DNA; 0,5U de *Taq* DNA polimerase; 10% do volume final de tampão de incubação 10X concentrado; 5 µl de DNA. Para cada reação, fez-se um controle negativo, que contém todos os componentes da reação menos o DNA. Esse controle indicou que o material

amplificado era proveniente da amostra do DNA dos tumores odontogênicos e não de um DNA contaminante, dando confiabilidade à reação.

TABELA 1

Número dos exons do gene da *AMBN*, iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento

EXONS	INICIADORES (sequencias 5'- 3')	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)
1	F: ATCTTGGTTGGCATCATCAG R: TTCAGCTACTGGTGACATGAAG	56
2	F: TGATTTCCATGTGTTTCCTGTA R: CTAAAGACTGACTTACCGGCAC	56
3	F: TTTCATTCAGTTCTTTCCCTCAGC R: CTAGGAAAAGTGAAGCACACG	60
4	F: AGCATATGCGATAAACAGTAACC R: TTAAGTCTGGTCTTCCAATCTTTG	56
5	F: TTTAGTATTCTAGATACGGCTTTGG R: GAAGGCAAGTAAGAAGAGGTTTT	56
6	F: ACCTTGTTTAATGAGCCATCC R: AAGGAAGTACCTCAGGCTTTG	58
7-8	F: CATTGCAAAGTCTTGGGTCATA R: GACCTTGTGGATCAGGAAAATC	59
9	F: TAATATAGCTCCCAGGATTGGAT R: AGATTGTTTATTTTGTGGCATTG	58
10	F: GGGATGTGCCTGTGAGAATTA R: AAGGCACGTACAACATTCCTG	57
11	F: CCACATCTCTGTTTGCAATTTAC R: GTCTGGCCAAGATTATCCAAATA	57
12	F: AAGGAGGCAAAGTCTATTTGG R: GTCTCTTGCAGCCAGTCATAAG	59
13 a	F: ATGGCATCTTTGACGAATGT R: ATCCTTAGGGAGAGCAAGGA	58
13 b	F: GAAGAAGGAGGTGCACAAGG R: CTTAGAGCTGTCAGGGCTCTTG	58

Perdigão *et al.* (2004).

TABELA 2

Números dos exons do gene *PRKAR1A*, iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento

EXONS	INICIADORES (sequencias 5' - 3')	TEMPERATURA DE ANELAMENTO (°C)
<b>1A</b>	F: AGTCGCCACCTGTCATCT R: CACTTCTCCTTTCCGCAGTC	58
<b>1B</b>	F: CATTGACGTCAGTAGCCGAA R: ATCTTGGATCGGTCCAGCTC	58
<b>2</b>	F: CCTAGTCCCCACTTCCCTGT R: ATCACCTCATCTCCCA	58
<b>3</b>	F: CATGCCGAAGGATCTCATTT R: ATGGATGAAGTTCCACCCTG	58
<b>4A</b>	F: CAGGTTGCAAACGTGAAATG R: CTGCGATAAAGGAGACCGAA	58
<b>4B</b>	F: AGCCAAAGCCATTGAAAAGA R: GCCTCCTCTCCCGTAACAAT	58
<b>5</b>	F: TTGCTTGATTTTCTTTCCCC R: ATTCTTATTGCTCGGAAGCG	58
<b>6</b>	F: TCATTTAACTCGTCAGAAATCACC R: TTCTAAATCACACTCTCAAACACCA	58
<b>7</b>	F: GGCATAATATTGGCGGAAAA R: AAGGCTTTTCCCAAGGTCCAT	58
<b>8</b>	F: AGAATGTTGAATGGGCATGG R: TTAGCCCCTCTTTCCCTCTT	58
<b>9</b>	F: CACCCTGGGTTTGAGAGTGT R: TTCCCTCTCAGAGCCAAAAA	58
<b>10</b>	F: CCCATCTTTGCTTTCTCCAG R: AACAGACAGGAAGCTGCGAT	58

Kirschner *et al.* (2000)

### **3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida (PAGE) e coloração pelo nitrato de prata**

A verificação do material amplificado foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5%. Sob a ação desse campo elétrico é possível a migração dos fragmentos de DNA do pólo negativo para o positivo. O padrão de peso molecular usado foi o 100pb DNA ladder (Gibco BRL), que demarcou a faixa de 100-1600pb, para verificação do tamanho dos fragmentos de DNA amplificados.

Realizou-se a coloração do gel de poliacrilamida por nitrato de prata, que possui grande afinidade com os ácidos nucléicos. Posteriormente, o gel foi reduzido por uma solução reveladora a base de carbonato de sódio. A coloração resultante variou do amarelo escuro ao preto.

Cada amostra dos genes amplificados deveria apresentar apenas uma banda correspondente ao fragmento amplificado. Somente o controle negativo não apresentou bandas.

### **3.2.4 Purificação**

Todos os produtos de PCR que apresentavam bandas inespecíficas, após a revelação do gel de poliacrilamida, foram submetidos à purificação pela coluna. O Kit GFX de purificação (GFX PCR and Gel Band Purification Kit da Amersham Biosciences) se compõe de uma coluna contendo fibra de vidro, tubos de eppendorf, solução para capturar o DNA e solução de lavagem do DNA. Utilizou-se o protocolo indicado pelo fabricante, que é de fácil realização.

Após a purificação, realizou-se a eletroforese, coloração e revelação do produto, para a verificação da sua pureza. Todos os produtos purificados apresentaram uma única banda com o tamanho esperado.

### 3.2.5 Seqüenciamento

Os produtos amplificados de cada exon dos genes estudados foram seqüenciados, pelo método enzimático.

O Kit Big Dye Terminator foi empregado para as reações de seqüenciamento. Cada reação continha 20 µl de uma mistura preparada com todos os desoxinucleotídeos (dATP, dCTP, dTTP, dGTP) e dideoxinucleotídeos (ddATP, ddTTP, ddCTP, ddGTP); DNA purificado (100-150 ng); tampão de seqüenciamento 2,5X concentrado e um dos iniciadores com concentração de 3,2 pM. Os 20 µl de reação foram colocados em um termociclador para amplificação de somente uma das fitas de DNA.

Os dideoxinucleotídeos são análogos aos dNTPs normais. Diferem apenas pelo fato de não possuírem um grupamento hidroxila no carbono 3' e 2'. Uma vez que o ddNTP não possui grupamento hidroxila no carbono 3', qualquer ddNTP incorporado à cadeia de DNA crescente não pode participar de uma ligação fosfodiéster com o seu átomo de carbono 3'; por isso há uma interrupção abrupta na síntese da cadeia. A terminação da cadeia ocorre de forma aleatória em qualquer base e em qualquer fita de DNA crescente. Dessa forma o DNA fica fragmentado, e cada fragmento termina com um ddNTPs. Os ddNTPs são marcados por uma substância fluorescente, permitindo que o aparelho de seqüenciamento faça a leitura dos fragmentos marcados. A leitura realizada pelo seqüenciador foi formatada pelo

computador na forma de um cromatograma, o eletroferograma. A partir desse eletroferograma pode-se fazer a leitura da fita de DNA complementar, verificando-se as possíveis alterações nos genes estudados.

### 3.3 IMUNOISTOQUÍMICA

A imunolocalização das subunidades reguladoras da PKA (proteína quinase A) foi realizada pelo método de diâmino benzidina, usando-se um módulo automático de imunistoquímica (NexES, Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ). As amostras incluídas em parafina foram submetidas a cortes de 5  $\mu\text{m}$  e estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram desparafinizados em xilol por 30 minutos; hidratados em cadeia decrescente de etanol por 2 minutos em cada banho; depois embebidos em uma solução de 0.01M de PBS (solução tampão de fosfato) por 10 minutos. Fez-se a reativação antigênica utilizando 10 mM de tampão citrato de sódio pH 6.0 por 30 minutos em um steamer. Após esse tempo, os cortes foram colocados no módulo automático NexES para a imunistoquímica, usando-se o protocolo padronizado. Os cortes foram seqüencialmente incubados com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti subunidades reguladoras R1- $\alpha$ , R2- $\alpha$ , R2- $\beta$  e subunidade catalítica C $\alpha$  e C $\beta$  (EMD Biosciences, San Diego, CA). O anticorpo R1- $\alpha$ , foi diluído 1:100 em 0.01M PBS/ 1% BSA (albumina sérica bovina) por 32 minutos à temperatura ambiente. Após a incubação, os cortes foram lavados em solução PBS 0.01M, e incubados com anticorpo secundário biotinilado de coelho anti-camundongo (Vector Laboratories, Burlingame, CA) diluído 1:100 em 0.01M PBS for 32 minutos, também à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram incubados com peroxidase-estreptovidina conjugada (Vector Laboratories,

Burlingame, CA) por 8 minutos, depois lavados em 0.01M PBS e finalmente incubados com 3,3'-diaminobenzidina/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (DAB; Sigma, Germany) por 8 minutos. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer e montados com Permount.

Para controle da imunistoquímica dos mixomas odontogênicos, com e sem seqüência conhecida, foram utilizados folículos pericoronários, mixomas faríngeanos e cardíacos de pacientes sem Complexo de Carney, portanto, com seqüência normal para *PRKAR1A*. Esses controles já foram usados em outros estudos como controle positivo dos casos com mutações do gene *PRKAR1A*. Dois pesquisadores e experientes com o tipo de marcação e que não tiveram acesso aos dados moleculares avaliaram os cortes. Quatro padrões de marcação foram registrados:

- 0 - Sem marcação;
- 1- Marcação fraca;
- 2 - Marcação moderada;
- 3 - Marcação forte.

A marcação registrada como três foi à mesma encontrada nos folículos pericoronários e nos mixomas não odontogênicos com seqüência selvagem para *PRKAR1A*.

### 3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para comparar a intensidade das marcações entre as subunidades da PKA, aplicou-se o teste estatístico de Fischer, usando-se o software *Statistica package* (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK).

## ***4 - RESULTADOS***

#### 4.1 Análise molecular do gene da *AMBN* em tumores odontogênicos epiteliais

As bandas visualizadas no gel de poliacrilamida dos produtos de PCR amplificados das células tumorais, corresponderam em tamanho à aquelas das células colhidas da mucosa bucal contralateral dos pacientes com tumor, indicando não haver deleções ou inserções aberrantes no DNA estudado.

As sequências analisadas demonstraram que o gene *AMBN* estava alterado em seis dos oito tumores estudados (tabela 3). Todas as mutações foram somáticas na sua origem, pois as células controle colhidas da mucosa bucal normal dos pacientes foram negativas para as mutações.

Um dos ameloblastomas unicístico (caso #1, figura 2A) apresentou uma transversão no exon 6 (C112A)(figura 3A) levando a uma troca do aminoácido prolina por uma glutamina (P81Q) em uma região de fosforilação PPLPSQPSL. O outro ameloblastoma unicístico, caso #2, também apresentou uma transversão heterozigota no exon 5 (T148>G)(figura 3B) no sítio de fosforilação KSFNSLWMH, causando a troca do aminoácido metionina para arginina (M76R).

Ambos os ameloblastomas sólidos tinham mutações. O ameloblastoma sólido #3 (tabela 3)(figura 2B) apresentou mutação na região de *splice* entre o intron 11 e exon 11 (IVS11-3T>A, T604A)(figura 3C). O outro ameloblastoma (# 4) apresentou mutações compostas homozigotas (200C>G) e hetero (C203G), (figura 3D) no exon 4, que causaram a troca do aminoácido leucina por valina (L53V) e de uma glutamina para ácido glutâmico (Q54E) respectivamente.

O tumor odontogênico adenomatóide (figura 2D) exibiu uma transversão (A189T) no exon 5 (figura 3E) causando a mudança do aminoácido arginina para triptofano (R90W).

O tumor odontogênico escamoso (figura 2C) também apresentou, assim como o ameloblastoma sólido #3, uma mutação na região de *splice* entre o intron 11 e exon 11 (IVS11-2A>G; A605G)(figura 3F).

Nenhum dos cistos odontogênicos calcificantes estudados apresentaram mutações no gene da *AMBN*.

Tabela 3

## Mutações encontradas nos tumores odontogênicos epiteliais

Tumor #	Tipo	Mutação	Tipo Histológico
1	Ameloblastoma unicístico	Exon 6; C112A (Heterozigota)	Luminal
2	Ameloblastoma unicístico	Exon 5; T148G (Heterozigota)	Luminal
3	Ameloblastoma sólido	Exon 11; <i>Splicing site</i> IVS11-3T>A, T604A	Folicular
4	Ameloblastoma sólido	Exon 4; C200G (Homozigota) Exon 4; C203G (Heterozigota)	Plexiforme
5	Tumor odontogênico Adenomatóide	Exon 5; A189T (Heterozigota)	-
6	Tumor odontogênico Escamoso	Exon 11; <i>Splicing site</i> IVS11-2A>G; A605G	-
7	Cisto odontogênico Calcificante	Nenhuma mutação	-
8	Cisto odontogênico Calcificante	Nenhuma mutação	-

\* Os nucleotídeos foram numerados de acordo com o banco de genes AH09924

Figura 2

Aspectos histológicos dos tumores odontogênicos epiteliais estudados; (A) Ameloblastoma unicístico; (B) Ameloblastoma sólido; (C) Tumor odontogênico escamoso; (D) tumor odontogênico adenomatóide.

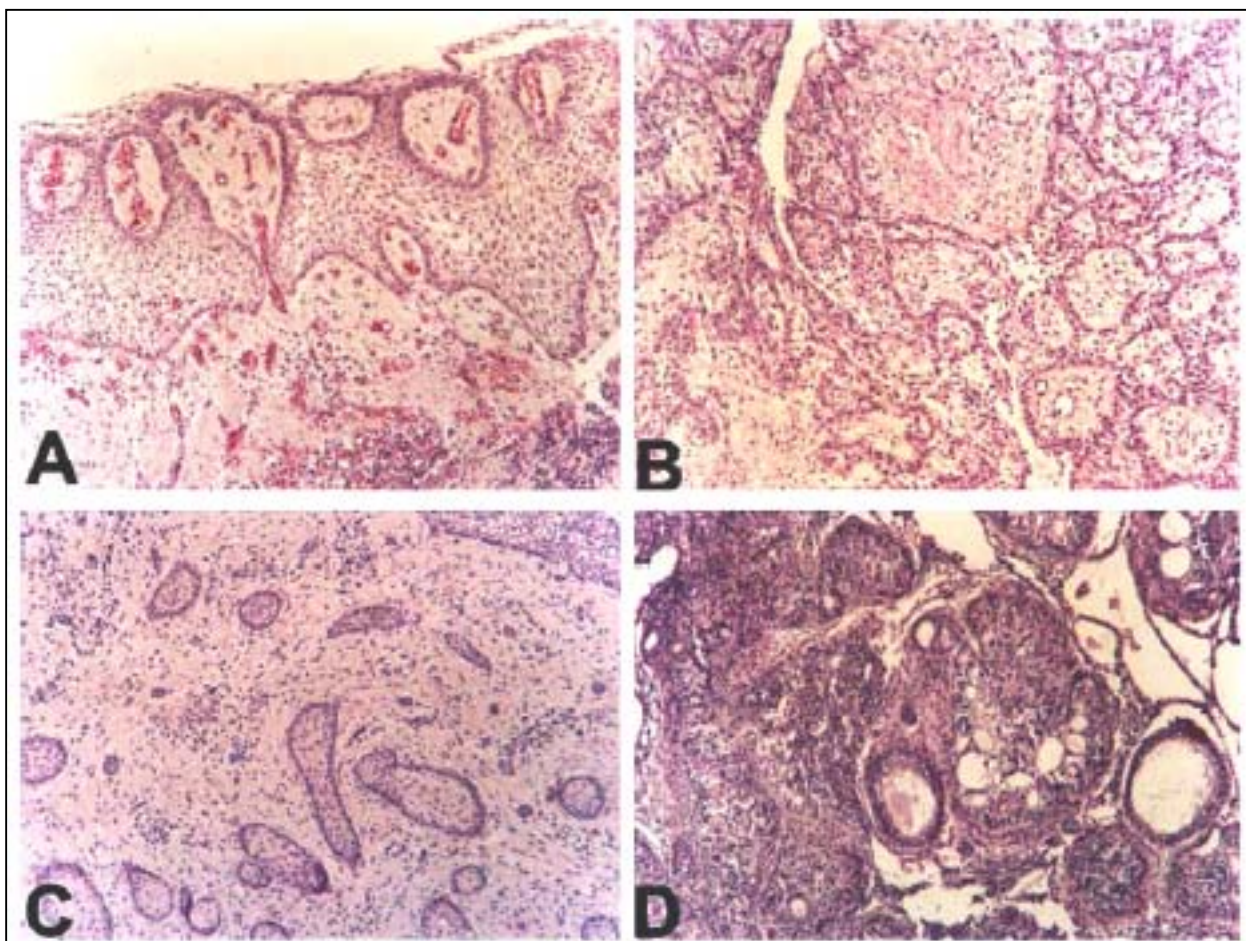
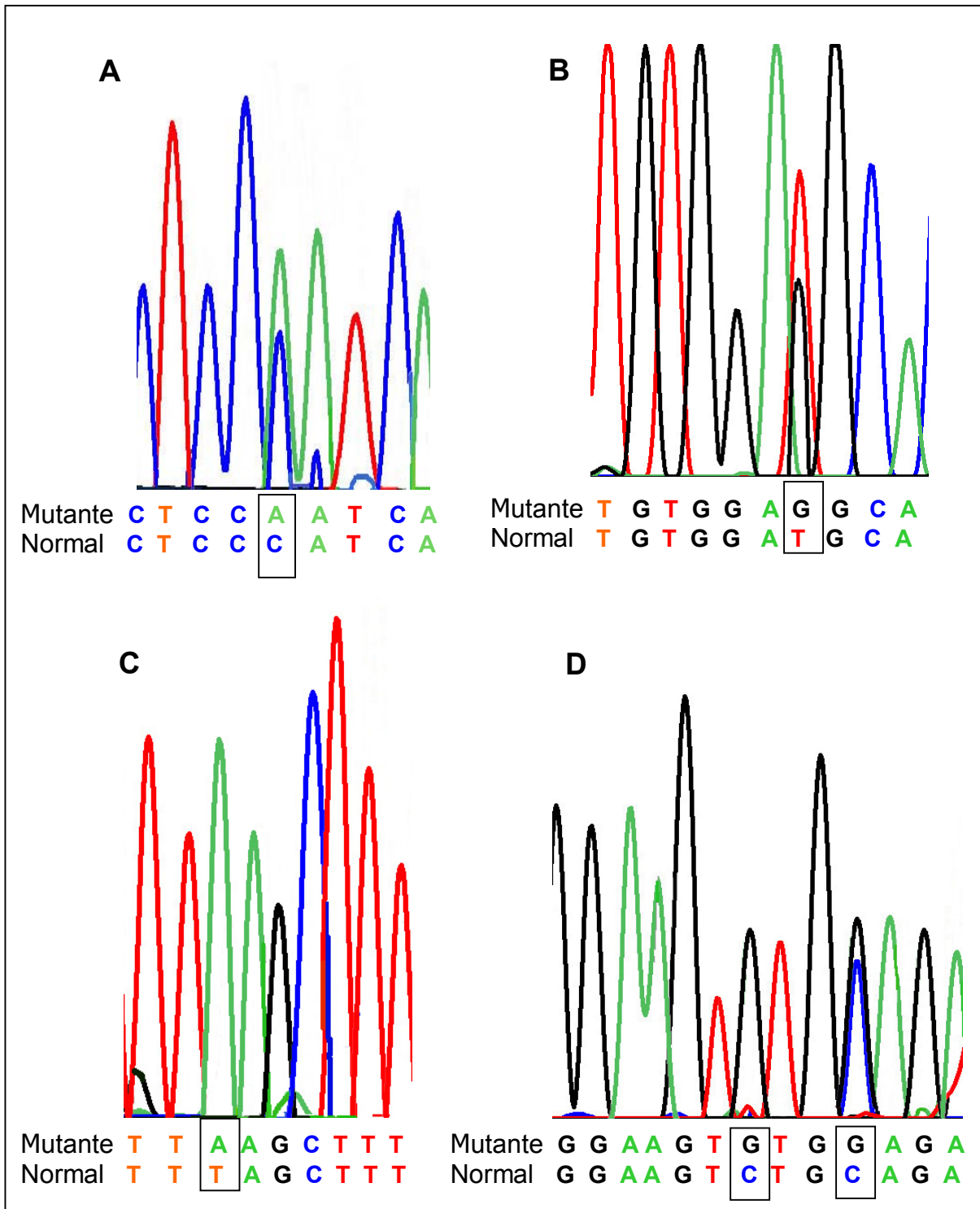
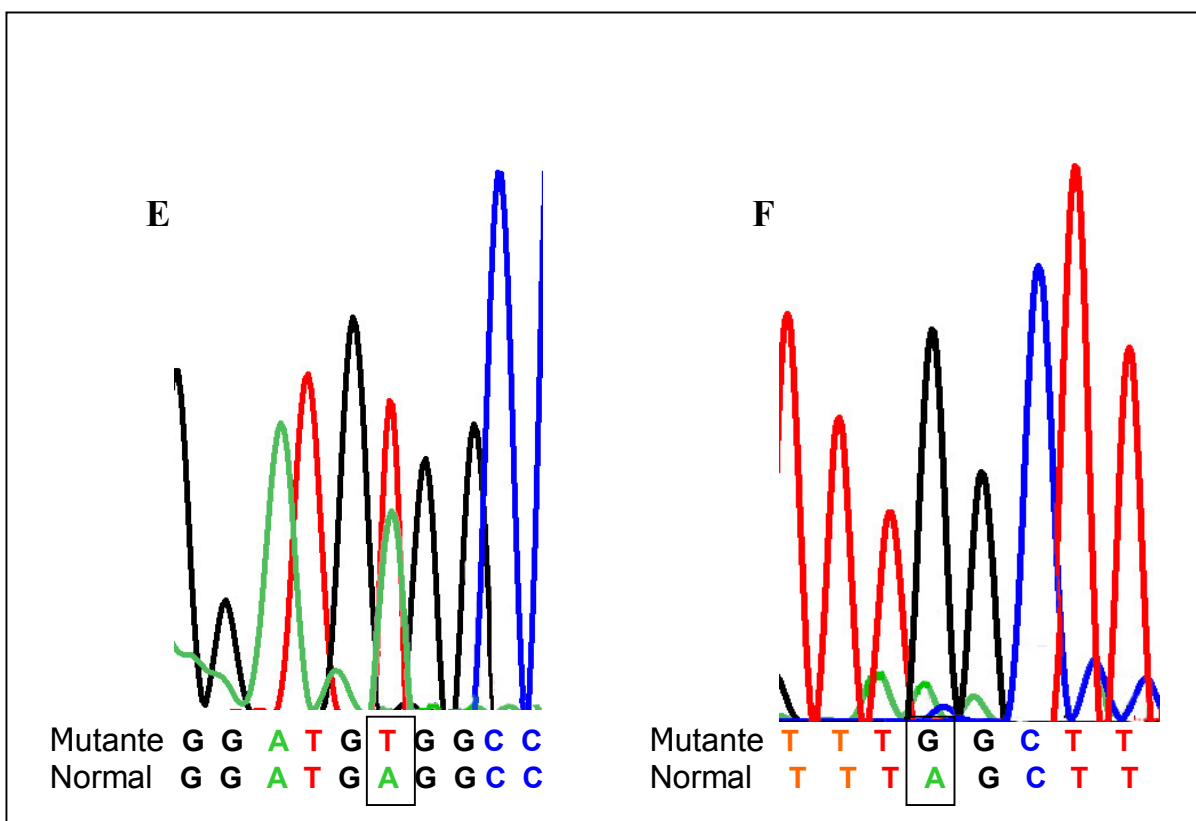


Figura 3

(A) Mutação do gene *AMBN* no ameloblastoma unicístico, caso # 1; (B) Mutação do ameloblastoma unicístico, caso # 2; (C) Mutação do ameloblastoma sólido, caso # 3; (D) mutação composta do ameloblastoma, caso # 4; (E) Mutação no tumor odontogênico adenomatóide, caso # 5; (F) Mutação no tumor odontogênico escamoso, caso #6.





#### 4.2 Análise molecular do gene *PRKAR1A* em mixomas odontogênicos

A análise do DNA foi realizada em duas amostras congeladas de mixoma odontogênico. Esses tumores também estavam disponíveis em blocos de parafina e foram estudados pela técnica de imunohistoquímica. Todas as mutações encontradas eram somáticas, pois as células da mucosa normal contralateral do paciente não apresentaram mutação.

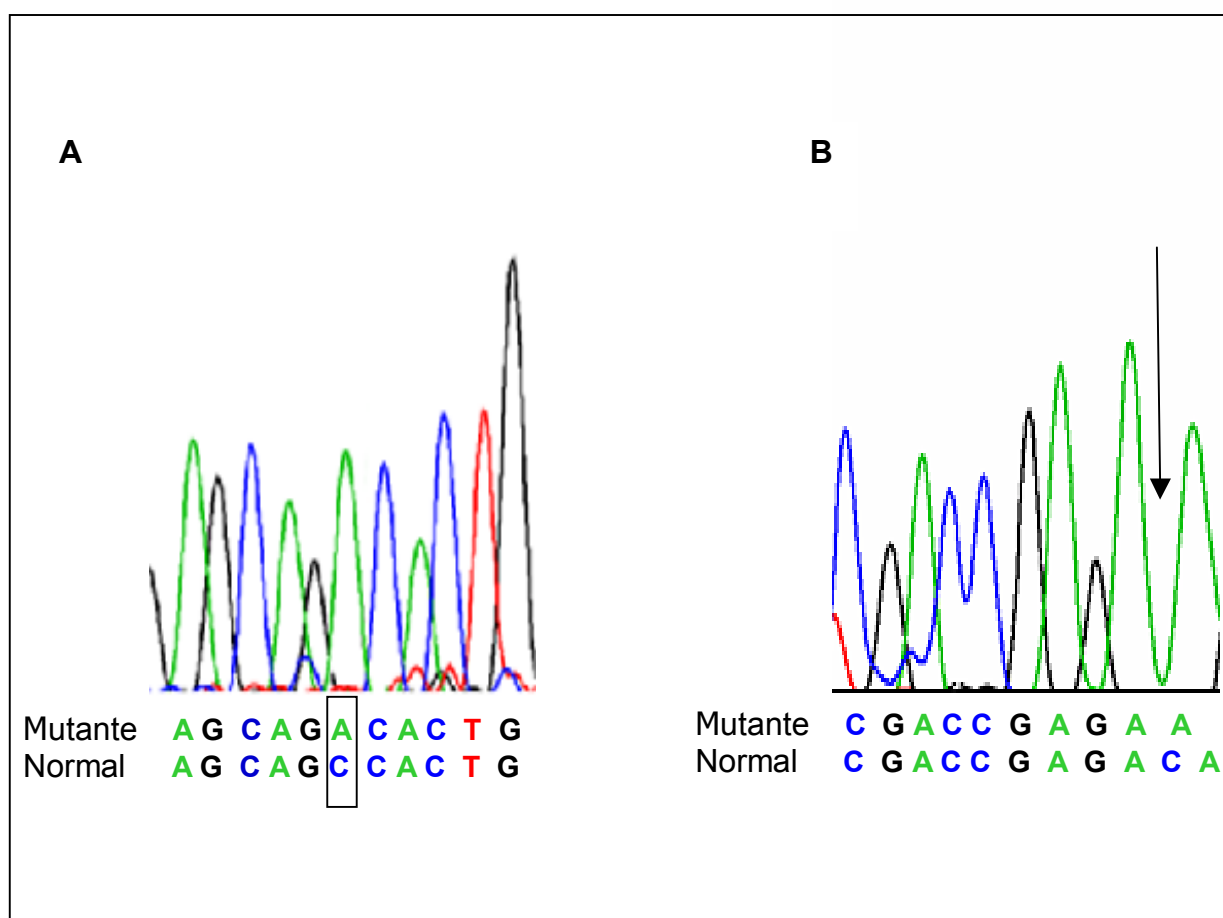
Ambos os tumores apresentaram mutações não previamente descritas, no exon 6. O caso # 6 (tabela 6) apresentou mutação em ponto (C725A)(figura 4A), que levou à troca não conservada de um aminoácido em uma região conservada do gene (A213D). A citosina 725 é altamente conservada não somente entre as

espécies, mas também entre as quatro subunidades do tetramero PKA (tabelas 4 e 5).

O outro tumor, caso # 3, continha uma deleção de um par de bases, (774delC)(figura 4B), causando uma mudança na janela de leitura e códon terminal (TGA) onze aminoácidos após o local da mutação (L240X). Ambos os tumores foram homozigóticos para as respectivas mutações.

Figura 4

Seqüência das duas mutações identificadas. (A) C725>A e (B) 774delC.



\* Os nucleotídeos foram numerados de acordo com o banco de genes M33336

Tabela 4

Conservação da citosina 725 entre as diferentes espécies

Homo Sapiens	GGA	ACA	CCG	AGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
	G	T	P	R	A	A	T	V	K	A	
Pseudogene	GGA	ACA	CCT	AGA	GTA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
Pongo Pygmaeus	GGA	ACA	CCT	AGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
Mus Musculus	GGA	ACA	CCC	AGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
Rattus Norvegicus	GGA	ACA	CCC	AGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
Canis Familiare	GGA	ACA	CCT	AGA	GCA	GCC	ACA	GTC	AAA	GCA	.....
Oryctolagus Cuniculus	GGA	ACA	CCT	CGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
Zebrafish	GGC	ACT	CCT	AGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AGA	GCA	.....
Pan Troglodytes	GGA	ACA	CCT	AGA	GCA	GCC	ACT	GTC	AAA	GCA	.....
Drosophila Melanogaster	GGC	ACT	CCT	CGC	GCC	GCC	ACC	GTG	GCC	GCC	.....
Levedura	AAC	AGC	CCT	CGT	GCT	GCC	ACC	GTT	GTA	GCA	.....

Tabela 5

Conservação do aminoácido alanina na posição 213 entre as diferentes subunidades reguladoras da PKA.

PKA SUBUNIDADES	SEQÜÊNCIA DA PROTEÍNA
PRKARIA (RIa)	G T P R A A T V K A K
PRKARIB (RIb)	G T P R A A T V K A K
PRKARIIA (RIIa)	N T P R A A T I V A T
PRKARIIB (RIIb)	N T P R A A T I T A T

### 4.3 Imunoistoquímica dos mixomas odontogênicos

O diagnóstico dos mixomas odontogênicos foi confirmado em todas as amostras pela coloração de HE e revisado por um patologista da FO-UFMG. As características histológicas típicas de um mixoma, tais como presença de células fusiformes, estreladas e ovais em um estroma mixóide estavam presentes em todas as amostras (figura 5).

Os cortes dos 17 mixomas imunomarcados pela proteína PRKAR1A foram comparados entre os mixomas odontogênicos que apresentaram mutação no gene *PRKAR1A* (figura 6), entre os mixomas sem análise molecular e entre os mixomas não odontogênicos, os quais apresentaram seqüência normal para o gene *PRKAR1A* (figura 8). Para a padronização das marcações encontradas foram consideradas somente as marcações nas células fusiformes, que eram predominantes nos tumores e as marcações da matriz mixóide responsável pelo aspecto mixomatoso dos tumores (Acebo *et al.*, 2003).

Os mixomas odontogênicos mostraram uma diminuição significativa da marcação da subunidade R1- $\alpha$  em relação ao tecido normal. Nove dos dezessete tumores (53%) (tabela 6) não apresentaram marcação e sete mostraram fraca marcação. Nos casos em que houve uma diminuição da imunolocalização da subunidade R1- $\alpha$ , as subunidades R2- $\alpha$  e/ou R2- $\beta$  estavam aumentadas ( $p < 0,05$ ) (figura 7) e (tabela 6).

Não houve nenhuma mudança significativa na marcação das subunidades catalíticas (C $\alpha$  e C $\beta$ ) ( $p < 0,1$ ).

Figura 5

Aspectos histológicos do mixoma odontogênico, mostrando as características típicas: presença de células fusiformes, estreladas e ovais em um estroma mixóide frouxo.

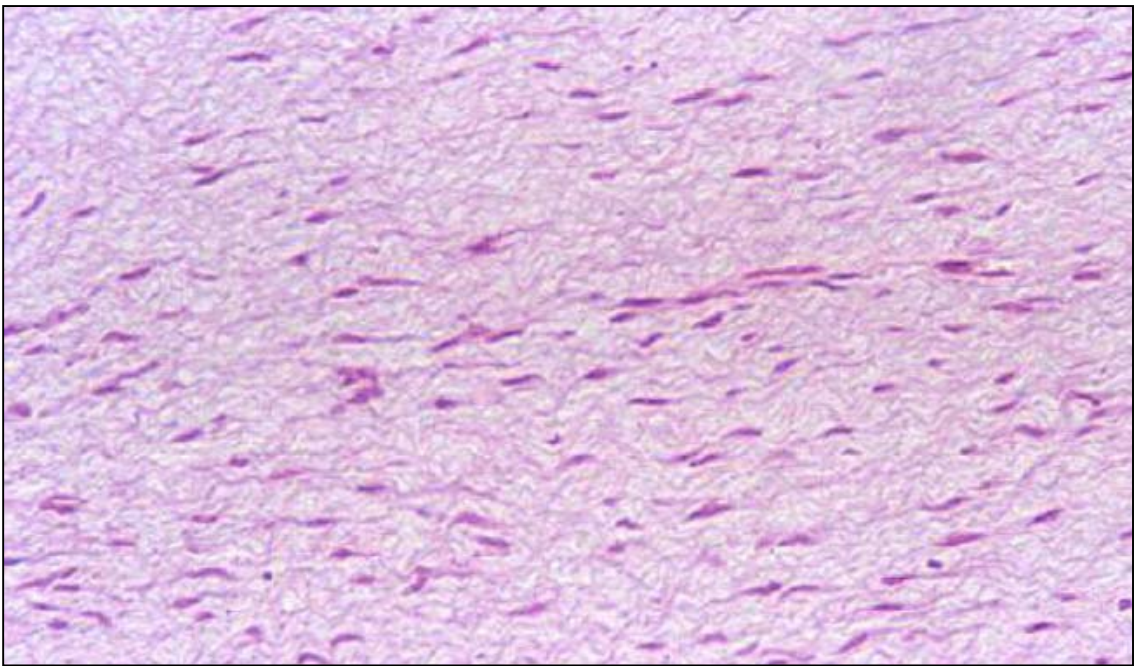


Figura 6

(A) Imunolocalização diminuída da sub-unidade R1- $\alpha$ , caso #3, com mutação del774C; (B) Imunomarcção aumentada da subunidade R2- $\beta$  no tumor #3, com mutação del774C; (C) Imunolocalização normal para R1 $\alpha$  com aspecto de marcação semelhante ao controle positivo (folículo pericoronário); (D) Imunolocalização da subunidade R2- $\beta$  em mixoma sem alteração na subunidade R1- $\alpha$  (Streptavidina-peroxidase x100).

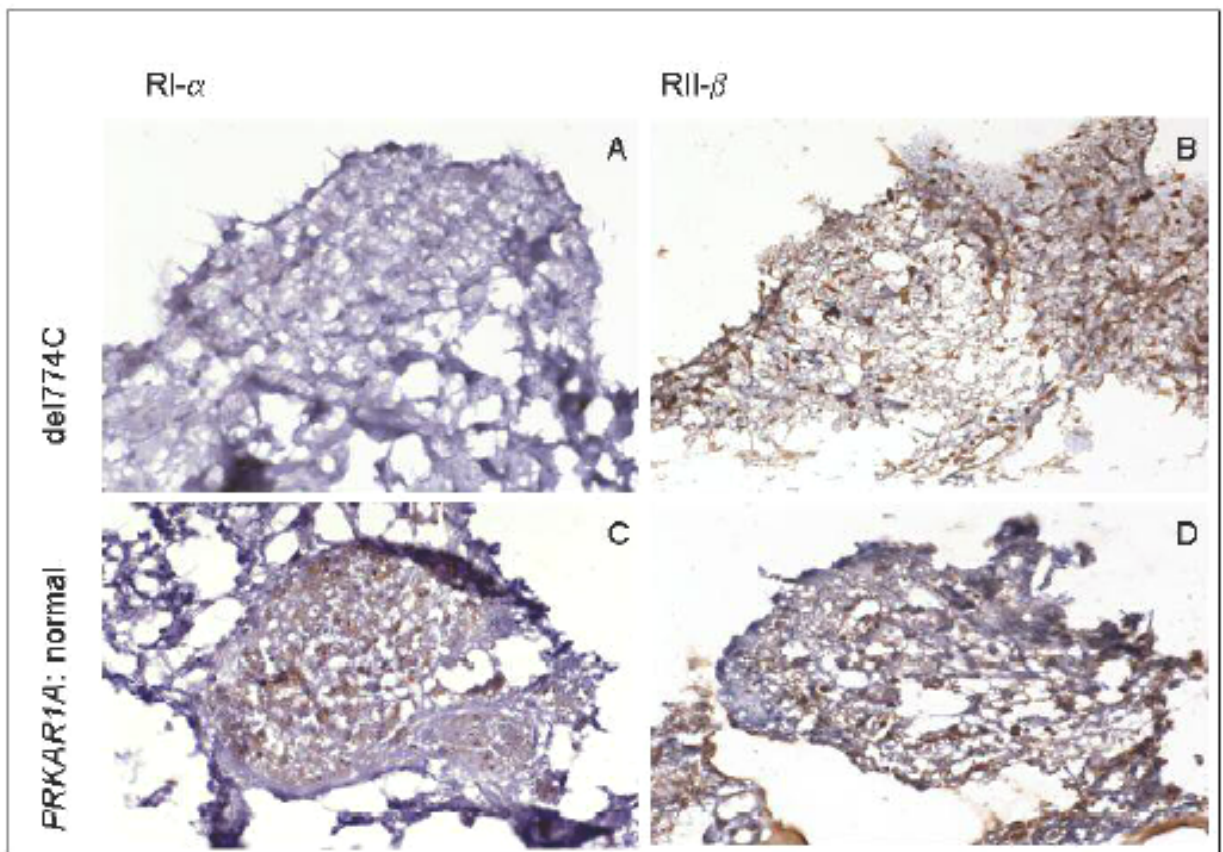


Figura 7

Aumento da marcação para R2- $\alpha$  no caso em que o mixoma odontogênico apresentou mutação 774delC (x400).

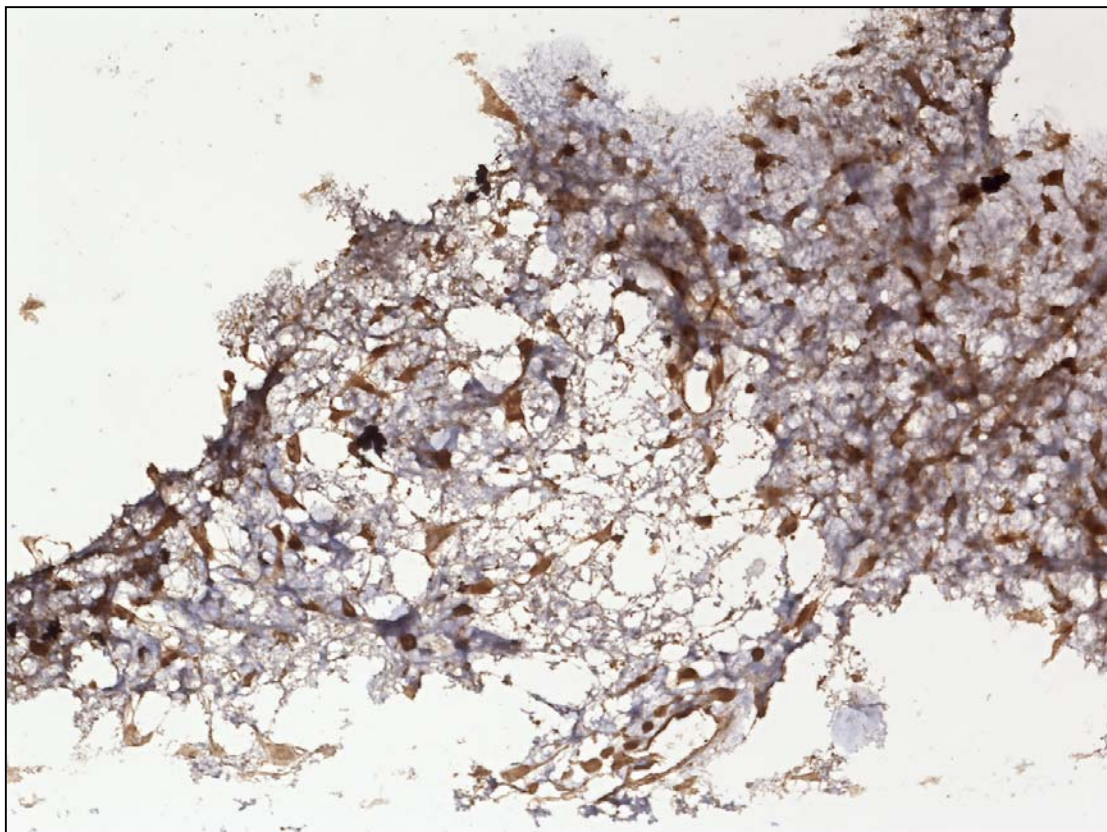


Figura 8

Mixomas não odontogênicos esporádicos sem mutação na *PRKAR1A* de pacientes sem Complexo de Carney. (A) Aspecto microscópico do mixoma cardíaco (HE, x40); (B) mixoma cardíaco exibindo uma marcação positiva para R1 $\alpha$  (x400) na maioria das células; (C) mixoma faríngeano (HE, x40); (D) mixoma faríngeano mostrando marcação negativa para R1 $\alpha$  (x400) na maioria das células fusiformes do tumor, embora as células endoteliais de um único vaso são positivas para a proteína, servindo como controle positivo. Todas as lesões demonstram (como os mixomas odontogênicos estudados neste trabalho) significativa heterogeneidade celular.

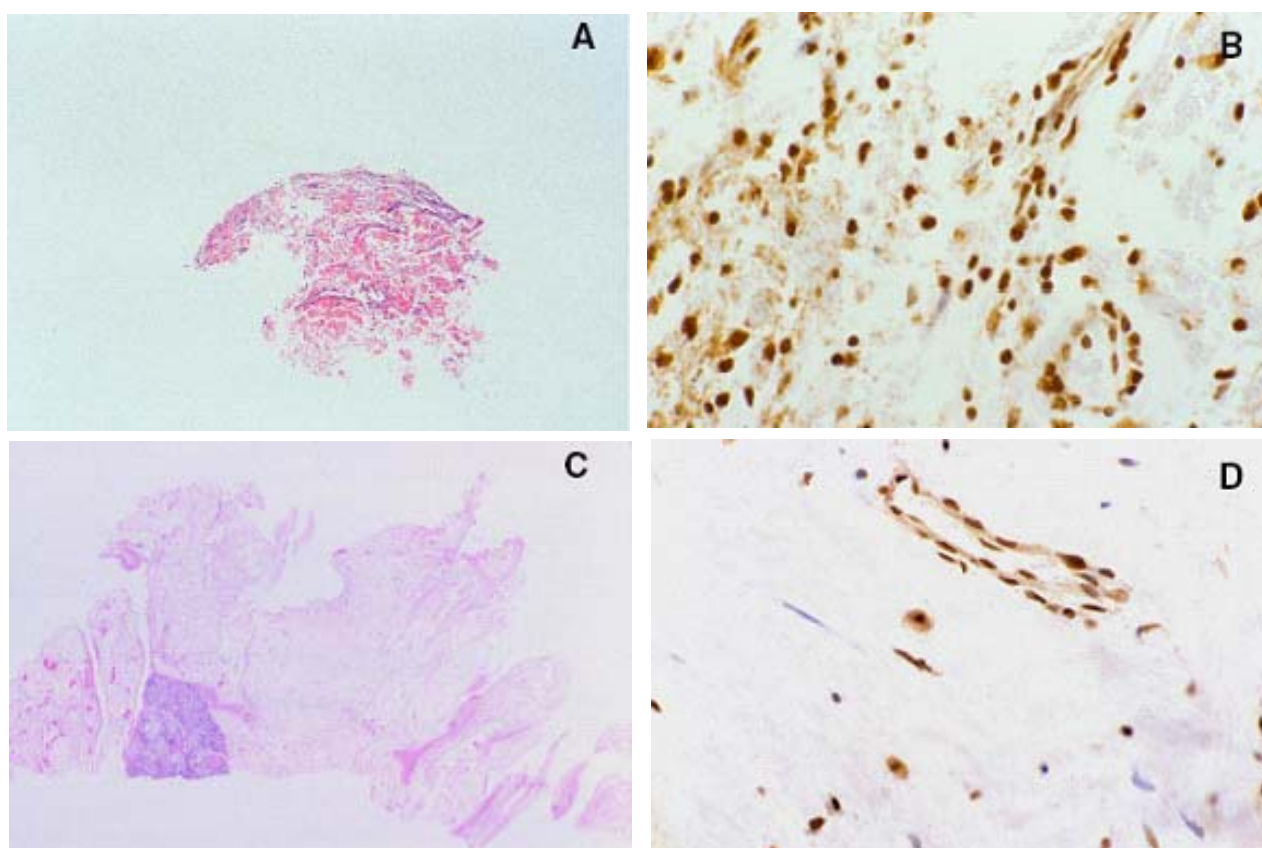


Tabela 6

Resultado da imunistoquímica para subunidades da PKA em mixomas odontogênicos e seqüências para o gene *PRKAR1A*.

Tumor	PRKARIA (R1- $\alpha$ )	PRKARIIIA (R2- $\alpha$ )	PRKAR2-B (R2- $\beta$ )	<i>PRKAR1A</i> seq.
1	2	1	X	
2	0	1	1	
3	0	3	2	del774C
4	0	3	1	
5	0	2	1	
6	0	3	1	725C>A
7	1	X	0	
8	1	2	0	
9	0	2	2	
10	1	2	0	
11	0	1	0	
12	0	2	0	
13	1	1	1	
14	1	1	X	
15	1	2	0	
16	1	1	1	
17	0	2	X	

**Padrões das imunomarcações:**

0 - Sem marcação;

1- Marcação fraca;

2 - Marcação moderada;

3 - Marcações forte;

X - Cortes perdidos.

## *5 - DISCUSSÃO*

O presente trabalho mostrou mutações inéditas no gene da *AMBN* e no *PRKAR1A* em tumores odontogênicos. Essas mutações poderiam estar associadas à tumorigênese dos diferentes tipos desses tumores.

Estudos de imunistoquímica têm investigado a diferenciação das células neoplásicas nos tumores odontogênicos (Mori *et al.*, 1991; Saku *et al.*, 1992; Takata *et al.*, 2000). Proteínas do esmalte como: amelogeninas, enamelina e bainhelina, proteína homóloga à ameloblastina, foram avaliadas em neoplasias odontogênicas epiteliais. Takata *et al.* (2000) observaram que nenhum dos dez ameloblastomas estudados tinha marcação positiva para a bainhelina nas células neoplásicas. Esse estudo sugeriu que as células neoplásicas dos ameloblastomas ainda não alcançaram a maturação funcional da fase secretora e que a ausência de marcação mostrou que essa proteína é um bom marcador para a diferenciação dos ameloblastos (Takata *et al.*, 2000).

A presença de mutação no gene  $\beta$ -catenina em tumores odontogênicos foi investigada por Sekine *et al.* (2003). No total foram estudados 31 tumores: onze cistos odontogênicos calcificantes (COC), dez ameloblastomas foliculares e dez plexiformes. Esses autores observaram que nove dos onze COC (82%) tinham mutações somáticas para a  $\beta$ -catenina e somente uma única mutação no códon 45 desse gene foi encontrada em um ameloblastoma folicular. O padrão de marcação da proteína  $\beta$ -catenina no ameloblastoma folicular mutado foi à mesma dos outros tumores.

No nosso trabalho, não foram encontradas mutações no gene *AMBN* nos dois COCs estudados. A etiopatogênese desses tumores parece estar mais relacionada ao gene da  $\beta$ -catenina. Os cistos odontogênicos calcificantes foram classificados pela OMS em 2005, como neoplasias odontogênicas que apresentam

epitélio odontogênico e ectomesênquima. Essa neoplasia é capaz de formar tecidos mineralizados em seu estroma, com marcação positiva para a bainhelina (Takata *et al.* 2003). Portanto, parece que nesses tumores as células epiteliais odontogênicas neoplásicas podem ser funcionalmente mais bem diferenciadas que as dos ameloblastomas, podendo até induzir o ectomesênquima.

Seis dos oito tumores investigados por nós tinham mutações no gene *AMBN*. O DNA extraído da mucosa normal contralateral de cada paciente com tumor não apresentou nenhuma alteração para esse gene, contribuindo para a exclusão de polimorfismos. Os ameloblastomas unicísticos, o tumor adenomatóide e um ameloblastoma sólido mostraram mutações heterozigóticas. Embora as células tumorais de todas as neoplasias tenham sido microdissecadas, é possível que tenha ocorrido a contaminação de DNA das células do estroma, aparentemente normal.

Normalmente, as transversões resultam em um polipeptídeo menos conservado, causando a perda de sua função (Cooper e Youssoufian, 1998). No tumor # 1 (ameloblastoma unicístico), a transversão ocorreu no sítio de fosforilação PPLPSQPSL, com a substituição de um aminoácido não-polar por um aminoácido polar sem carga (P81Q). A *AMBN* é uma proteína rica em prolina e esse aminoácido hidrofóbico está normalmente localizado nas regiões de dobra da estrutura proteica, áreas onde a cadeia de polipeptídeo muda a direção. A prolina pode também introduzir dobras dentro das estruturas alfa-hélice das proteínas, além de desempenhar um importante papel na sinalização intracelular (Bohley, 1996). Domínios como o WW e SH3 ligam-se a peptídeos específicos que contêm prolina e são elementos chaves de algumas cascatas de sinalização (Bohley, 1996). O ameloblastoma unicístico, caso #2, apresentou uma troca de aminoácido não-polar por um polar carregado positivamente. A metionina na posição 76 foi substituída por

uma arginina (M76R) em um importante sítio de fosforilação KSFNSLWMH. A metionina e demais aminoácidos hidrofóbicos desempenham uma função auxiliar na formação da estrutura secundária ( $\alpha$ -hélice) das proteínas, sendo que mudanças desses aminoácidos por aminoácidos polares podem mudar a conformação da proteína (Ellis e Hart, 1999).

O tumor odontogênico adenomatóide apresentou uma transversão 189A>T, que levou a troca de uma arginina, um aminoácido polar carregado positivamente, por um triptofano (não-polar) (R90W). A região PWMRPREHETQQ da proteína AMBN, onde ocorreu a troca dos aminoácidos, é altamente conservada entre as espécies (Conserved Domains: pfam 05111). A mudança poderia alterar a estrutura da AMBN de forma a ocultar essa importante região, pois a presença de um aminoácido hidrofóbico, como é o caso do triptofano, pode gerar uma dobra na proteína (Ellis e Hart, 1999).

As mutações presentes em um dos ameloblastomas sólidos, caso #3, e no TOE, caso #6, também podem causar mudanças consideráveis na estrutura da proteína. Mutações na região de encadeamento, "*splicing sites*", são importantes pois introduzem uma falsa seqüência na adjacência da junção do RNAm e essas mutações formam RNAs mensageiros aberrantes (Liu *et al.* 1998). A mutação na região de encadeamento pode levar a exclusão de um exon, a inclusão de um intron ou mesmo a omissão de exons, devido ao uso de regiões ocultas de encadeamento presentes quase sempre fora da seqüência normal das áreas doadoras e receptoras (Liu *et al.*, 1998; Le Hir *et al.*, 2000).

No nosso estudo as mutações encontradas na região de encadeamento, envolveram a área receptora (AG) de encadeamento. As regiões de encadeamento que apresentam certa similaridade com a seqüência senso poderiam ser propensas

a efeitos deletérios de uma mutação. Estudos realizados por Krawczak *et al.* (1992), mostraram que mutações nas regiões de encadeamento 5' favorecem o uso de áreas ocultas de encadeamento na adjacências destas regiões. A presença de regiões homólogas as seqüências encadeadoras, próximas aos sítios encadeadores mutados, são capazes de substituir, com sucesso, essas regiões durante o processamento do RNAm primário.

Toyosawa *et al.* (2000) foram os primeiros autores a relatar a presença de mutação no gene *AMBN* em ameloblastomas. Entretanto, os autores não descreveram as características clínicas, radiográficas e histológicas dos ameloblastomas. No nosso trabalho, foi possível colher esses dados. As mutações ocorreram nos dois tipos de ameloblastomas, unicísticos e sólido. Esses dados sugerem que, apesar da diferença no comportamento desses tumores, eles possivelmente, têm a mesma etiopatogênese.

Recentemente, Fukumoto *et al.* (2004) relataram em seu estudo que a *AMBN* poderia ser responsável pela diferenciação dos ameloblastos. Esses autores mostraram que os ameloblastos diferenciados se aderem uns aos outros através da molécula de adesão *AMBN*, ocorrendo a inibição da proliferação dessas células. Notou-se que em camundongos nulos as células do epitélio dental se soltavam da matriz, perdiam sua polaridade e se organizavam em forma de multicamadas. Concluindo, esses autores mostraram que a *AMBN* é uma importante molécula de adesão, responsável pela manutenção da diferenciação dos ameloblastos secretores e que, quando os ameloblastos atingem a maturidade funcional, a *AMBN* permite a ligação ameloblasto-ameloblasto, inibindo a proliferação (Fukumoto *et al.*, 2004).

Esses dados fortalecem a nossa hipótese de que o gene *AMBN* tem um papel importante na etiopatogênese dos tumores odontogênico. Primeiro, porque mutações nesse gene poderiam impedir que as células ameloblásticas se diferenciasssem; conseqüentemente, induzindo o fenótipo indiferenciado das células neoplásicas. Em segundo lugar, a perda da função de adesão celular dessa proteína permitiria a proliferação das células neoplásicas.

Na tentativa de melhor definir a etiopatogênese dos tumores odontogênicos, nós também estudamos o gene e *PRKAR1A* e sua imunolocalização em mixomas odontogênicos. Esses tumores tem origem no ectomesênquima, ou seja, nas células indiferenciadas da papila dentária e da crista neural.

Os mixomas odontogênicos tem aspectos histológicos semelhantes a outros mixomas (Lombardi *et al.*, 1992; Quintal *et al.*, 1994), como o cardíaco, faríngeo, intramuscular e o de pele (Acebo *et al.*, 2003; Amano *et al.*, 2003). Esses tumores são raros, localmente invasivos e não ocorrem como parte do Complexo de Carney (Stratakis *et al.*, 2001). Apesar da semelhança histológica entre os tumores, nenhum estudo tinha sido feito, relacionando o gene *PRKAR1A*, que está mutado em indivíduos que apresentam mixomas não odontogênicos associados ao Complexo de Carney, e os mixomas odontogênicos.

A patogênese dos mixomas odontogênicos não foi ainda conclusivamente investigada, apesar de alguns estudos sugerirem que um aumento da expressão das proteínas anti-apoptóticas (Bcl2 e Bcl-x) e de metaloproteinases da matriz (MMP-2) possam participar da progressão do tumor (Blast *et al.*, 2003).

Devido a ausência de alterações genéticas em qualquer tipo de tumor mixomatoso humano esporádico (De Marco *et al.*, 1996; Boson *et al.*, 1998; Dijkhvizen *et al.*, 2001; Fogt *et al.*, 2002; Okamoto *et al.*, 2002) os dados deste

estudo são particularmente importantes. Não só foram identificadas duas mutações diferentes em regiões conservadas do gene *PRKAR1A*, como também uma diminuição da imunolocalização da subunidade R1- $\alpha$ , e aumento das subunidades R2- $\beta$  e R2- $\alpha$ . O aumento da marcação de outras subunidades da PKA nos mixomas odontogênicos mostrou a similaridade com os processos patogênicos que envolvem outros tumores mixomatosos não odontogênicos, que apresentaram mutações descritas no gene *PRKAR1A* (Kirschner *et al.*, 2000b; Sandrini *et al.*, 2002; Bertherat *et al.*, 2003).

A mutação 725C>A, que ocorreu no mixoma odontogênico, caso # 6, foi uma transversão no exon 6. Esse tipo de alteração é incomum entre as sequências alteradas do *PRKAR1A*. A localização dessa troca de nucleotídeos foi em uma região conservada do gene. Somente quatro das mutações conhecidas (Kirschner *et al.*, 2000b; Sandrini *et al.*, 20012; Stratakis e Sandrini; 2002; Vegeulers *et al.*, 2004) (Stratakis *et al.*, dados ainda não publicados) foram em áreas altamente conservadas do gene.

Nesse trabalho, a mutação do caso # 6 ocorreu em uma região conservada entre as espécies, e entre os diferentes tipos de subunidades PKA. A ausência dessas alterações no tecido normal utilizado como controle (folículo pericoronário e mixoma faríngeo) sugere que essas mutações sejam patogênicas. A mutação 725C>A, levou a troca do aminoácido alanina por ácido aspártico na posição 213 (A213D). A mudança de uma alanina para um ácido aspártico é uma substituição importante que poderia afetar gravemente as funções da proteína. A alanina é um aminoácido hidrofóbico que favorece a formação da estrutura  $\alpha$ -hélice das proteínas (Ferreira e Felice, 2001). O ácido aspártico por sua vez está relacionado às regiões terminais da estrutura folha  $\beta$ -pregueada, quando as cadeias se estendem em

sentidos contrários (Ferreira e Felice, 2001). A região TPRAAT, onde ocorreu a mutação, é um importante domínio de ligação entre o AMPc e a PRKAR1A, que pode interferir na interação entre essas proteínas. Essa região fica situada exatamente a três aminoácidos de distância de uma das principais áreas de interação entre a subunidade regulatória, com a subunidade catalítica da PKA (Kim *et al.*, 2005).

Os efeitos da PKA estão associados com a fosforilação das subunidades C. As subunidades reguladoras da PKA são responsáveis pelo controle das subunidades catalíticas, inclusive pela sua inibição (McKnight *et al.*, 1988; Amieux e McKnight, 2002). Em nosso trabalho, as mutações encontradas em ambos os mixomas odontogênicos estavam associadas a uma diminuição da imunolocalização da PRKAR1A. Sendo assim, poderíamos especular que a diminuição da liberação da subunidade C e do “*turnover*” da subunidade regulatória, poderia causar a diminuição ou a suspensão da transcrição ou tradução da PRKAR1A (Bossis e Stratakis, 2004). Estudos recentes mostraram que a perda do alelo *PRKAR1A* normal poderia ser uma explicação alternativa para a diminuição da expressão da proteína (Tsilou *et al.*, 2004).

Nós não avaliamos a perda de heterozigose em nosso trabalho, apesar de ser comum em mixomas não odontogênicos (Tsilou *et al.*, 2004). Mas, em ambos os casos mutados de mixomas odontogênicos, o eletroferograma tinha somente uma janela de leitura. É possível que ambos os alelos estivessem mutados ou, alternativamente, que um dos alelos tenha sido perdido e outro mutado.

A segunda seqüência mutada, del774C, lembra algumas das mutações descritas do *PRKAR1A* associadas com Complexo de Carney e tumores esporádicos (Kirschner *et al.*, 2000b; Bertherat *et al.*, 2003). Esta mutação causa

uma mudança na janela de leitura levando a um códon de terminação 11 aminoácidos após o local da mutação. De forma similar a outras mutações do *PRKAR1A*, essa também ativaria um mecanismo chamado de declínio mediado sem sentido do RNAm. Através desse mecanismo as células podem degradar RNAm contendo um códon prematuro de terminação antes do RNAm alcançar a maquinaria de tradução, não sendo possível a detecção da proteína truncada (Kirschner *et al.*, 2000b).

Quinze dos dezessete tumores não estavam disponíveis para a análise molecular, sendo que a maioria deles apresentaram padrões de imunomarcção semelhantes aos tumores mutados. Algumas mudanças genéticas, além de mutações, poderiam ser responsáveis pela diminuição na marcação da R1- $\alpha$  nos tumores remanescentes. Uma dessas alterações poderia ser a metilação do gene, causando a inativação do mesmo. Devido a indisponibilidade de amostras, não foi possível testar esta possibilidade, que poderia ser a explicação para a baixa regulação da *PRKAR1A* (Bertherat *et al.*, 2003).

Duas mutações diferentes e expressivas em dois mixomas odontogênicos distintos é altamente relevante, mesmo sem a análise molecular dos outros quinze tumores. Se compararmos a frequência de mutações com os outros tumores esporádicos comuns na síndrome do Complexo de Carney, mas não associados a ela, como é o caso dos tumores de tireóide e adenomas pituitários, encontramos uma frequência maior nos mixomas odontogênicos (Sandrini *et al.*, 2002a; Sandrini *et al.*, 20002b). Um estudo similar em mixomas cardíacos esporádicos não identificou mutações no *PRKAR1A* (Farmakidis *et al.*, 2001).

Para tentar entender o mecanismo de tumorigenicidade das lesões mixomatosas esporádicas, nós poderíamos especular um outro efeito biológico: a

possibilidade do *PRKAR1A* mutante induzir alterações em vários tipos celulares, podendo potencialmente afetar a sinalização intra e inter-celular destas lesões mixomatosas de maneira similar àquelas descritas em interações estroma-epitélio, como demonstrada em outros estudos (Barcellos-Hoff e Medina, 2005; Bhowmick e Moses, 2005).

Através desse estudo, podemos concluir que os genes *AMBN* e *PRKAR1A* parecem estar associados a patogênese dos tumores odontogênicos. O gene *AMBN*, provavelmente, tem um papel importante no processo de diferenciação celular das células epiteliais odontogênicas. Por sua vez, o gene *PRKAR1A* parece estar envolvido com o processo de proliferação celular das células neoplásicas dos mixomas odontogênicos, de forma similar aos tumores envolvidos ao Complexo de Carney.

## **6 - CONCLUSÃO**

A partir de nossos resultados podemos concluir:

1. Mutações no gene *AMBN* parecem estar associadas a tumorigênese de tumores tais como: ameloblastoma, tumor odontogênico adenomatóide, tumor odontogênico escamoso;
2. Alterações no gene *PRKAR1A* podem estar relacionadas com a tumorigênese dos mixomas odontogênicos;
3. Mixomas odontogênicos apresentam uma diminuição da imunolocalização da proteína PRKAR1A.

## *7 - REFERÊNCIAS*

1. Acebo E, Val-Bernal JF, Gomez-Roman JJ, Revuelta JM.. Clinicopathologic study and DNA analysis of 37 cardiac myxomas: a 28-year experience. **Chest**. 123:1379-85, 2003.
2. Aldred MJ, Crawford PJ, Roberts E, Thomas NS. Identification of a nonsense mutation in the amelogenin gene (AMELX) in a family with X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). **Hum Genet**, 90:413-6, 1992.
3. Altundag MB, Ertas G, Ucer AR, Durmus S, Abanuz H, Calikoglu T, Ozbagi K, Demirkasimoglu A, Kaya B, Bakkal BH, Altundag K. Brain metastasis of cardiac myxoma: case report and review of the literature. **J Neurooncol**, Jul 23; [Epub ahead of print], 2005.
4. Amaro J, Kono T, Wada Y, Zhang T, Koide N, Fujimori M, Ito K. Cardiac myxoma: its origin and tumor characteristics. **Ann Thorac Cardiovasc Surg**. 9:215-21, 2003.
5. Amieux PS, McKnight GS. The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. **Ann N Y Acad Sci**. 968:75-95, 2002.
6. Aoba T, Fukae M, Tanabe T, Shimizu M, Moreno EC. Selective adsorption of porcine-amelogenins onto hydroxyapatite and their inhibitory activity on hydroxyapatite growth in supersaturated solutions. **Calcif Tissue Int**, 41:281-9, 1987.
7. Appel T, Gath R, Wernert N, Martini M, Berge S. Molecular biological and immunohistochemical analysis of tp53 in human ameloblastomas. **Mund Kiefer Gesichtschir**, 8: 167-72, 2004.
8. Barker BF. Odontogenic myxoma. **Semin Diagn Pathol**, 16:297-301, 1999.
9. Bast BT, Pogrel MA, Regezi JA. The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. **J Oral Maxillofac Surg**.;61:1463-6, 2003.

10. Bataineh AB. Effect of preservation of the inferior and posterior borders on recurrence of ameloblastomas of the mandible. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 90:155–63, 2000;
11. Barcellos-Hoff MH, Medina D. New highlights on stroma-epithelial interactions in breast cancer. **Breast Cancer Res**, 7:33-6,. 2005
12. Barnes L, Eveson JW, Reichard L, Sidransky D. **Pathology & Genetic Head and Neck Tumor**. Lion: Whopress, 2005.
13. Begue-Kirn C, Krebsbach PH, Bartlett JD, Butler WT. Dentin sialoprotein, dentin phosphoprotein, enamelysin and ameloblastin: tooth-specific molecules that are distinctively expressed during murine dental differentiation. **Eur J Oral Sci**, 106:963–70. 1998.
14. Bertherat J, *et al*. 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**, 63:5308-19, 2003.
15. Bhowmick NA, Moses HL. Tumor-stroma interactions. **Curr Opin Genet Dev**, 15:97-101, 2005
16. Blondeau P. Primary cardiac tumors--French studies of 533 cases. **Thorac Cardiovasc Surg**, 38 Suppl 2:192-5, 1990.
17. Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, 28: 495-503, 1990.
18. Bohley P. Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. **Biol Chem**, 377:425–35, 1996.

19. Boson WL, Gomez RS, Araujo L, Kalapothakis E, Friedman E, De Marco L. Odontogenic myxomas are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. **Anticancer Res**, 18:4415-7, 1998.
20. Bosshardt DD, Nanci A. Immunolocalization of epithelial and mesenchymal matrix constituents in association with inner enamel epithelial cells. **J Histochem Cytochem**, 46:135-42, 1998.
21. Bossis I, Stratakis CA. *PRKAR1A*: normal and abnormal functions. **Endocrinology**.145:5452-8, 2004.
22. Buchner A. The central (intraosseous) calcifying odontogenic cyst: an analysis of 215 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, 49:330-9,1991.
23. Carney JA, Hruska LS, Beauchamp GD, Gordon H. Dominant inheritance of the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. **Mayo Clin Proc**, 61:165-172, 1986.
24. Centofanti P, Di Rosa E, Deorsola L, Dato GM, Patane F, La Torre M, Barbato L, Verzini A, Fortunato G, di Summa M. Primary cardiac tumors: early and late results of surgical treatment in 91 patients. **Ann Thorac Surg**, 68:1236-41, 1999.
25. Cerny R, Slaby I, Hammarstrom L, Wurtz T. A novel gene expressed in rat ameloblasts codes for proteins with cell binding domains. **J Bone Miner Res**, 11:883-91, 1996.
26. Cho-Chung YS, Pepe S, Clair T, Budillon A, Nesterova M. cAMP-dependent protein kinase: role in normal and malignant growth. **Crit Rev Oncol Hematol**, 21:33-61, 1995.
27. Cho-Chung YS, Nesterova M, Pepe S, Lee GR, Noguchi K, Srivastava RK, Srivastava AR, Alper O, Park YG, Lee YN. Antisense DNA-targeting protein kinase A-RIA subunit: a novel approach to cancer treatment. **Front Biosci**, 4:D898-907, 1999. Review.

28. Ciardiello F, Tortora G. Interactions between the epidermal growth factor receptor and type I protein kinase A: biological significance and therapeutic implications. **Clin Cancer Res**, 4:821-8, 1998.
29. Clegg RA, Gardner RA, Lavielle F, Boisgard R, Ollivier-Bousquet M. Casein secretion in mammary tissue: tonic regulation of basal secretion by protein kinase A. *Mol Cell Endocrinol*. 1998 Jun 25;141(1-2):163-77.
30. Collier PM, Sauk JJ, Rosenbloom SJ, Yuan ZA, Gibson CW. An amelogenin gene defect associated with human X-linked amelogenesis imperfecta. **Arch Oral Biol**, 42:235-42, 1997.
31. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. **Hum Genet**, 78:151-5, 1988.
32. Curran AE, Damm DD, Drummond JF. Pathologically significant pericoronal lesions in adults: Histopathologic evaluation. **J Oral Maxillofac Surg**. 60:613-8, 2002.
33. Damm DD, White DK, Drummond JF, Poindexter JB, Henry BB. Combined epithelial odontogenic tumor: adenomatoid odontogenic tumor and calcifying epithelial odontogenic tumor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 55:487-96, 1983.
34. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. **Hum Genet**, 109:121-4, 2001.
35. De Marco L, Stratakis CA, Boson WL, Jakbovitz O, Carson E, Andrade LM, Amaral VF, Rocha JL, Chrousos GP, Nordenskjold M, Friedman E. Sporadic cardiac myxomas and tumors from patients with Carney complex are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. **Hum Genet**, 98:185-8, 1996.

- 36.** Dijkhuizen T, de Jong B, Meuzelaar JJ, Molenaar WM, van den Berg E. No cytogenetic evidence for involvement of gene(s) at 2p16 in sporadic cardiac myxomas: cytogenetic changes in ten sporadic cardiac myxomas. **Cancer Genet Cytogenet**, 126:162-5, 2001.
- 37.** Doi Y, Eanes ED, Shimokawa H, Termine JD. Inhibition of seeded growth of enamel apatite crystals by amelogenin and enamelin proteins in vitro. **J Dent Res**, 63:98-105, 1984.
- 38.** Dunsche A, Babendererde O, Luttgies J, Springer IN. Dentigerous cyst versus unicystic ameloblastoma—differential diagnosis in routine histology. **Oral Pathol Med**, 32:486–91, 2003.
- 39.** Ehrig T, Abdulkadir SA, Dintzis SM, Milbrandt J, Watson MA. Quantitative amplification of genomic DNA from histological tissue sections after staining with nuclear dyes and laser capture microdissection. **J Mol Diagn**, 3:22–5, 2001.
- 40.** Ellis RJ, Hart FU. Principles of folding in the cellular environment. **Folding and Binding**, 9:102-110, 1999.
- 41.** Farmakidis C, Sandrini F, Kirschner LS, Stratakis CA. **The search for somatic mutations in the tumor suppressor gene coding for the R1a regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase A in sporadic cardiac myxomas.** National Institutes of Health Research Festival. Bethesda, 2001
- 42.** Ferreira ST, Felice FG. Protein dynamics, folding and misfolding: from basic physical chemistry to human conformational diseases. **FEBS letters**, 498:129-134, 2001.

43. Fincham AG, Hu Y, Lau EC, Slavkin HC, Snead ML. Amelogenin post-secretory processing during biomineralization in the postnatal mouse molar tooth. **Arch Oral Biol**, 36:305-17, 1991.
44. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. **J Struct Bio**, 126:270–99, 1999.
45. Fogt F, Zimmerman RL, Hartmann CJ, Brown CA, Narula N.. Genetic alterations of Carney complex are not present in sporadic cardiac myxomas. **Int J Mol Med**, 9:59-60, 2002.
46. Fong CD, Hammarstrom L, Lundmark C, Wurtz T, Slaby I. Expression patterns of RNAs for amelin and amelogenin in developing rat molars and incisors. **Adv Dent Res**, 10:195-200, 1996.
47. Foss KB, Landmark B, Skalhegg BS, Tasken K, Jellum E, Hansson V, Jahnsen T. Characterization of in-vitro-translated human regulatory and catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinases. **Eur J Biochem**, 220:217-23, 1994.
48. Fukumoto S, Kiba T, Hall B, Iehara N, Nakamura T, Longenecker G, Krebsbach PH, Nanci A, Kulkarni AB, Yamada Y. Ameloblastin is a cell adhesion molecule required for maintaining the differentiation state of ameloblasts. **J Cell Biol**, 167:973-83, 2004.
49. Gardner DG, Pecak AM. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. **Cancer**, 46:2514–9, 1980.
50. Gardner DG. Some current concepts on the pathology of ameloblastomas. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, Dec;82(6):660-9, 1996.
51. Gritti-Linde A, Bei M, Maas R, Zhang XM, Linde A, McMahon AP. Shh signaling within the dental epithelium is necessary for cell proliferation, growth and polarization. **Development**, 129:5323–3, 2002.

52. Hart PS, Hart TC, Michalec MD, Ryu OH, Simmons D, Hong S, Wright JT. Mutation in kallikrein 4 causes autosomal recessive hypomaturation amelogenesis imperfecta. **J Med Genet**, 41:545-9, 2004.
53. Heikinheimo K, Jee KJ, Niini T, Aalto Y, Happonen RP, Leivo I, Knuutila S. Gene expression profiling of ameloblastoma and human tooth germ by means of a cDNA microarray. **J Dent Res**, 81:525-30, 2002.
54. Hendler BH, Abaza NA, Quinn P. Odontogenic myxoma. Surgical management and an ultrastructural study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 47:203-17, 1979.
55. Hisatomi M, Asaumi J, Konouchi H, Yanagi Y, Matsuzaki H, Kishi K. Comparison of radiographic and MRI features of a root-diverging odontogenic myxoma, with discussion of the differential diagnosis of lesions likely to move roots. **Oral Dis**, 9:152-7, 2003.
56. Hong SP, Ellis GL, Hartman KS. Calcifying odontogenic cyst. A review of ninety-two cases with reevaluation of their nature as cysts or neoplasms, the nature of ghost cells, and subclassification. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 72:56-64, 1991.
57. Hu CC, Fukae M, Uchida T, Qian Q, Zhang CH, Ryu OH, Tanabe T, Yamakoshi Y, Murakami C, Dohi N, Shimizu M, Simmer JP. Cloning and characterization of porcine enamelin mRNAs. **J Dent Res**, 76:1720-9, 1997.
58. Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, Jiang J. Hedgehog signalling activity of Smoothed requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. **Nature**, 432:1045-50, 2004.
59. Kaffe I, Naor H, Buchner A. Clinical and radiological features of odontogenic myxoma of the jaws. **Dentomaxillofac Radiol**, 26:299-303, 1997.
60. Karcher-Djuricic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV. A cellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. **Differentiation**, 29:169-75, 1985.

61. Kawabata T, Takahashi K, Sugai M, Murashima-Suginami A, Ando S, Shimizu A, Kosugi S, Sato T, Nishida M, Murakami K, Iizuka T. Polymorphisms in PTCH1 affect the risk of ameloblastoma. **J Dent Res**. 84: 812-6, 2005.
62. Kim C, Xuong NH, Taylor SS. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (RIalpha) subunits of PKA. **Science**, 307:690-6, 2005.
63. 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 Ialpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. **Nat Genet**, 26:89-92, 2000a.
64. Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Carney JA, Stratakis CA. Genetic heterogeneity and spectrum of mutation of the *PRKAR1A* gene in patients with the Carney complex. **Hum Mol Genet**, 9:3037-3046, 2000b.
65. Koch WE. In vitro differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. I. Transfilter interaction of embryonic incisor tissues. **J Exp Zool**, 165:155-70, 1967  
Kameyama Y, Takehana S, Mizohata M, Nonobe K, Hara M, Kawai T, Fukaya M. A clinicopathological study of ameloblastomas. **Int J Oral Maxillofac Surg**, 16:706-12, 1987.
66. Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition. **Cancer**, 70:2988-94, 1992.
67. Kramer IR. The World Health Organization: histological typing of odontogenic tumours: an introduction to the second edition. **J Dent Assoc S Afr**, 47:208-10, 1992.
68. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN. The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. **Hum Genet**, 90:41-54, 1992.

69. Krebsbach PH, Lee SK, Matsuki Y, Kozak CA, Yamada KM, Yamada Y. Full-length sequence, localization, and chromosomal mapping of ameloblastin. A novel tooth-specific gene. **J Biol Chem**, 271:4431-5, 1996.
70. Kumamoto H, Yoshida M, Ooya K. Immunohistochemical detection of amelogenin and cytokeratin 19 in epithelial odontogenic tumors. **Oral Dis**, 7:171-6, 2001.
71. Kumamoto H, Takahashi N, Ooya K. K-Ras gene status and expression of Ras/mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling molecules in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, 33:360-7, 2004.
72. Kumamoto H, Ooya K. Immunohistochemical detection of beta-catenin and adenomatous polyposis coli in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, 34:401-6. 2005.
73. Kumamoto H, Ohki K, Ooya K. Expression of p63 and p73 in ameloblastomas. **J Oral Pathol Med**, 34:220-6, 2005.
74. Kusama K, Kawashima A, Nagai H, Tajima M, Tsuchiya H, Yamaguchi H, Furuya M, Terakado M, Sato H, Moro I. Squamous odontogenic tumor of the maxilla: report of a case. **J Oral Sci**. 1998 Sep;40(3):119-22.
75. Ladeinde AL, Ajayi OF, Ogunlewe MO, Adeyemo WL, Arotiba GT, Bamgbose BO, Akinwande JA. Odontogenic tumors: a review of 319 cases in a Nigerian teaching hospital. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**,99:191-5, 2005.
76. Lagerstrom M, Dahl N, Nakahori Y, Nakagome Y, Backman B, Landegren U, Pettersson U. A deletion in the amelogenin gene (AMG) causes X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). **Genomics**, 10:971-5, 1991.
77. Le Hir H, Moore MJ, Maquat LE. Pre-mRNA splicing alters mRNP composition: evidence for stable association of proteins at exon-exon junctions. **Genes Dev**, 14:1098-108, 2000.

78. Lench NJ, Winter GB. Characterisation of molecular defects in X-linked amelogenesis imperfecta (AIH1). **Hum Mutat**, 5:251-9, 1995.
79. Li TJ, Wu YT, Yu SF, Yu GY. Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients. **Am J Surg Pathol**, 24:1385–92, 2000.
80. Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. **Connect Tissue Res**, 44:167–70, 2003.
81. Liu HX, Zhang M, Krainer AR. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. **Genes Dev**, 12:1998–2012, 1998.
82. Lombardi T, Samson J, Bernard JP, Di Felice R, Fiore-Donno G, Muhlhauser J, Maggiano N. Comparative immunohistochemical analysis between jaw myxoma and mesenchymal cells of tooth germ. **Pathol Res Pract**, 188:141-4, 1992.
83. MacDougall M, DuPont BR, Simmons D, Reus B, Krebsbach P, Karrman C, et al. Ameloblastin gene (AMBN) maps within the critical region for autosomal dominant amelogenesis imperfecta at chromosome 4q21. **Genomics**, 41:115–8, 1997.
84. Mardh CK, Backman B, Simmons D, Golovleva I, Gu TT, Holmgren G, MacDougall M, Forsman-Semb K. Human ameloblastin gene: genomic organization and mutation analysis in amelogenesis imperfecta patients. **Eur J Oral Sci**, 109:8-13, 2001.
85. McDaid HM, Cairns MT, Atkinson RJ, McAleer S, Harkin DP, Gilmore P, Johnston PG. Increased expression of the R1alpha subunit of the cAMP-dependent protein kinase A is associated with advanced stage ovarian cancer. **Br J Cancer**, 79:933-9, 1999.

86. McKnight GS, Cummings DE, Amieux PS, Sikorski MA, Brandon EP, Planas JV, Motamed K, Idzerda RL. Cyclic AMP, PKA, and the physiological regulation of adiposity. **Recent Prog Horm Res**, 53:139-59; discussion 160-1, 1998. Review.
87. Melrose RJ. Benign epithelial odontogenic tumors. **Semin Diagn Pathol**, 16:271-87, 1999.
88. Myklebust JH, Josefsen D, Blomhoff HK, Levy FO, Naderi S, Reed JC, Smeland EB. Activation of the cAMP signaling pathway increases apoptosis in human B-precursor cells and is associated with downregulation of Mcl-1 expression. **J Cell Physiol**, 180:71-80, 1999.
89. Nodit L, Barnes L, Childers E, Finkelstein S, Swalsky P, Hunt J. Allelic loss of tumor suppressor genes in ameloblastic tumors. **Mod Pathol**, 17:1062-7, 2004.
90. Okamoto S, Hisaoka M, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Hashimoto H. Juxta-articular myxoma and intramuscular myxoma are two distinct entities. Activating Gs alpha mutation at Arg 201 codon does not occur in juxta-articular myxoma. **Virchows Arch**, 440:12-5, 2002.
91. Paine ML, Wang HJ, Luo W, Krebsbach PH, Snead ML. A transgenic animal model resembling amelogenesis imperfecta related to ameloblastin overexpression. **J Biol Chem**, 278:19447-52, 2003.
92. Perdigão PF, Gomez RS, Pimenta FJ, De Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. **Oral Oncol**, 40:841-6, 2004.
93. Philipsen HP, Reichart PA. Squamous odontogenic tumor (SOT): a benign neoplasm of the periodontium. A review of 36 reported cases. **J Clin Periodontol**, 23:922-6, 1996.
94. Philipsen HP, Reichart PA. Adenomatoid odontogenic tumour: facts and figures. **Oral Oncol**, 35:125-31, 1999.

95. Philipsen HP, Reichart PA. Revision of the 1992-edition of the WHO histological typing of odontogenic tumours. A suggestion. **J Oral Pathol Med**, 31:253-8, 2002.
96. Pindborg JJ. A calcifying epithelial odontogenic tumor. **Cancer**, 11:838-43, 1958.
97. Pullon PA, Shafer WG, Elzay RP, Kerr DA, Corio RL. Squamous odontogenic tumor. Report of 6 cases of a previously undescribed lesion. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 40:616-30, 1975.
98. Quintal MC, Tabet JC, Oligny L, Russo P. Oral soft tissue myxoma: report of a case and review of the literature. **J Otolaryngol**, 23:42-5, 1994.
99. Rajpar MH, Harley K, Laing C, Davies RM, Dixon MJ. Mutation of the gene encoding the enamel-specific protein, enamelin, causes autosomal-dominant amelogenesis imperfecta. **Hum Mol Genet**, 10:1673-7, 2001.
100. Reichart PA, Philipsen HP. Revision of the 1992 edition of the WHO histological typing of odontogenic tumors. A suggestion. **Mund Kiefer Gesichtschir**, 7:88-93, 2003.
101. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, 31B:86-99, 1995.
102. Reynen K. Cardiac myxomas. **N Engl J Med**, 333:1610-7, 1995.
103. Simon EN, Merx MA, Vuhahula E, Ngassapa D, Stoelinga PJ. A 4-year prospective study on epidemiology and clinicopathological presentation of odontogenic tumors in Tanzania. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, 99:598-602, 2005.
104. Saku T, Okabe H, Shimokawa H. Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumors. **J Oral Pathol Med**, 21:113-9, 1992.

105. Sandra F, Hendarmin L, Nakao Y, Nakamura N, Nakamura S. Inhibition of Akt and MAPK pathways elevated potential of TNFalpha in inducing apoptosis in ameloblastoma. **Oral Oncol**, Sep 1; [Epub ahead of print], 2005.
106. Sandrini F, Matyakhina L, Sarlis NJ, Kirschner LS, Farmakidis C, Gimm O, Stratakis CA. Regulatory subunit type I-alpha of protein kinase A (*PRKAR1A*): a tumorsuppressor gene for sporadic thyroid cancer. **Genes Chromosom Cancer**, 35:182-92, 2002.
107. Sandrini et al. *PRKAR1A*, one of the Carney complex genes, and its locus (17q22-24) are rarely altered in pituitary tumours outside the Carney complex. **J Med Genet**, 39: 78, 2002.
108. Sandrini F, Stratakis C. Clinical and molecular genetics of Carney complex. **Mol Genet Metab**, 78:83-92, 2003.
109. Schafer DR, Thompson LD, Smith BC, Wenig BM. Primary ameloblastoma of the sinonasal tract: a clinicopathologic study of 24 cases. **Cancer**, 82:667-74, 1998.
110. Sciubba JJ, Fantasia JE, Kahn LB. Tumors and cysts of the jaw. Washington, DC, USA: Armed forces Institute of Pathology, 2001; 71-99.
111. Scott JD. Cyclic nucleotide-dependent protein kinases. **Pharmacol Ther**, 50:123-45, 1991.
112. Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, et al. b-catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cyst, but rare in ameloblastomas. **Am J Pathol**, 163:1707-12, 2003.
113. Sewing A, Muller R. Protein kinase A phosphorylates cyclin D1 at three distinct sites within the cyclin box and at the C-terminus. **Oncogene**, 9:2733-6, 1994.

114. Shibata T, Nakata D, Chiba I, Yamashita T, Abiko Y, Tada M, Moriuchi T. Detection of TP53 mutation in ameloblastoma by the use of a yeast functional assay. **J Oral Pathol Med**, 31: 534-8, 2002.
115. Simmons D, Gu TT, Krebsbach PH, Yamada Y, MacDougall M. Identification and characterization of a cDNA for mouse ameloblastin. **Connect Tissue Res**, 39:3-12; discussion 63-7, 1998.
116. Skalhegg BS, Tasken K. Specificity in the cAMP/PKA signaling pathway. differential expression, regulation, and subcellular localization of subunits of PKA. **Front Biosci**, 2:d331-42, 1997.
117. Smith CE. Cellular and chemical events during enamel maturation. **Crit Rev Oral Biol Med**, 9:128-6, 1998.
118. Stratakis CA. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit (*PRKAR1A*) in patients with the complex of spotty skin pigmentation, myxomas, endocrine overactivity and schwannomas' (Carney complex). **Ann NY Acad Sci**, 968: 3-21, 2002.
119. 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**, 86:4041-6, 2001.
120. Takata T, Zhao M, Uchida T, Kudo Y, Sato S, Nikai H. Immunohistochemical demonstration of an enamel sheath AMBN mutations associated with epithelial odontogenic tumors 5 protein, sheathlin, in odontogenic tumors. **Virchows Arch**, 436:324-9, 2000.
121. Tasken K, Skalhegg BS, Solberg R, Andersson KB, Taylor SS, Lea T, Blomhoff HK, Jahnsen T, Hansson V. Novel isozymes of cAMP-dependent protein kinase exist in human cells due to formation of RI alpha-RI beta heterodimeric complexes. **J Biol Chem**, 268:21276-83, 1993.

- 122.** Tasken K, Skalhegg BS, Tasken KA, Solberg R, Knutsen HK, Levy FO, Sandberg M, Orstavik S, Larsen T, Johansen AK, Vang T, Schrader HP, Reinton NT, Torgersen KM, Hansson V, Jahnsen T. Structure, function, and regulation of human cAMP-dependent protein kinases. **Adv Second Messenger Phosphoprotein Res**, 31:191-204, 1997.
- 123.** Thesleff I, Vaahtokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. **Connect Tissue Res**, 32:9–15, 1995.
- 124.** Tortora G, Damiano V, Bianco C, Baldassarre G, Bianco AR, Lanfrancone L, Pelicci PG, Ciardiello F. The RI $\alpha$  subunit of protein kinase A (PKA) binds to Grb2 and allows PKA interaction with the activated EGF-receptor. **Oncogene**, 14:923-8, 1997.
- 125.** Toyosawa S, Fujiwara T, Ooshima T, Shintani S, Sato A, Ogawa Y, et al. Cloning and characterization of the human ameloblastin gene. **Gene**, 256:1–11, 2000.
- 126.** Tsilou ET, Chan CC, Sandrini F, Rubin BI, Shen de F, Carney JA, Kaiser-Kupfer M, Stratakis CA. Eyelid myxoma in Carney complex without PRKAR1A allelic loss. **Am J Med Genet**, 130A:395-7, 2004.
- 127.** Uchida T, Murakami C, Dohi N, Wakida K, Satoda T, Takahashi O. Synthesis, secretion, degradation, and fate of ameloblastin during the matrix formation stage of the rat incisor as shown by immunocytochemistry and immunochemistry using region-specific antibodies. **J Histochem Cytochem**, 45:1329-40, 1997.
- 128.** Veugelers M, et al. Comparative PRKAR1A genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and prkar1a haploinsufficient mice. **Proc Natl Acad Sci USA**, 101:14222-7, 2004.
- 129.** Waldron CA, el-Mofty SK. A histopathologic study of 116 ameloblastomas with special reference to the desmoplastic variant. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, 63:441–51, 1987.

**130.** Yagishita H, Taya Y, Kanri Y, Matsuo A, Nonaka H, Fujita H, Aoba T. The secretion of amelogenins is associated with the induction of enamel and dentinoid in an ameloblastic fibro-odontoma. **J Oral Pathol Med**, 30:499-503, 2001.

**131.** Yoon DH, Roberts W. Sex distribution in cardiac myxomas. **Am J Cardiol**, 90:563-5, 2002.