

Paolla Freitas Perdigão

**MECANISMOS MOLECULARES
ASSOCIADOS A ETIOPATOGÊNESE
DOS TUMORES ODONTOGÊNICOS**

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Co-orientador: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2005

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Paolla Freitas Perdigão

MECANISMOS MOLECULARES ASSOCIADOS A ETIOPATOGÊNESE DOS TUMORES ODONTOGÊNICOS

Tese a presentada ao Programa de Pós- Graduação em Farmacologia do Departamento de Farmacologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Luiz Armando De Marco

Co-orientador: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2005

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me acompanha sempre e me dá força para seguir em frente.

Agradeço ao meu marido Vinicius, por toda amizade, solidariedade, companheirismo e amor dedicados a mim nestes anos.

À minha mãe, que me deu força e coragem para enfrentar os desafios da vida, e que sempre acreditou e incentivou meus sonhos.

Ao meu pai, a Norma, meus irmãos pelo constante incentivo.

Ao meu orientador Luiz Armando, pela confiança, amizade e pela dedicação a nós alunos de pós-graduação.

Ao meu amigo e co-orientador Ricardo Gomez, pela amizade, confiança, por ser a primeira pessoa a me ingressar na pesquisa respeitando os meus limites e sonhos.

A querida amiga Wolfanga, que me ensinou os primeiros passos em Biologia Molecular, que teve paciência com as minhas dificuldades, e ajudou-me a crescer como pesquisadora.

À Waleska, Wagner e Walkiria, por estarem próximos e sempre prontos a ajudar.

À minha amiga e segunda mãe Margarida, que acredita mais em mim do que eu mesma, sempre sendo um ombro amigo.

Aos meus amigos do laboratório, Paula, Paulo, Bete, Letícia, Juliana, Beatriz, Ricardo, Flávio, Guilherme, Alexandre, Débora, Lucimar e Daniela, por tornarem o meu trabalho mais prazeroso.

Aos professores do Curso de Farmacologia Bioquímica e Molecular em especial o professor Marcus Vinicius por toda a ajuda concedida à mim.

Aos amigos da odontologia, Alessandra, Carolina, André, Paulo Eduardo, Leandro Napier, Giane e Júnia, pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao National Institute of Health, em especial ao Dr. Constantine Stratakis e Dr. Sotirios Stergiopoulos, pelo auxílio na concretização desse trabalho.

A CAPES e ao CNPq, pelo auxílio financeiro.

RESUMO

As neoplasias odontogênicas epiteliais são lesões que acometem a cavidade bucal e apresentam comportamentos variados. Elas podem ser agressivas, destruindo completamente a região envolvida, ou ter um crescimento limitado e baixa recidiva. Esses tumores contêm células epiteliais odontogênicas indiferenciadas, que lembram as células do órgão do esmalte. O gene da ameloblastina (*AMBN*, OMIM *601259) expressa uma importante proteína (*AMBN*), que tem papel na diferenciação das células ameloblásticas e na sinalização epitélio-mesênquima durante a odontogênese.

O mixoma odontogênico é uma neoplasia odontogênica ectomesenquimal, que mantém características histopatológicas semelhantes a outros tumores mixomatosos como: mixoma cardíaco, intramuscular, faríngeo e de pele. Os tumores mixomatosos não odontogênicos podem fazer parte do Complexo de Carney, que é uma síndrome causada por mutação no gene *PRKAR1A*.

Na expectativa de entender mais sobre a etiopatogênese dos tumores odontogênicos, as seqüências dos genes *AMBN* e *PRKAR1A*, e a imunomarcação da proteína *PRKAR1A* foram investigadas. Foram utilizadas para a análise molecular dez amostras congeladas de tumores odontogênicos: quatro ameloblastomas, dois cistos odontogênicos calcificantes, um tumor odontogênico adenomatóide, um tumor odontogênico escamoso e dois mixomas odontogênicos. Para o estudo imunoistoquímico tínhamos 17 blocos de parafina de mixomas odontogênicos.

Apartir de nossos resultados, nós podemos concluir que os tumores odontogênicos apresentam mutações somáticas nos genes seqüenciados, e que mixomas odontogênicos têm uma diminuição da imunomarcação da PRKAR1A.

LISTA DE ABREVIATURAS

<i>AMB</i> N	Gene ameloblastina
AMBN	Proteína ameloblastina
PKA	Proteína quinase A
<i>PRKAR1A</i>	Gene da subunidade regulatória R1- α
PRKAR1A	Proteína da subunidade regulatória R1- α
PRKAR2A	Proteína da subunidade regulatória R2- α
PRKAR2B	Proteína da subunidade regulatória R2- β
PRKARCA	Proteína da subunidade catalítica C- α
PRKARCB	Proteína da subunidade catalítica C- β
cDNA	Cópia complementar de um RNA mensageiro.
COC	Cisto Odontogênico Calcificante
dATP	Desoxiadenosina trifosfato
dCTP	Desoxicitidina trifosfato
ddNTP	Didesoxinucleotídeo trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina trifosfato
dNTP	Desoxinucleotídeo trifosfato
dTTP	Desoxitimidina trifosfato
Pb	Pares de base
TOA	Tumor Odontogênico Adenomatóide
TOE	Tumor Odontogênico Escamoso

PBS Solução tampão de fosfato

BSA Albumina sérica bovina

LISTA DE FIGURAS

- FIGURA 1 Sinalização da via AMPc/PRKAR1A. (A) Após a ativação dos receptores ligados à proteína G α , 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 transcrevional 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- α . Mas a via só é regulada pela R1- α , sendo assim ocorre um aumento da transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular e perda do controle dessa transcrição, devido a ausência da R1- α , que controla a liberação de AMPc..... 27
- FIGURA 2 Aspectos histológicos dos tumores odontogênicos epiteliais estudados; (A) Ameloblastoma unicístico; (B) Ameloblastoma sólido; (C) Tumor odontogênico escamoso; (D) tumor odontogênico adenomatóide..... 46
- FIGURA 3 (A) Mutação do 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..... 47

FIGURA 4 Seqüência das duas mutações identificadas. (A) 725 C>A; (B) 49 del 774C.....	49
FIGURA 5 Aspectos histológicos do mixoma odontogênico, mostrando as características histológicas típicas: presença de células fusiformes, estreladas e ovais em um estroma mixóide frouxo.....	52
FIGURA 6 (A) Imunolocalização diminuída da subunidade R1- α , caso #3, com mutação del774C; (B) Imunomarcação aumentada da subunidade R2- β no tumor #3, com mutação del774C; (C) Imunolocalização normal para R1 α com aspecto de marcação semelhante ao controle positivo (folículo pericoronário); (D) Imunolocalização da subunidade R2- β em mixoma sem alteração na subunidade R1- α (Streptavidina-biotina-peroxidase x100).....	53
FIGURA 7 Aumento da marcação para R2- α no caso em que o mixoma odontogênico apresentou mutação 774delC (x400).....	54
FIGURA 8 Mixomas não odontogênicos esporádicos sem mutação na PRKAR1A de pacientes sem Complexo de Carney. (A) Aspecto microscópio do mixoma cardíaco (HE, x40); (B) mixoma cardíaco exibindo uma marcação positiva para R1 α (x400) na maioria das células; (C) mixoma faringeano (HE, x40); (D) mixoma faríngeo mostrando marcação negativa para R1 α (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) significante heterogeneidade celular.....	55

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Número dos exons do gene da <i>AMBN</i> , iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento.....	36
TABELA 2	Números dos exons do gene <i>PRKAR1A</i> , iniciadores e respectivas temperaturas de anelamento.....	37
TABELA 3	Mutações encontradas nos tumores odontogênicos epiteliais.	45
TABELA 4	Conservação da citosina 725 entre as diferentes espécies.....	50
TABELA 5	Conservação do aminoácido alanina na posição 213 entre as diferenets subunidades reguladoras da PKA.....	50
TABELA 6	Resultado da imunoistoquímica para subunidades da PKA em mixomas odontogênicos e seqüências para o gene <i>PRKAR1A</i>	56

SUMÁRIO

RESUMO

LISTA DE ABREVIATURAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 TUMORES ODONTOGÊNICOS EPITELIAIS.....	16
1.2 MIXOMAS ODONTOGÊNICOS E NÃO ODONTOGÊNICOS.....	21
1.3 AMELOBLASTINA (AMBN).....	24
1.4 SUBUNIDADE REGULADORA R1- α DA PROTEÍNA QUINASE A (PRKAR1A).....	26
2 OBJETIVOS.....	30
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	32
3.1 COLETA DAS AMOSTRAS.....	33
3.2 ESTUDO MOLECULAR.....	34
3.2.1 Extração do DNA	34
3.2.2 Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	35
3.2.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida(PAGE) e coloração pelo nitrato de prata.....	38

3.2.4 Purificação.....	38
3.2.5 Seqüenciamento.....	39
3.3 IMUNOISTOQUÍMICA.....	40
3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4 RESULTADOS.....	43
4.1 Análise molecular do gene da AMBN em tumores odontogênicos epiteliais.....	44
4.2 Análise molecular do gene <i>PRKAR1A</i> em mixomas odontogênicos.....	48
4.3 Imunoistoquímica dos mixomas odontogênicos.....	51
5 DISCUSSÃO.....	57
6 CONCLUSÃO.....	67
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69

ANEXO A

- 1 Perdigão PF, Gomez RS, Pimenta FJ , De Marco L. Ameloblastin gene (AMBN) mutations associated with epithelial odontogenic tumors. *Oral Oncol.* 2004 Sep;40 (8):841-6.
- 2 Perdigão PF, Stergiopoulos SG, De Marco L, Matyakhina L, Boikos SA, Gomez RS, Pimenta FJ, Stratakis CA. Molecular and immunohistochemical

investigation of protein kinase A regulatory subunit type 1A (*PRKAR1A*) in odontogenic myxomas. *Genes, Chromosomes & Cancer*. 2005.

ANEXO B (SEQÜENCIA DE NUCLEOTÍDEOS DO GENE *AMBN*)

ANEXO C (SEQÜENCIA DE cDNA DO GENE *PRKAR1A*)

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, ameloblastomas (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, homólogos 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- α e das vias induzidas por TNF- α , Akt e MAPK, na apoptose de ameloblastomas. Os autores observaram que o TNF- α induziu tanto a sobrevivência celular quanto a via de apoptose em ameloblastoma. O potencial do TNF- α 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 imunomarcação 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 aberraçāo 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 α 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-cardiaca 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- α 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; Dijkhoven *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), enamelina 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 significante na amelogenese, como ínicio 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 enamelina, 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 amelogênese 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 cimento 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 ameloblastica 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.

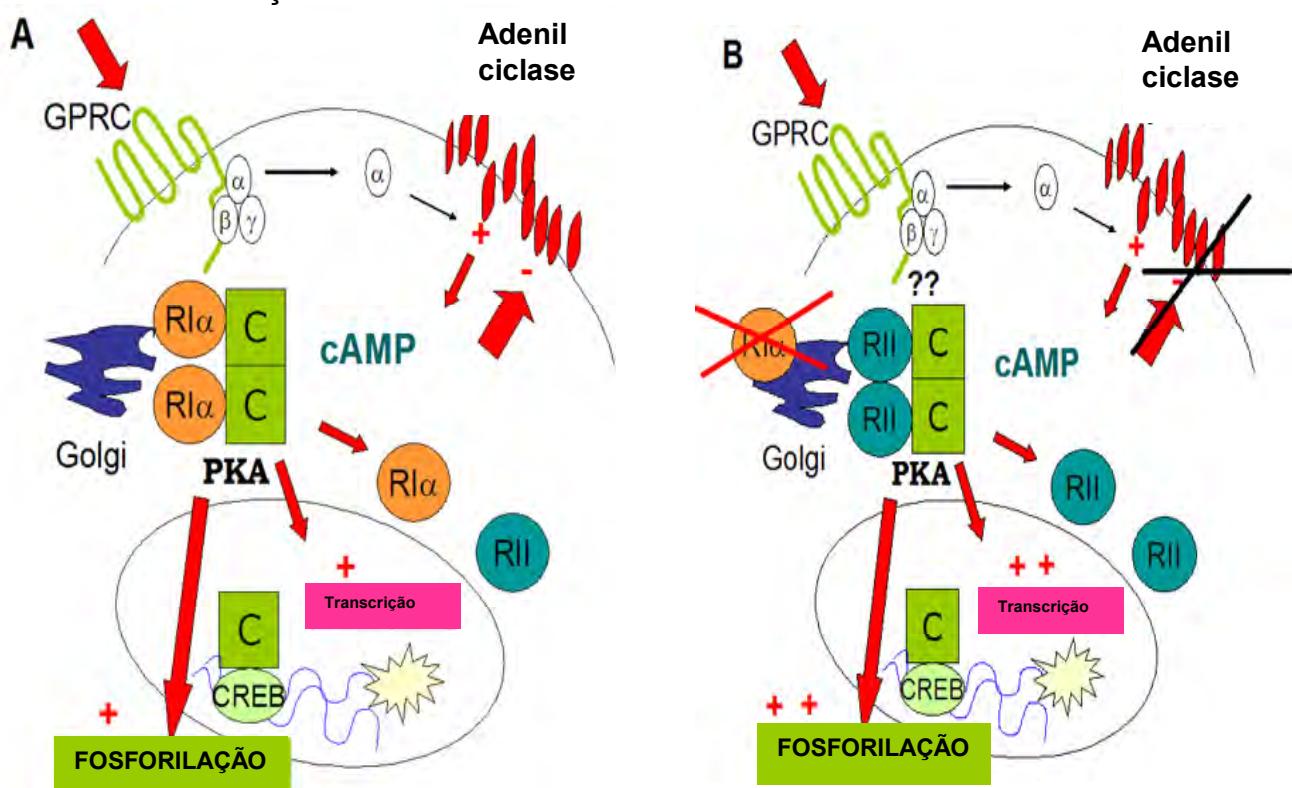
1.4 SUBUNIDADE REGULADORA R1- α DA PROTEÍNA QUINASE A (PRKAR1A)

O gene *PRKAR1A* codifica a subunidade regulatória 1 alfa (R1- α) da proteína quinase A (PKA), que é o principal mediador da sinalização de AMPc (monofosfato de adenosina ciclico) 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 α , 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 transcrecional 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- α . Mas a via só é regulada pela R1- α , sendo assim ocorre um aumento da transcrição de genes responsáveis pela proliferação celular e perda do controle dessa transcrição, devido a ausência da R1- α , 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- α , R1- β , R2- α , R2- β) e três que codificam as subunidades catalíticas (C α , C β , C γ) (Foss *et al.*, 1994). Os quatro tipos de subunidades regulatórias apresentam diferentes padrões de expressão em mamíferos. Enquanto R1- α tem uma ampla distribuição, R1- β se expressa primariamente no cérebro, testículos e linfócitos T e B (Clegg *et al.*, 1998; Scott, 1991). Similarmente, a subunidade R2- α também tem uma ampla distribuição nos tecidos, enquanto R2- β 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- α ou R1- β na sua estrutura, enquanto a PKA tipo 2 se forma pelas subunidades R2- α ou R2- β (McKnight *et al.*, 1998; Scott, 1991; Tasken *et al.*, 1997).

As diferentes isoformas das subunidades regulatórias desempenham papéis específicos. A R1- α 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- α e β participam principalmente do controle da diferenciação, crescimento e indução da apoptose (Cho-Chung *et al.*, 1995). A superexpressão de R1- α tem sido freqüentemente detectada nas células cancerosas (Ciardiello e Tortora, 1998).

A subunidade R1- α é a principal reguladora da PKA dependente de AMPc, quando a via R1- α 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- α 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 freqüência 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- α , R2- α , R1- β 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 imunoistoquímico, 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 imunoistoquímica, 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

Extraiu-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 μ 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 holemback número 3 estéril, e as células foram colocadas em tubo tipo *eppendorf* contendo solução de lise, que rompe a célula e expõe o DNA.

Seguindo o método de Boom *et al.* (1990), 900 μ l de tampão de lise e 40 μ 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 μ l de tampão TE (Tris pH 7,4 10mM + EDTA pH 8,0 0,1mM + 100mL de H₂O) 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: ATCTTGTTGGCATCATCAG R: TTCAGCTACTGGTGACATGAAG	56
2	F: TGATTCCATGTGTTCCCTGTA R: CTAAAGACTGACTTACCGGCAC	56
3	F: TTTCATTCAAGTTCTTCCTCAGC R: CTAGGAAAAGTGAGAACACACG	60
4	F: AGCATATGCGATAAACAGTAACC R: TTACTCTGGTCTTCCAATCTTG	56
5	F: TTTAGTATTCTAGATAACGGCTTG R: GAAGGCAAGTAAGAACAGGTTT	56
6	F: ACCTTGTTAACGAGCCATCC R: AAGGAAGTACCTCAGGCTTG	58
7-8	F: CATTGCAAACCTTGGTCATA R: GACCTTGTGGATCAGGAAATC	59
9	F: TAATATAGCTCCCAGGATTGGAT R: AGATTGTTATTTGTGGCATTG	58
10	F: GGGATGTGCCGTGAGAATTA R: AAGGCACGTACAACATTCTG	57
11	F: CCACATCTGTTGCAATTAC R: GTCTGGCCAAGATTATCAAATA	57
12	F: AAGGAGGCAAACCTCTATTGG R: GTCTCTGCAGCCAGTCATAAG	59
13 a	F: ATGGCATCTTGACGAATGT R : ATCCTTAGGGAGAGCAAGGA	58
13 b	F: GAAGAAGGAGGTGCACAAGG R: CTTAGAGCTGTCAGGGCTTG	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)
1A	F: AGTCGCCAACCTGTCATCT R: CACTTCTCCTTCCGCAGTC	58
1B	F: CATTGACGTCAGTAGCCGAA R: ATCTTGGATCGGTCCAGCTC	58
2	F: CCTAGTCCCCACTTCCCTGT R: ATCACCTCATCTCCCCA	58
3	F: CATGCCGAAGGATCTCATT R: ATGGATGAAGTTCCACCCCTG	58
4A	F: CAGGTTGCAAACGTGAAATG R: CTGCGATAAAGGAGACCGAA	58
4B	F: AGCCAAAGCCATTGAAAAGA R: GCCTCCTCTCCCGTAACAAT	58
5	F: TTGCTTGATTTCTTCCCC R: ATTCTTATTGCTCGGAAGCG	58
6	F: TCATTTAACTCGTCAGAAATCACC R: TTCTAAATCACACTCTCAAACACCA	58
7	F: GGCATAATATTGGCGGAAAA R: AAGGCTTTCCCAAGGTCCAT	58
8	F: AGAATGTTGAATGGGCATGG R: TTAGCCCACCTTTCCCTCTT	58
9	F: CACCCCTGGGTTGAGAGTGT R: TTCCCTCTCAGAGCCAAAAA	58
10	F: CCCATTTGCTTCTCCAG 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 didesoxinucleotídeos (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 dideoxinucleotideos 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 diamino benzidina, usando-se um módulo automático de imunoistoquímica (NexES, Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ). As amostras incluídas em parafina foram submetidas a cortes de 5 µm e estendidos sobre lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram desparafinizados em xanol 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 imunoistoquímica, usando-se o protocolo padronizado. Os cortes foram seqüencialmente incubados com anticorpo primário monoclonal de camundongo anti subunidades reguladoras R1-α, R2-α, R2-β e subunidade catalítica Cα e Cβ (EMD Biosciences, San Diego, CA). O anticorpo R1-α, 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-estreptavidina conjugada (Vector Laboratories,

Burlingame, CA) por 8 minutos, depois lavados em 0.01M PBS e finalmente incubados com 3,3'-diaminobenzidina/H₂O₂ (DAB; Sigma, Germany) por 8 minutos. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer e montados com Permount.

Para controle da imunoistoquímica 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)	Plexiforme
		Exon 4; C203G (Heterozigota)	
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.

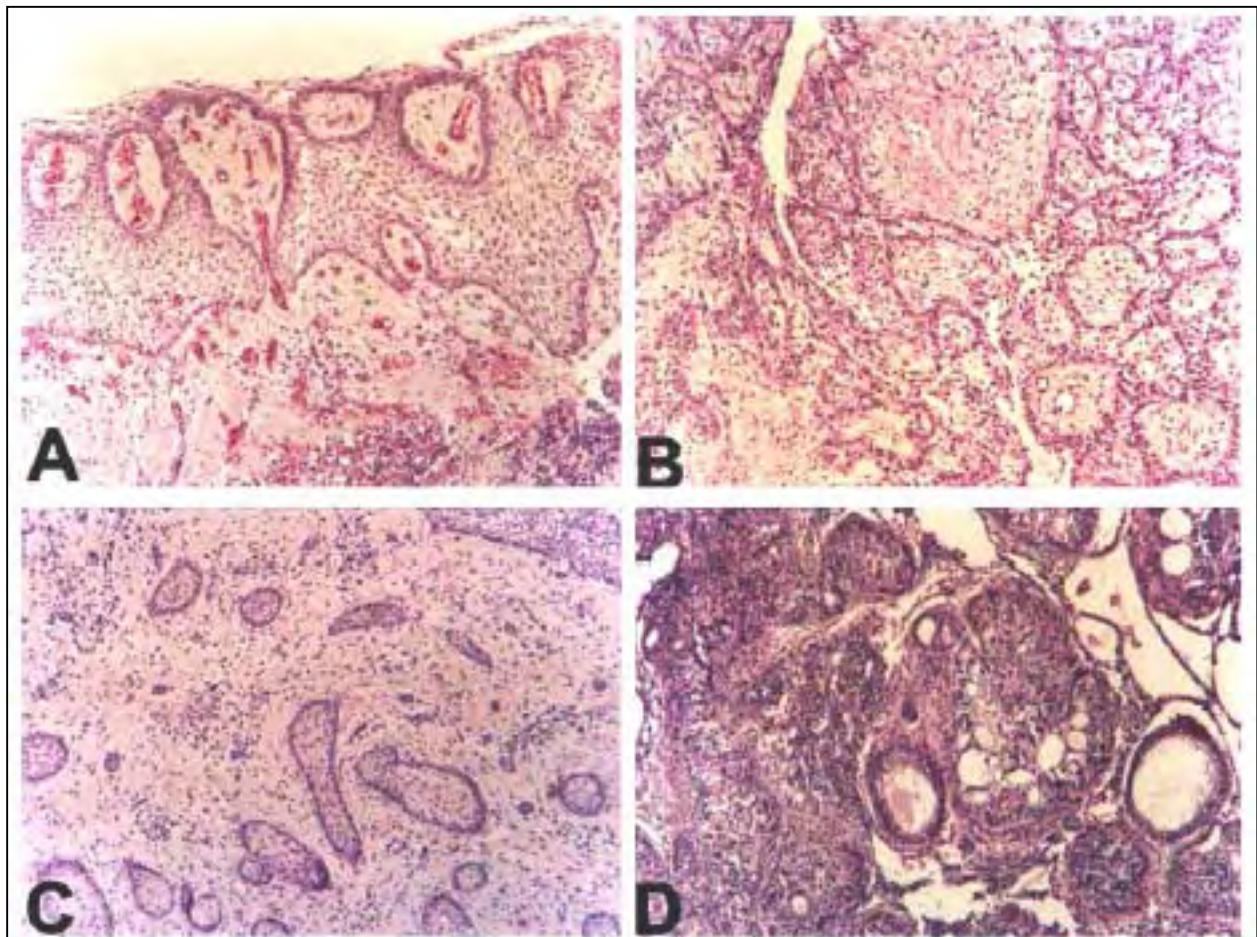
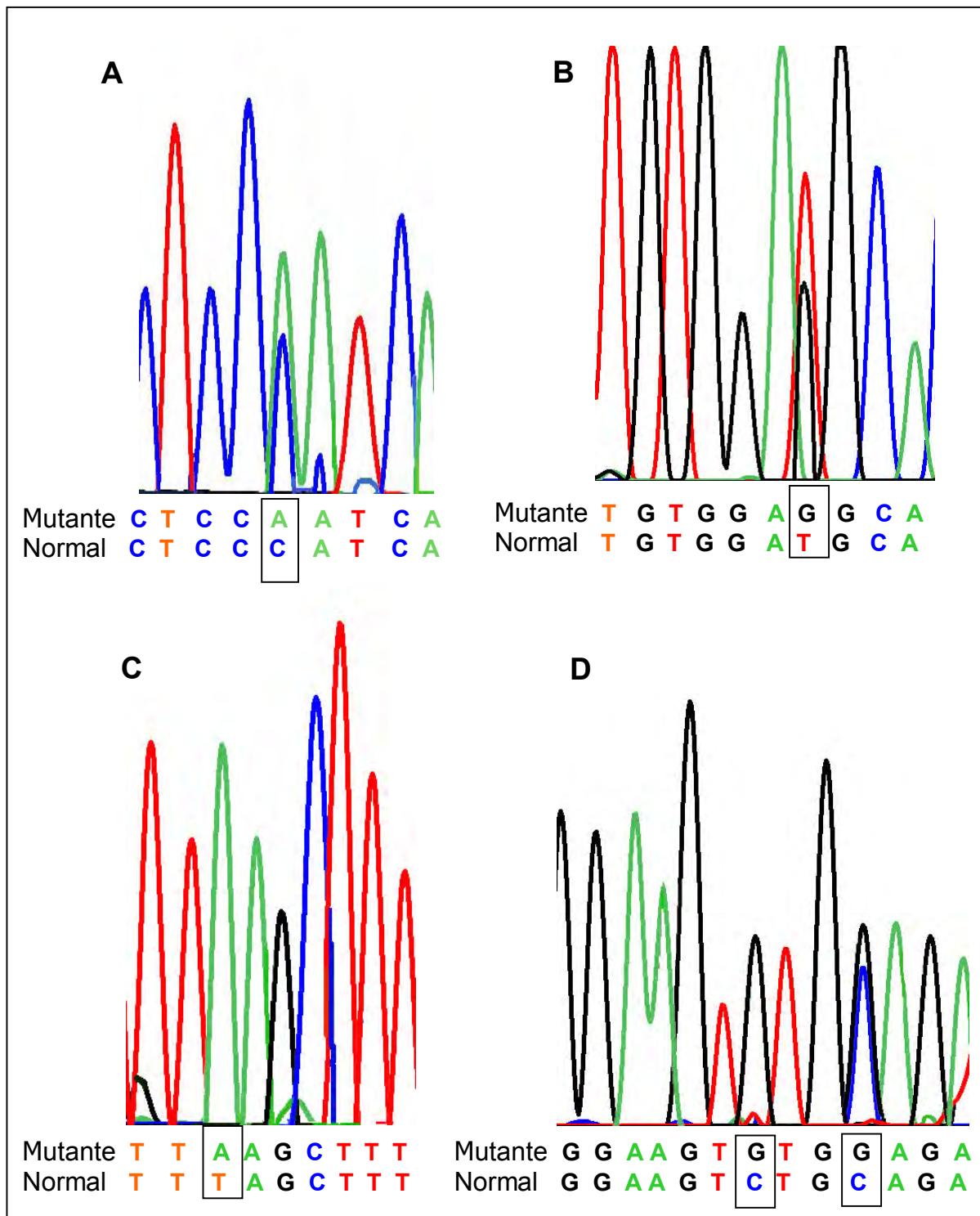
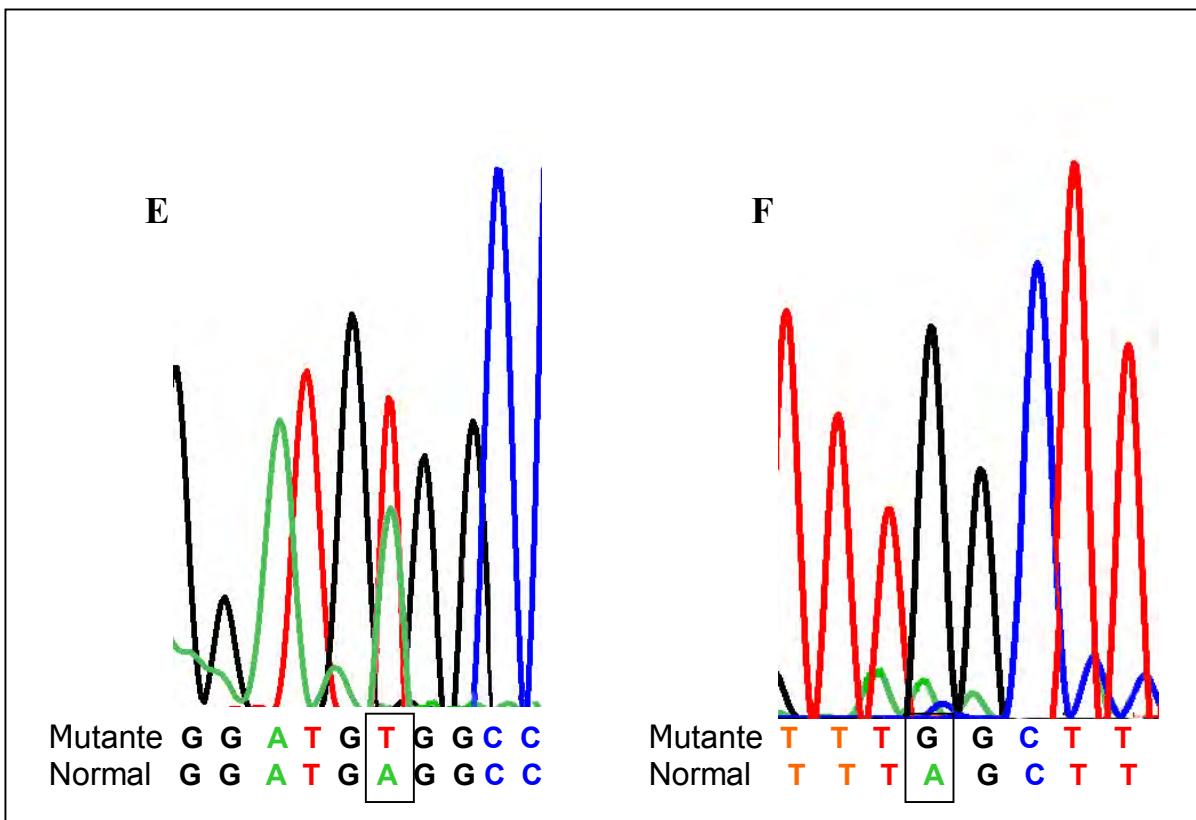


Figura 3

(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 imunoistoquímica. Todas as mutações encontradas eram somáticas, pois as células da mucosa normal contralateral do paciente não apresentaram mutação.

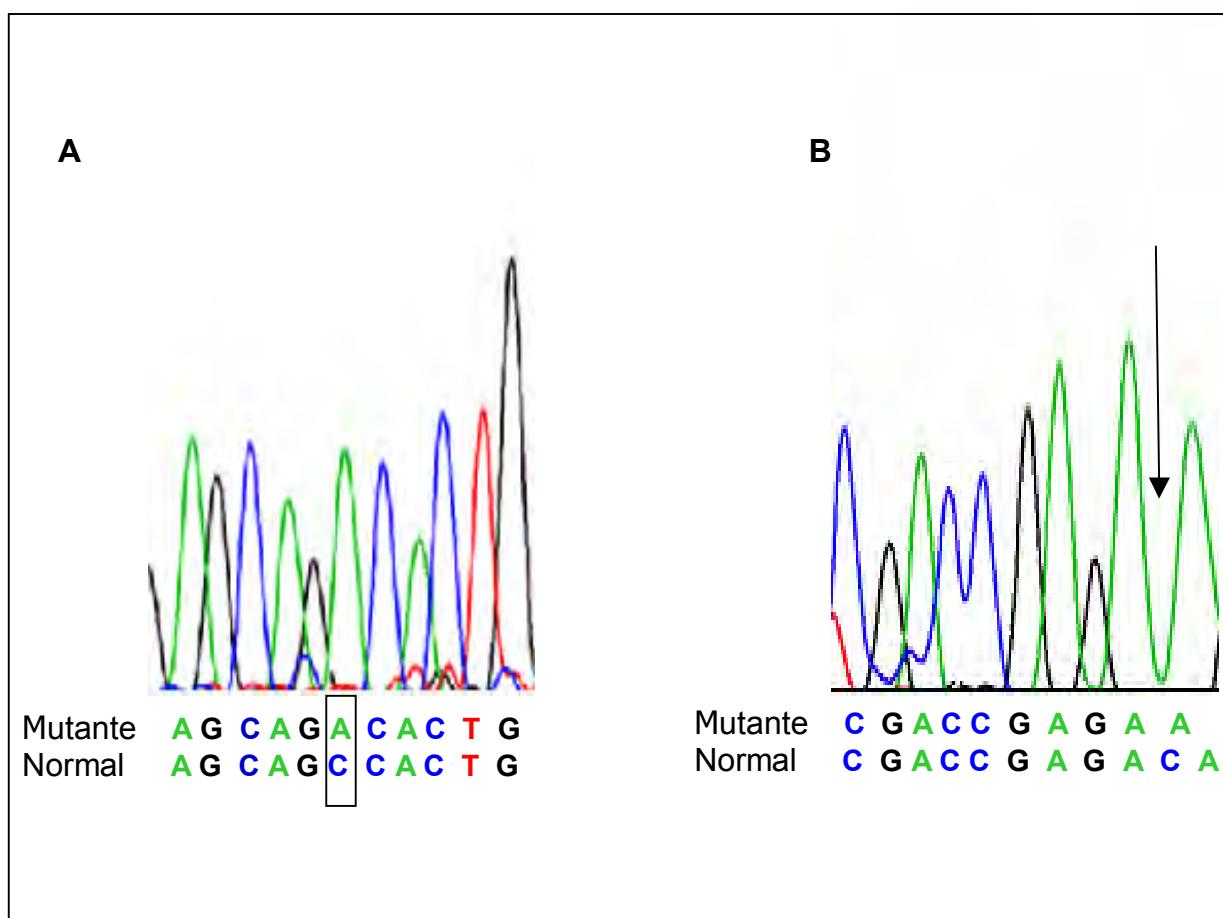
Ambos os tumores apresentaram mutações não previamente descritas, no exon 6. O caso # 6 (tabela 6) apresentou mutação em ponto (C725A)(figura 4A), que levou à troca não conservada de um aminoácido em uma região conservada do gene (A213D). A citosina 725 é altamente conservada não somente entre as

espécies, mas também entre as quatro subunidades do tretrâmero 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 (R _{Ia})	G T P R A A T V K A K
PRKARIB (R _{Ib})	G T P R A A T V K A K
PRKARIIA (R _{IIa})	N T P R A A T I V A T
PRKARIIB (R _{IIb})	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- α 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- α , as subunidades R2- α e/ou R2- β estavam aumentadas ($p < 0,05$) (figura 7) e (tabela 6).

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

Figura 5

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

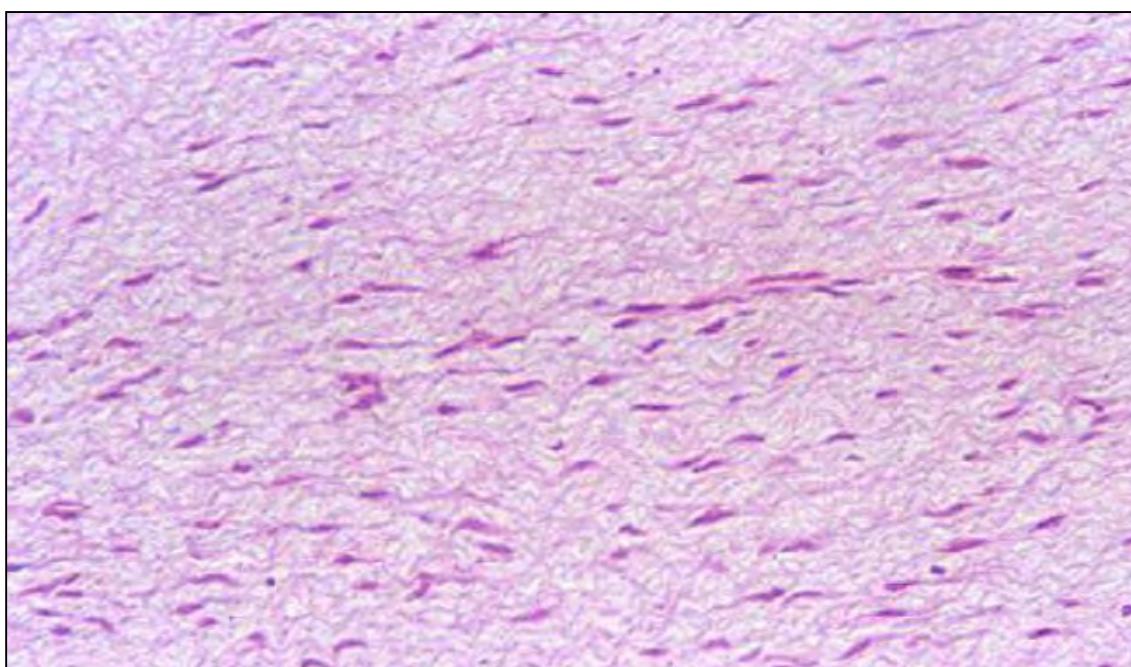


Figura 6

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

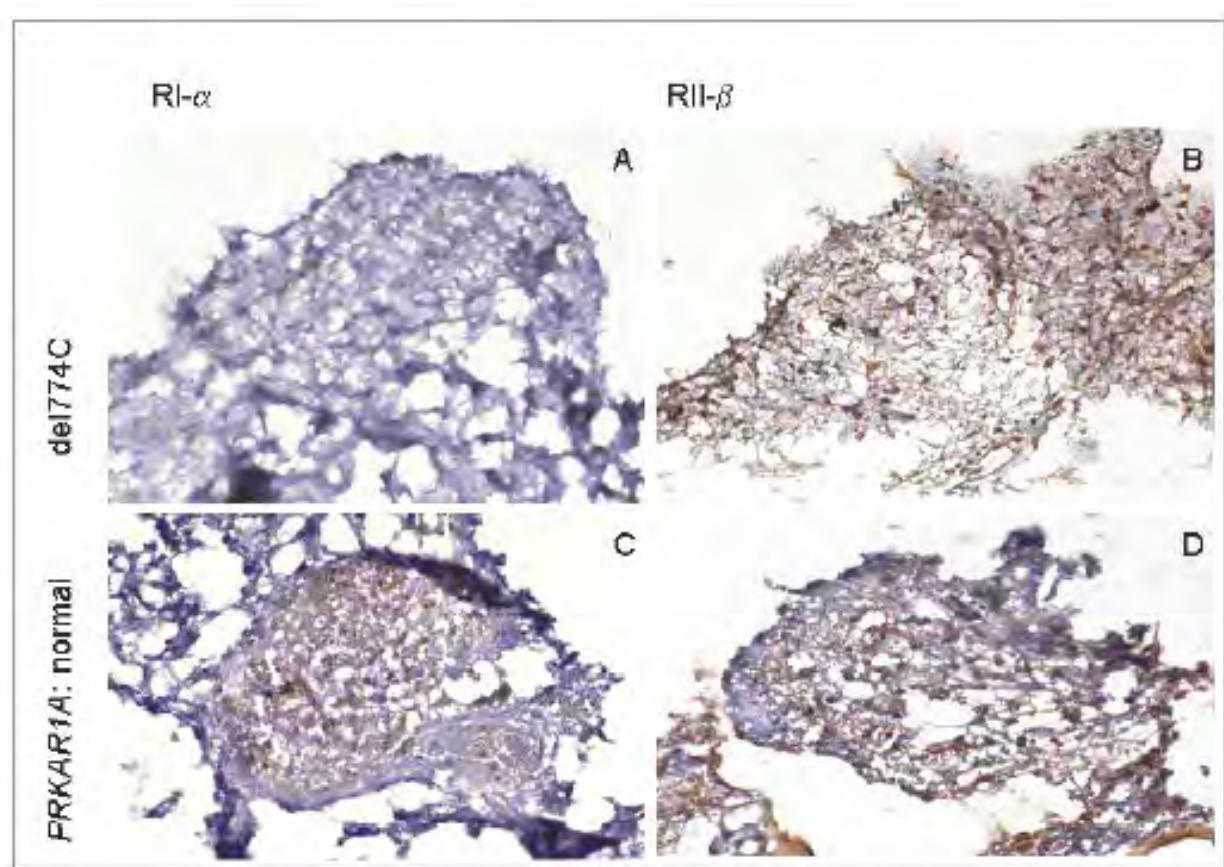


Figura 7

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

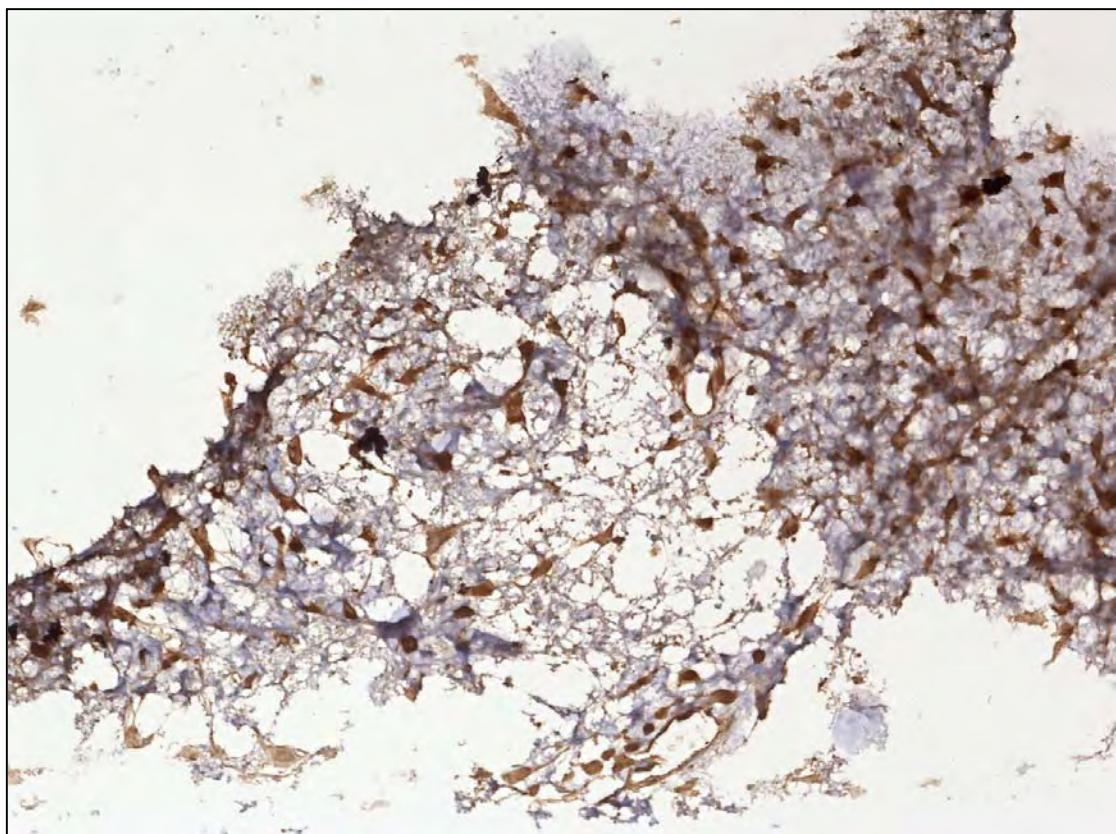


Figura 8

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 α (x400) na maioria das células; (C) mixoma faringeano (HE, x40); (D) mixoma faríngeo mostrando marcação negativa para R1 α (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) significante heterogeneidade celular.

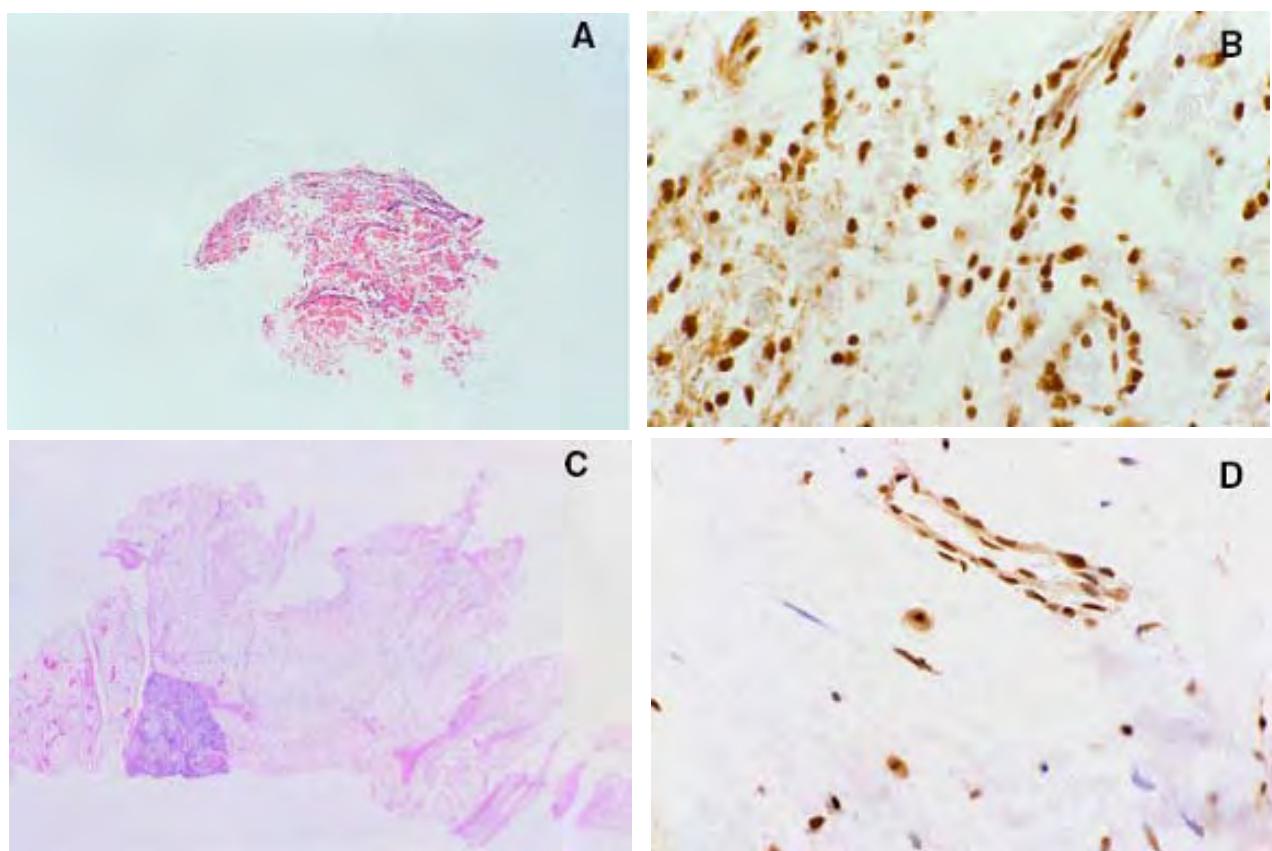


Tabela 6

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

Tumor	PRKARIA (R1- α)	PRKARIIA (R2- α)	PRKAR2-B (R2- β)	<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 imunoistoquímica 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 β -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 β -catenina e somente uma única mutação no códon 45 desse gene foi encontrada em um ameloblastoma folicular. O padrão de marcação da proteína β -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 β -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 proteíca, 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 cascadas 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 (α -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 PWMPRPREHETQQ 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 diferenciassem; consequentemente, 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; Dijkhoven *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- α , e aumento das subunidades R2- β e R2- α . 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 α -hélice das proteínas (Ferreira e Felice, 2001). O ácido aspártico por sua vez está relacionado às regiões terminais da estrutura folha β -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 catalítivas, inclusive pela sua inibição (MnKnight *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, alterantivamente, 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 aminoáciodes após o local da mutação. De forma similar a outras mutações do *PRKAR1A*, essa também ativaría 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 imunomarcação semelhantes aos tumores mutados. Algumas mudanças genéticas, além de mutações, poderiam ser responsáveis pela diminuição na marcação da R1- α 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 freqüência 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 freqüência 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, Lavialle 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, Rosenblom 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 cardiacmyxomas 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, Luttges 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, Ichihara 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.** Gritli-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.** Helder 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 Smoothened 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 (R α) 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 I α 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, Muhlhäuser 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 R_ialpha 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, Josefson 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, Oigny 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, Merkx 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, Jahnson 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. Epithelialmesenchymal 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 R1alpha 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.

Genes, Chromosomes and Cancer

Copy of e-mail Notification

z3v1107

Your article (# 05-0080) from "Genes, Chromosomes and Cancer" is available for download

=====

Dear Author,

Your page proofs for "Genes, Chromosomes and Cancer" are now ready for your review. John Wiley & Sons has made this article available to you online for faster, more efficient editing. Please follow the instructions below and you will be able to access a PDF version of your article as well as relevant accompanying paperwork.

First, make sure you have a copy of Adobe Acrobat Reader software. This is free software and is available on the web (<http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep.html>).

Open your web browser, and enter the following web address:

<http://rapidproof.cadmus.com/RapidProof/retrieval/index.jsp>

You will be prompted to log in, and asked for a password. Your login name will be your email address, and your password will be ----.

Example:

Login: your e-mail address

Password: ----

The site contains one file, containing:

- Author Instructions Checklist
- Adobe Acrobat Users - NOTES tool sheet
- Reprint Order form
- Copyright transfer agreement form
- A copy of your page proofs for your article

Print out this file, and fill out the forms by hand. (If you do not wish to order reprints, please mark a "0" on the reprint order form.) Read your page proofs carefully, and:

- indicate changes or corrections in the margin of the page proofs
- answer all queries (footnotes A,B,C, etc.) on the last page of the PDF proof
- proofread any tables and equations carefully
- check your figure legends for accuracy

Within 48 hours, please return via fax or express mail all materials to the address given below. This will include:

- 1) Page proofs with corrections
- 2) Reprint Order form

Return to:

Michael Bond
Production Editor, Journals
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street

Genes, Chromosomes and Cancer

Copy of e-mail Notification

z3v1107

Hoboken, NJ 07030
Phone: 201-748-8851
Fax: 201-748-6182
E-mail: mbond@wiley.com

Technical problems? If you experience problems downloading your file or any other problem with the website listed above, please contact Teressa Beard (beardt@cadmus.com, or 1-800-238-3814 (ext. 602) or 717-721-2602).

Questions regarding your article? Please don't hesitate to contact me with any questions about the article itself, or if you have trouble interpreting any of the questions listed at the end of your file. **REMEMBER TO INCLUDE YOUR ARTICLE NO. (# 05-0080) WITH ALL CORRESPONDENCE.** This will help both of us address your query most efficiently.

As this e-proofing system was designed to make the publishing process easier for everyone, we welcome any and all feedback. Thanks for participating in our new e-proofing system!

This e-proof is to be used only for the purpose of returning corrections to the publisher.

Sincerely,

Michael Bond
Production Editor, Journals
John Wiley & Sons, Inc.
111 River Street
Hoboken, NJ 07030
Phone: 201-748-8851
Fax: 201-748-6182
E-mail: mbond@wiley.com



WILEY

Publishers Since 1807

ELECTRONIC PROOF CHECKLIST, *GENES, CHROMOSOMES AND CANCER*

IMMEDIATE RESPONSE REQUIRED

Please follow these instructions to avoid delay of publication.

READ PROOFS CAREFULLY

- # This will be your only chance to review these proofs.
- # Please note that the volume and page numbers shown on the proofs are for position only. Your article will be corrected as soon as possible and is scheduled to be published online in advance of print as soon as the corrections have been made (Wiley EarlyView).

ANSWER ALL QUERIES ON PROOFS (Queries for you to answer are attached as the last page of your proof.)

- # Mark all corrections directly on the proofs. Note that excessive author alterations may ultimately result in delay of publication and extra costs may be charged to you.

CHECK FIGURES AND TABLES CAREFULLY (Color figures will be sent under separate cover.)

- # Check size, numbering, and orientation of figures.
- # All images in the PDF are downsampled (reduced to lower resolution and file size) to facilitate Internet delivery. These images will appear at higher resolution and sharpness in the printed article.
- # Review figure legends to ensure that they are complete.
- # Check all tables. Review layout, title, and footnotes.

COMPLETE REPRINT ORDER FORM

- # Fill out the attached reprint order form. It is important to return the form even if you are not ordering reprints. You may, if you wish, pay for the reprints with a credit card. Reprints will be mailed only after your article appears in print. This is the most opportune time to order reprints. If you wait until after your article comes off press, the reprints will be considerably more expensive.

RETURN

- PROOFS**
 REPRINT ORDER FORM
 CTA (If you have not already signed and sent one)

RETURN WITHIN 48 HOURS OF RECEIPT VIA FAX TO Michael Bond at 201-748-6182.

QUESTIONS?

Michael Bond, Production Editor

Phone: 201-748-8851

E-mail: mbond@wiley.com

Refer to journal acronym and article production number
(i.e., GCC 00-001 for GCC ms 00-001).

Softproofing for advanced Adobe Acrobat Users – NOTES tool

NOTE: ACROBAT READER FROM THE INTERNET DOES NOT CONTAIN THE NOTES TOOL USED IN THIS PROCEDURE.

Acrobat annotation tools can be very useful for indicating changes to the PDF proof of your article. By using Acrobat annotation tools, a full digital pathway can be maintained for your page proofs.

The NOTES annotation tool can be used with either Adobe Acrobat 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Other annotation tools are also available in Acrobat 6.0, but this instruction sheet will concentrate on how to use the NOTES tool. Acrobat Reader, the free Internet download software from Adobe, DOES NOT contain the NOTES tool. In order to softproof using the NOTES tool you must have the full software suite Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0 installed on your computer.

Steps for Softproofing using Adobe Acrobat NOTES tool:

1. Open the PDF page proof of your article using either Adobe Acrobat Exchange 6.0 or Adobe Acrobat 7.0. Proof your article on-screen or print a copy for markup of changes.
2. Go to Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 6.0) or Edit/Preferences/Commenting (in Acrobat 7.0) check “Always use login name for author name” option. Also, set the font size at 9 or 10 point.
3. When you have decided on the corrections to your article, select the NOTES tool from the Acrobat toolbox (Acrobat 6.0) and click to display note text to be changed, or Comments/Add Note (in Acrobat 7.0).
4. Enter your corrections into the NOTES text box window. Be sure to clearly indicate where the correction is to be placed and what text it will effect. If necessary to avoid confusion, you can use your TEXT SELECTION tool to copy the text to be corrected and paste it into the NOTES text box window. At this point, you can type the corrections directly into the NOTES text box window. **DO NOT correct the text by typing directly on the PDF page.**
5. Go through your entire article using the NOTES tool as described in Step 4.
6. When you have completed the corrections to your article, go to Document/Export Comments (in Acrobat 6.0) or Comments/Export Comments (in Acrobat 7.0). Save your NOTES file to a place on your harddrive where you can easily locate it. **Name your NOTES file with the article number assigned to your article in the original softproofing e-mail message.**
7. **When closing your article PDF be sure NOT to save changes to original file.**
8. To make changes to a NOTES file you have exported, simply re-open the original PDF proof file, go to Document/Import Comments and import the NOTES file you saved. Make changes and reexport NOTES file keeping the same file name.
9. When complete, attach your NOTES file to a reply e-mail message. Be sure to include your name, the date, and the title of the journal your article will be printed in.

C1



WILEY

Publishers Since 1807

Please complete this form even if you are not ordering reprints. This form **MUST** be returned with your corrected proofs and original manuscript. Your reprints will be shipped approximately 4 weeks after publication. Reprints ordered after printing will be substantially more expensive.

JOURNAL Genes, Chromosomes and Cancer VOLUME _____ ISSUE _____

TITLE OF MANUSCRIPT

MS. NO. NO. OF AUTHOR(S)
PAGES

No. of Pages	100 Reprints	200 Reprints	300 Reprints	400 Reprints	500 Reprints
1-4	\$ 336	\$ 501	\$ 694	\$ 890	\$ 1052
5-8	469	703	987	1251	1477
9-12	594	923	1234	1565	1850
13-16	714	1156	1527	1901	2273
17-20	794	1340	1775	2212	2648
21-24	911	1529	2031	2536	3037
25-28	1004	1707	2267	2828	3388
29-32	1108	1894	2515	3135	3755
33-36	1219	2092	2773	3456	4143
37-40	1329	2290	3033	3776	4528

**REPRINTS ARE ONLY AVAILABLE IN LOTS OF 100. IF YOU WISH TO ORDER MORE THAN 500 REPRINTS, PLEASE CONTACT OUR REPRINTS DEPARTMENT AT (212) 850-8789 FOR A PRICE QUOTE.

Please send _____ reprints of the above article at \$ _____
me _____

Please add appropriate State and Local Tax (Tax Exempt
No. _____) \$ _____

for United States orders only. Please add 5% Postage and Handling \$ _____

TOTAL AMOUNT OF ORDER** \$ _____

***International orders must be paid in currency and drawn on a U.S. bank*

Please check one: Check enclosed Bill me Credit Card

If credit card order, charge to: American Express Visa MasterCard

Credit Card No _____ Signature _____ Exp. Date _____

BILL TO: _____ **SHIP TO:** (Please, no P.O. Box numbers)
Name _____

Institution _____ Address _____

Address _____ Address _____

Purchase Order No. _____ Phone _____ Fax _____
E-mail _____

COPYRIGHT TRANSFER AGREEMENT

Date:

To:

Production/Contribution

ID# _____

Publisher/Editorial office use
only

Re: Manuscript entitled _____ (the "Contribution") for publication in ***Genes, Chromosomes and Cancer*** (the "Journal") published by Wiley-Liss, Inc., a subsidiary of John Wiley & Sons, Inc. ("Wiley").

Dear Contributor(s):

Thank you for submitting your Contribution for publication. In order to expedite the editing and publishing process and enable Wiley to disseminate your work to the fullest extent, we need to have this Copyright Transfer Agreement signed and returned to us as soon as possible. If the Contribution is not accepted for publication this Agreement shall be null and void.

A. COPYRIGHT

1. The Contributor assigns to Wiley, during the full term of copyright and any extensions or renewals of that term, all copyright in and to the Contribution, including but not limited to the right to publish, republish, transmit, sell, distribute and otherwise use the Contribution and the material contained therein in electronic and print editions of the Journal and in derivative works throughout the world, in all languages and in all media of expression now known or later developed, and to license or permit others to do so.
2. Reproduction, posting, transmission or other distribution or use of the Contribution or any material contained therein, in any medium as permitted hereunder, requires a citation to the Journal and an appropriate credit to Wiley as Publisher, suitable in form and content as follows: (Title of Article, Author, Journal Title and Volume/Issue Copyright [year] Wiley-Liss, Inc. or copyright owner as specified in the Journal.)

B. RETAINED RIGHTS

Notwithstanding the above, the Contributor or, if applicable, the Contributor's Employer, retains all proprietary rights other than copyright, such as patent rights, in any process, procedure or article of manufacture described in the Contribution, and the right to make oral presentations of material from the Contribution.

C. OTHER RIGHTS OF CONTRIBUTOR

Wiley grants back to the Contributor the following:

1. The right to share with colleagues print or electronic "preprints" of the unpublished Contribution, in form and content as accepted by Wiley for publication in the Journal. Such preprints may be posted

as electronic files on the Contributor's own website for personal or professional use, or on the Contributor's internal university or corporate networks/intranet, or secure external website at the Contributor's institution, but not for commercial sale or for any systematic external distribution by a third party (e.g., a listserve or database connected to a public access server). Prior to publication, the Contributor must include the following notice on the preprint: "This is a preprint of an article accepted for publication in [Journal title] © copyright (year) (copyright owner as specified in the Journal)". After publication of the Contribution by Wiley, the preprint notice should be amended to read as follows: "This is a preprint of an article published in [include the complete citation information for the final version of the Contribution as published in the print edition of the Journal]", and should provide an electronic link to the Journal's WWW site, located at the following Wiley URL: <http://www.interscience.Wiley.com/>. The Contributor agrees not to update the preprint or replace it with the published version of the Contribution.

2. The right, without charge, to photocopy or to transmit online or to download, print out and distribute to a colleague a copy of the published Contribution in whole or in part, for the Colleague's personal or professional use, for the advancement of scholarly or scientific research or study, or for corporate informational purposes in accordance with Paragraph D.2 below.
3. The right to republish, without charge, in print format, all or part of the material from the published Contribution in a book written or edited by the Contributor.
4. The right to use selected figures and tables, and selected text (up to 250 words, exclusive of the abstract) from the Contribution, for the Contributor's own teaching purposes, or for incorporation within another work by the Contributor that is made part of an edited work published (in print or electronic format) by a third party, or for presentation in electronic format on an internal computer network or external website of the Contributor or the Contributor's employer.
5. The right to include the Contribution in a compilation for classroom use (course packs) to be distributed to students at the Contributor's institution free of charge or to be stored in electronic format in datarooms for access by students at the Contributor's institution as part of their course work (sometimes called "electronic reserve rooms") and for in-house training programs at the Contributor's employer.

D. CONTRIBUTIONS OWNED BY EMPLOYER

1. If the Contribution was written by the Contributor in the course of the Contributor's employment (as a "work-made-for-hire" in the course of employment), the Contribution is owned by the company/employer which must sign this Agreement (in addition to the Contributor's signature), in the space provided below. In such case, the company/employer hereby assigns to Wiley, during the full term of copyright, all copyright in and to the Contribution for the full term of copyright throughout the world as specified in paragraph A above.
2. In addition to the rights specified as retained in paragraph B above and the rights granted back to the Contributor pursuant to paragraph C above, Wiley hereby grants back, without charge, to such company/employer, its subsidiaries and divisions, the right to make copies of and distribute the published Contribution internally in print format or electronically on the Company's internal network. Upon payment of Wiley's reprint fee, the institution may distribute (but not resell) print copies of the published Contribution externally. Although copies so made shall not be available for individual resale, they may be included by the company/employer as part of an information package included with software or other products offered for sale or license. Posting of the published Contribution by the institution on a public access website may only be done with Wiley's written permission, and payment of any applicable fee(s).

E. GOVERNMENT CONTRACTS

In the case of a Contribution prepared under U.S. Government contract or grant, the U.S. Government may reproduce, without charge, all or portions of the Contribution and may authorize others to do so, for official U.S. Government purposes only, if the U.S. Government contract or grant so requires. (U.S. Government Employees: see note at end.)

F. COPYRIGHT NOTICE

The Contributor and the company/employer agree that any and all copies of the Contribution or any part thereof distributed or posted by them in print or electronic format as permitted herein will include the notice of copyright as stipulated in the Journal and a full citation to the Journal as published by Wiley.

G. CONTRIBUTOR'S REPRESENTATIONS

The Contributor represents that the Contribution is the Contributor's original work. If the Contribution was prepared jointly, the Contributor agrees to inform the co-Contributors of the terms of this Agreement and to obtain their signature to this Agreement or their written permission to sign on their behalf. The Contribution is submitted only to this Journal and has not been published before, except for "preprints" as permitted above. (If excerpts from copyrighted works owned by third parties are included, the Contributor will obtain written permission from the copyright owners for all uses as set forth in Wiley's permissions form or in the Journal's Instructions for Contributors, and show credit to the sources in the Contribution.) The Contributor also warrants that the Contribution contains no libelous or unlawful statements, does not infringe upon the rights (including without limitation the copyright, patent, or trademark rights) or privacy of others, or contain material or instructions that might cause harm or injury.

CHECK ONE:

Contributor-owned work

Contributor's signature

Date

Type or print name and title

Co-contributor's signature

Date

Type or print name and title

ATTACH ADDITIONAL SIGNATURE PAGE AS NECESSARY

Company/Institution-owned work
(made-for-hire in the
course of employment)

Company or Institution (Employer-for-Hire)

Date
Authorized signature of Employer
Date

U.S. Government work

Note to U.S. Government Employees

A Contribution prepared by a U.S. federal government employee as part of the employee's official duties, or which is an official U.S. Government publication is called a "U.S. Government work," and is in the public domain in the United States. In such case, the employee may cross out Paragraph A.1 but must sign and return this Agreement. If the Contribution was not prepared as part of the employee's duties or is not an official U.S. Government publication, it is not a U.S. Government work.

U.K. Government work (Crown Copyright)

Note to U.K. Government Employees

The rights in a Contribution prepared by an employee of a U.K. government department, agency or other Crown body as part of his/her official duties, or which is an official government publication, belong to the Crown. In such case, Wiley will forward the relevant form to the Employee for signature.

RESEARCH ARTICLE

Molecular and Immunohistochemical Investigation of Protein Kinase A Regulatory Subunit Type 1A (*PRKAR1A*) in Odontogenic Myxomas

Paola F. Perdigão,^{1,2†} Sotirios G. Stergiopoulos,^{3†} Luiz De Marco,¹ Ludmila Matyakhina,³ Sosipatros A. Boikos,³ R. S. Gomez,² F. J. G. S. Pimenta,² and Constantine A. Stratakis^{2*}

¹Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas, Brazil

²Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas, Brazil

³Section on Genetics & Endocrinology, Developmental Endocrinology Branch, NICHD, NIH, Bethesda, Maryland

- AQ1 Odontogenic myxomas are rare benign neoplasms affecting the jaw. Myxomas of bones and other sites occur as part of Carney complex (CNC), a multiple neoplasia syndrome caused by mutations in the *PRKAR1A* gene, which codes for the regulatory subunit of protein kinase A (PKA). In the present study, 17 odontogenic myxomas from patients without CNC were screened for *PRKAR1A* mutations and *PRKAR1A* protein expression by immunohistochemistry (IHC). Mutations of the coding region of the *PRKAR1A* gene were identified in 2 tumors; both these lesions showed no or significantly decreased immunostaining of *PRKAR1A* in the tumor compared to that in the surrounding normal tissue. One mutation (c.725C>A) led to a nonconservative amino acid substitution in a highly conserved area of the gene (A213D); the other was a single base-pair deletion that led to a frameshift (del774C) and a stop codon 11 amino acids downstream of the mutation site; both tumors were heterozygous for the respective mutations. Of the remaining tumors, 7 of the 15 without mutations showed almost no *PRKAR1A* in the tumor cells, whereas IHC showed that the protein was abundant in nontumorous cells. We concluded that *PRKAR1A* may be involved by its down-regulation in the pathogenesis of odontogenic myxomas caused by mutations and/or other genetic mechanisms. Of the sporadic, nonfamilial tumors associated with *PRKAR1A* mutations, the odontogenic type was the first myxomatous lesion found to harbor somatic *PRKAR1A* sequence changes.

Published 2005 Wiley-Liss, Inc.[†]

INTRODUCTION

Odontogenic myxoma (OM) is a benign neoplasm that affect the jaw; most likely, it is derived from the tooth-forming ectomesenchyme (Curran et al., 2002). This tumor affects predominantly young adults, with no predilection for gender or any particular area of the jaw, although the mandible is generally more commonly involved than the maxilla (Hendler et al., 1979; Kaffe et al., 1997; Curran et al., 2002; Hisatomi et al., 2003). OM are locally invasive and have a propensity to recur frequently, especially if incompletely resected (Kaffe et al., 1997; Hisatomi et al., 2003). Microscopically, this tumor is composed of loosely arranged stellate, spindle-shaped, round cells in an abundant, loose myxoid stroma that contains only a few collagen fibrils; small islands of inactive-appearing odontogenic epithelial rests may be scattered throughout the myxoid ground substance (Lombardi et al., 1992; Quintal et al., 1994).

Cardiac myxomas and those of the skin and other locations are not substantially different histologically from OM. The same spindle-shaped cells appear in an abundant stroma of myxoid material (Acebo et al., 2003). Like OM, myxomas in other

locations most often occur sporadically and are not metastatic tumors or associated with any other specific symptomatology not expected from their location, size, and tendency to recur (Amano et al., 2003).

Carney complex (CNC), a multiple endocrine neoplasia syndrome associated with various types of myxomas, but not OM, is caused by mutations of the regulatory subunit 1A of protein kinase A (*PRKAR1A*; Kirschner et al., 2000a, 2000b). In CNC, myxomas are associated with spotty pigmentation of the skin and a variety of other tumors, both endocrine and nonendocrine (Carney et al., 1986). Mutations in the *PRKAR1A* gene have been associated with familial, isolated cardiac myxomas (Kirschner et al., 2000a), but sporadic, non-CNC-

[†]Dr. Perdigão and Dr. Stergiopoulos contributed equally to this work and are thus sharing first authorship.

*Correspondence to: Dr. Constantine A. Stratakis, Section on Endocrinology & Genetics, DEB, NICHD, NIH, Building 10, CRC, Room 1-3330 (East Laboratories), 10 Center Dr., MSC 1103, Bethesda, MD 20892. E-mail: stratakc@mail.nih.gov

Received 25 February 2005; Accepted 19 May 2005

DOI 10.1002/gcc.20232

Published online 00 Month 2005 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com).

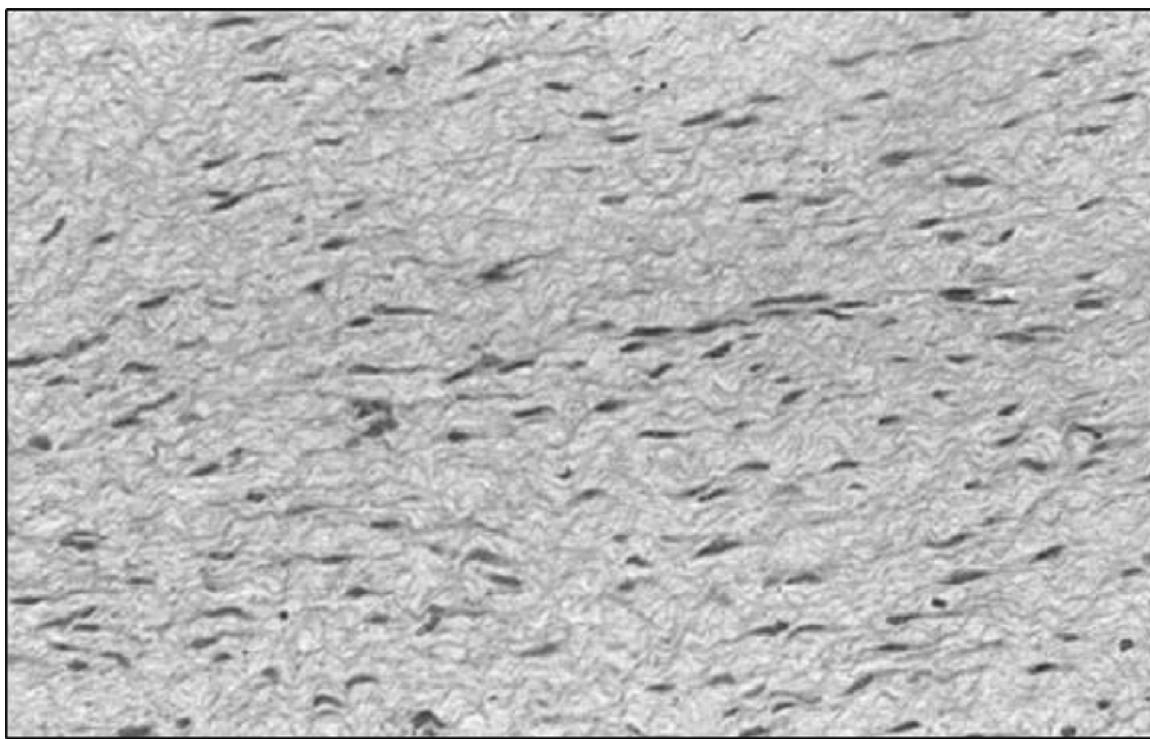


Figure 1. All OM^s had typical histological features of myxomatous tumors: they were characterized by loosely arranged stellate, spindle-shaped, round cells in an abundant stroma (hematoxylin and eosin staining, $\times 40$).

associated myxomas have not been found to harbor changes in this gene or in the CNC genetic loci (Dijkhuizen et al., 2001; Fogt et al., 2002).

Protein kinase A (PKA) is a heterotetramer consisting of two homodimers, one composed of regulatory (R) subunit and the other of catalytic (C) subunits. *PRKAR1A* codes for the main R subunit of PKA, RI- α (Bossis et al., 2004). After cAMP binds to the regulatory subunits, the catalytic subunit dissociates and becomes active as a serine-threonine kinase (Dijkhuizen et al., 2001; Stratatakis et al., 2002). PKA signaling is essential in embryonic meso- and ectodermal differentiation and interacts with a number of other pathways in early morphogenesis (Amieux et al., 2002; Bossis et al., 2004; Jia et al., 2004).

In the present study, we investigated OM^s collected in our department over the years from patients who had no features of CNC or any other multiple neoplasia syndrome. We confirmed their diagnosis histologically, removed any tumors with questionable or mixed features, and, after microdissection, checked for *PRKAR1A* sequence changes and RI- α protein expression in a total of 17 OM^s. The results of this investigation support the possibility of a role for *PRKAR1A* in the molecular pathogenesis of sporadic OM.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Seventeen paraffin-embedded OM samples from unidentified patients who did not have any other associated diagnoses were retrieved from the archives of our department. New sections were made and processed for hematoxylin and eosin (H&E) staining (Fig. 1) and other staining where needed (data not shown). The study was approved by our local review board. All material was reviewed by an independent pathologist to confirm diagnosis.

F1

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry (IHC) was performed for the PKA regulatory subunits (Fig. 2), largely as described previously but with a few modifications (Sandrini et al., 2002a; Bertherat et al., 2003), according to the DAB method using an automated IHC staining module (NexES, Ventana Medical Systems Inc, Tucson, AZ). Briefly, paraffin sections (5 μ m) were deparaffinized with xylene (for 30 min), then rehydrated by passage through graded alcohol solutions (70%–100%) for 2 min each and then soaked in nuclease-free water (for 10 min). Antigen unmasking was performed using 10 mM

F2

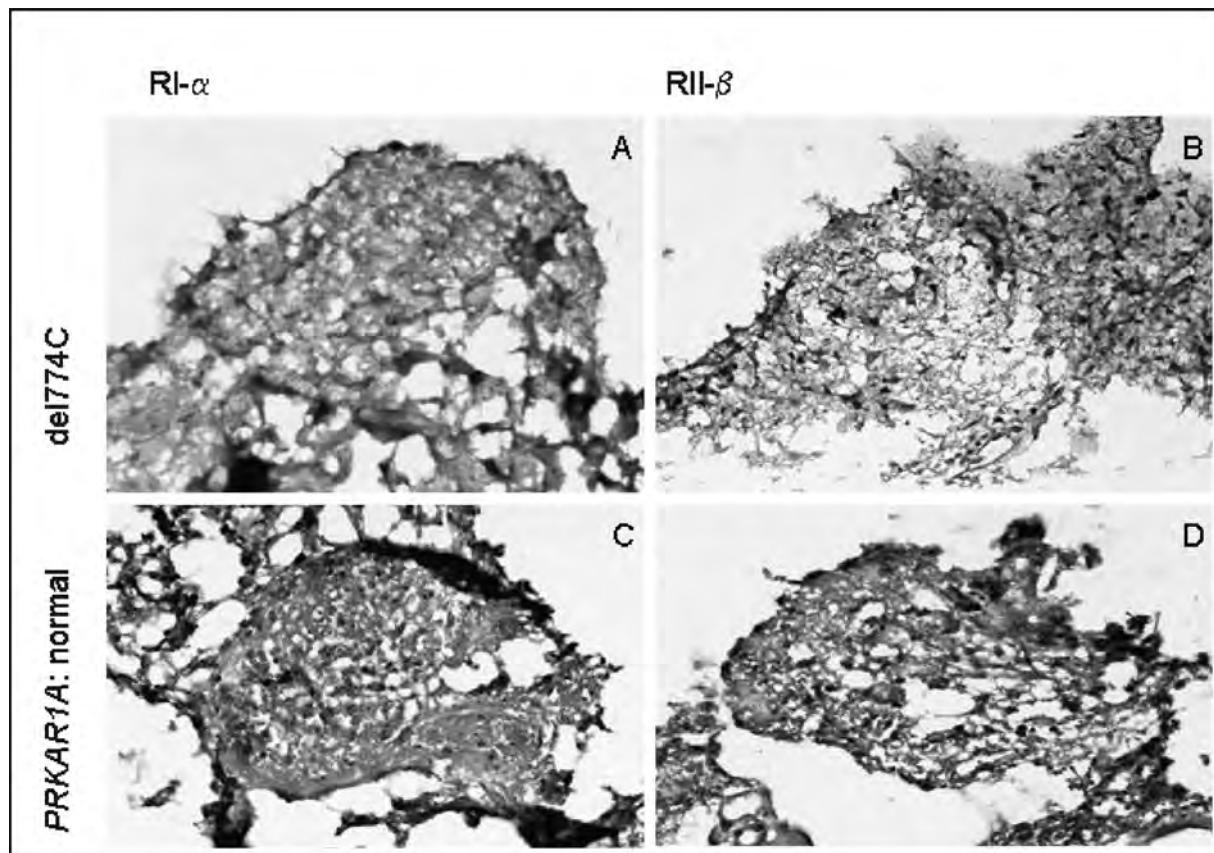


Figure 2. (A) Normal immunostaining for RI- α in a tumor with a normal *PRKAR1A* sequence; (B) decreased staining for the protein in the specimen with the del774C mutation; (C) increased staining for RII- β in the sample with the mutation compared to that in the specimen with the normal sequence; (D) specimen with normal sequence.

sodium citrate buffer (pH 6.0) for 30 min at 100°C in a steamer. Prepared slides were then placed in the NexES IHC staining module for automated antibody staining using a standardized protocol. Tissue sections were sequentially incubated with primary mouse-raised monoclonal antibodies to human RI- α and the other regulatory subunits, types IIA and IIB (RII- α and RII- β , respectively), and the most abundant catalytic subunit, C- α (EMD Biosciences, San Diego, CA) as described previously. Briefly, the RI- α antibody was diluted 1:100 in PBS/1% BSA for 32 min at room temperature, washed in 0.01M PBS, incubated with biotinylated rabbit antimouse secondary antibody (Vector Laboratories, Burlingame, CA), diluted 1:100 in 0.01M PBS for 32 min, also at room temperature, and subsequently incubated with peroxidase-conjugated streptavidin (Vector Laboratories, Burlingame, CA) for 8 min. Slides were then rinsed in PBS and finally incubated with 3,3'-diaminobenzidine/H₂O₂ (DAB; Sigma, Germany) substrate for 8 min. Sections were counterstained with hematoxylin before mounting with coverslips. Dental follicular tissue was used as control tissue. The dilutions and the procedure used were similar for the other antibodies (Sandrini et al., 2002; Bertherat et al., 2003).

In addition to control tissue from within the OM specimens, a pharyngeal myxoma from a non-CNC patient and a heart myxoma from another non-CNC patient, both of whom had been screened and found negative for any *PRKAR1A* sequencing mutations (see below) also were processed for IHC (Fig. 3) using the same antibodies and procedures.

F3

IHC Reading and Scoring

Several sections from each tumor were studied (at least 3–5 sections per lesion and PKA subunit) as reported elsewhere (Sandrini et al., 2002a; Bertherat et al., 2003). Each specimen was evaluated by each reader from the two study teams, all of whom were blind to and without access to the mutation status of the particular sample. Staining was assigned one of four grades: 0 for nonstaining,

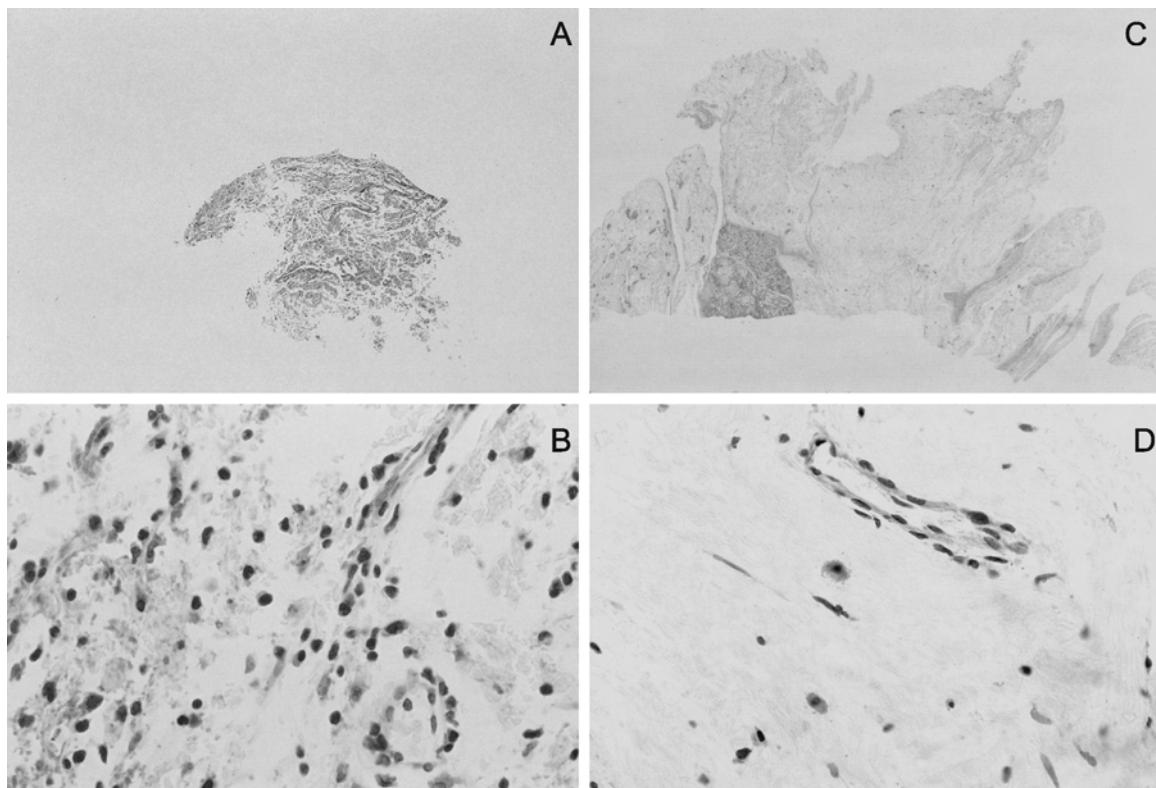


Figure 3. Control, sporadic myxomatous tumors without *PRKAR1A* mutations from patients without CNC: (A) heart myxoma (hematoxylin and eosin staining, $\times 40$); (B) most cells of this tumor staining positive for RI- α ($\times 400$); (C) pharyngeal myxoma (hematoxylin and eosin staining, $\times 40$); (D) most spindle-shaped myxoid tumor cells in this lesion

staining negative for RI- α ($\times 400$), although endothelial cells layering a single blood vessel (arrow) expressed this protein, providing an internal positive control. Like the odontogenic myxomas studied in this report, all lesions demonstrated significant cellular heterogeneity.

1 for weak staining, 2 for moderate staining, and 3 for strong staining. All staining was cytoplasmic (mostly perinuclear), and some was nuclear. No differences between specimens in subcellular distribution of RI- α were observed (data not shown). Table 1 shows the summative readings for all lesions.

DNA Analysis

DNA was extracted from frozen and/or paraffin-embedded tissue samples as previously described (Boom et al., 1990; Boson et al., 1998); exons 1–10 and flanking intronic sequences of the *PRKAR1A* gene were analyzed using a method and conditions described previously (Boom et al., 1990; Boson et al., 1998; Kirschner et al., 2000a). Briefly, all polymerase chain reactions (PCR) were performed in a final volume of 50 μ l containing 200 ng of template DNA, 200 μ mol/l dNTPs, 10 pmol/l of each primer, and 1.25 U *Taq* polymerase. Thirty-five cycles of amplification were done in a PTC-100-60 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA). Sequencing reactions were carried out using a Big-Dye terminator kit and a DNA Sequencer ABI

PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA).

The original sequence alterations were confirmed by subcloning as we described previously (Kirschner et al., 2000a). All sequencing was performed in duplicate, confirmed with both sense and antisense sequencing and in different amplification products from the same samples. The numbering of nucleotides and amino acids refers to the complete cDNA sequence of *PRKAR1A* (GenBank: NM002734; Kirschner et al., 2000b).

Statistical Analysis

A statistical analysis comparing the intensity of the staining between PKA subunits was obtained by χ^2 testing, with Fischer correction where appropriate, using the Statistica software package (Stat Soft, Inc., Tulsa, OK).

RESULTS

Diagnosis and IHC for PKA Subunits

The diagnosis was confirmed in all samples after H&E staining (data not shown) and reviewed by

PKA AND DENTAL TUMORS

5

TABLE I. Odontogenic Myxomas: Results of Immunostaining of PKA Subunits and of Sequencing Analysis of the *PRKAR1A* Gene

Tumor	<i>PRKAR1A</i> (RI α)	<i>PRKAR2A</i> (RII α)	<i>PRKAR2B</i> (RII β)	<i>PRKAR1A</i> Seq.
1 6477	2	1	NA	
2 5246	0	1	1	
3 10174	0	3	0	del774C
4 3781	0	3	1	
5 6	0	2	1	
6 13165	0	3	1	c.725C>A
7 5217	1	NA	0	
8 10353	1	2	0	
9 14273	0	2	2	
10 843	1	2	0	
11 17284	0	1	0	
12 4226	0	2	0	
13 16959	1	1	1	
14 9145	1	1	NA	
15 14903	1	2	0	
16 14270	1	1	1	
17 701	0	2	NA	

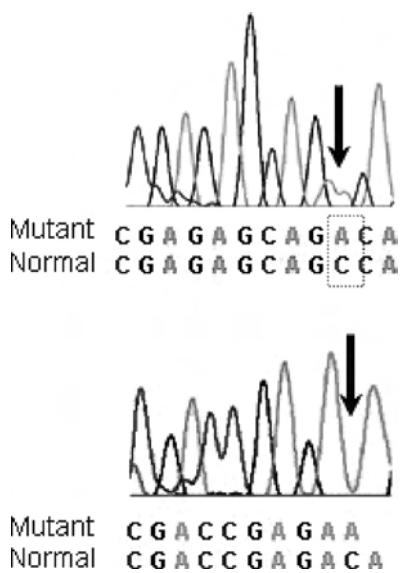


Figure 4. Sequence of the two identified *PRKAR1A* mutations: c.725C>A (upper panel) and del774C (lower panel).

staff pathologists. Typical histological features of a myxoma, such as loosely arranged stellate, spindle-shaped, round cells in an abundant, loose myxoid stroma, were present in all samples, such as the one shown in Figure 1.

Staining for PRKAR1A (RI α) was compared in normal and abnormal structures in the same specimen (Fig. 2) and with that in other myxomatous tumors known to have a normal *PRKAR1A* sequence (Fig. 3). Significant heterogeneity in individual cell types was seen in tumor specimens; however, scoring for immunostaining was limited

to the spindle-shaped, fibroblastoid, myxoid-producing cells considered the culprit in human myxomatous tumors (Acebo et al., 2003).

Overall, RI α staining in the tumorous decreased compared to that in the surrounding normal tissue in 9 of 17 dental myxomas (53%; Table 1). In the samples in which RI α staining decreased, RII α and/or RII β increased ($P < 0.05$; Fig. 2). No significant changes occurred in the staining for C α P agt; 0.1)

DNA Analysis

All samples were sequenced independently of the IHC results. Of the 17 tumors, 2 harbored previously undescribed mutations of the *PRKAR1A* gene (Fig. 4). One tumor harbored a missense mutation in exon 6 of the gene (c.725C>A) that led to a nonconservative amino acid substitution in a highly conserved area of the gene (A213D). The c.725 cytosine was highly conserved not only between species but also between the 4 regulatory subunits of the PKA tetramer (Tables 2 and 3).

F4

T2 T3

The second tumor contained a single base-pair deletion (del774C) of the *PRKAR1A* gene (also in exon 6; Fig. 4) that led to a frameshift (D229E) and a stop codon (TGA) 11 amino acids downstream of the mutation site (L240X).

Both tumors were heterozygous for the respective mutations, which were not identified in normal tissue from these specimens (data not shown); in both, staining for the RI α protein was decreased (Fig. 2). No mutations were identified in the remaining 15 tumors, including the 7 that had decreased RI α protein expression in the tumor cells (Table 1).

DISCUSSION

The present study demonstrated decreased immunostaining for the protein product and occasional mutations of the *PRKAR1A* gene in OMs. These tumors have histological features of other myxomas (Lombardi et al., 1992; Quintal et al., 1994), such as those of cardiac and skin tissue (Acebo et al., 2003; Amano et al., 2003). OMs are rare tumors that do not occur as part of CNC (Stratakis et al., 2001). Their pathogenesis has not been extensively investigated, although some studies have suggested that increased expression of anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-X and the matrix metalloproteinase MMP-2 may underlie disease progression (Bast et al., 2003).

In the absence of genetic alterations for specific genes detected in any type of human myxomatous

TABLE 2.

Homo sapiensGGAGCAGTCGTT
PseudogeneGGAGCAGTCGTT
Pongo pygmaeusGGAGCAGTCGTT
Mus musculusGGAGCAGTCGTT
Rattus norvegicusGGAGCAGTCGTT
Canis familiarisGGAGCAGTCGTT
Oryctolagus cuniculusGGAGCAGTCGTT
Zebra fishGGCGCAGTCGTT
Pan troglodytesGGCGCAGTCGTT
Drosophila melanogasterGGCGCAGTCGTT
YeastAACGCAGTCGTT

tumors (DeMarco et al., 1996; Boson et al., 1998; Dijkhuizen et al., 2001; Fogt et al., 2002; Okamoto et al., 2002), the present data are particularly important. Not only were two mutations identified in a relatively small cohort of 17 patients with these (rare, anyway) tumors (11.8%), but also decreased expression of the RI- α protein was evident in almost half the remaining samples. The associated increase in expression of other PKA subunits (Fig. 2) supports the existence of a pathogenic process similar to that in other mutant *PRKAR1A*-associated tumors (Kirschner et al., 2000b; Sandrini et al., 2002; Bertherat et al., 2003), although in the present investigation frozen tissue was not available to correlate immunostaining with PKA enzymatic activity or actual protein quantitation.

The first mutation, c.725C>A (or A213D), is a missense mutation and, in that respect, is unusual among other *PRKAR1A* sequence changes associated with inherited or sporadic disease. To date, only four such mutations are known (Kirschner et al., 2000b; Stratakis et al., 2001; Stratakis and Sandrini, 2002; Vegeulers et al., 2004 and Stratakis et al., unpublished information), all in highly conserved areas of the gene. However, functional studies of these mutations have not been performed although their association with disease, their location in areas of the molecule highly conserved between species and other PKA subunits (Tables 1 and 2), and, most important, their absence in normal controls suggest that they are pathogenic. The A213D mutation is not only in the second cAMP-binding domain of the PRKAR1A protein, where it may interfere with the interaction of this protein with its ligand, but it is also just 3 amino acids from one of the main modules associated with interactions with the PKA C subunit (Kim et al., 2005). The change from an alanine (A) to aspartic acid (D) is a significant amino acid substitution that could have a severe effect on all the above functions.

Why was this mutation associated with decreased immunostaining for PRKAR1A in this specimen? The answer is not obvious from the above. We can only speculate that, perhaps, decreased release of the C subunit and thus turnover of all PKA subunits led to repression of *PRKAR1A* transcription or translation, as protein expression of these molecules is under tight control and depends on PKA tetramer status and activity (Bossis and Stratakis, 2004). Loss of the normal *PRKAR1A* allele could be an alternate explanation for the decreased protein expression; however, loss

PKA AND DENTAL TUMORS

7

AQ4

TABLE 3.

PKA subunits	Protein Sequence									
PrKarl alpha	G	T	P	R	A	A	T	V	K	A
PrKarl beta	G	T	P	R	A	A	T	V	K	A
PrKarl II alpha	N	T	P	R	A	A	T	I	V	A
PrKarl beta	N	T	P	R	A	A	T	I	T	A

of heterozygosity (LOH) has not been shown convincingly in any CNC myxoma associated with pathogenic *PRKAR1A* mutations (Tsilou et al., 2004). The limited tissue available from the archived specimens that we examined here did not allow us to test for the presence of LOH.

The second sequence change, del774C, resembled many of the described *PRKAR1A* mutations associated with CNC or sporadic tumors (Kirschner et al., 2000b; Bertherat et al., 2003): it caused a frameshift, leading to a stop codon 11 amino acids downstream of the mutation site. Like similar *PRKAR1A* mutations, it also would activate the nonsense mRNA-mediated decay (NMD) mechanism (Kirschner et al., 2000b) and would not lead to a detectably shorter protein product. The decrease in RI- α immunostaining for the specimen harboring the mutation, shown in Figure 2, could be explained by the expected 50% reduction of *PRKAR1A* expression in this tumor.

What genetic changes could be responsible for the decrease in RI- α immunostaining in the remaining tumors in the absence of any coding sequence *PRKAR1A* mutations? Although the possibility of noncoding sequence alterations has not been ruled out, such changes have not been described to date in patients with CNC or any sporadic conditions associated with *PRKAR1A* dysfunction (Kirschner et al., 2000b; Stratakis et al., 2001; Stratakis and Sandrini, 2002; Vegeulators et al., 2004). We speculate that tumor-development-related gene silencing through methylation or a related mechanism is the underlying explanation. The limited quantity and nature of our specimens did not allow testing this possibility, which may be the explanation for the down-regulation of *PRKAR1A* in sporadic adrenal tumors without *PRKAR1A*-coding sequence mutations (Bertherat et al., 2003).

It should be noted that a study of archived specimens such as the present one is limited by the quality of the specimens. Given the heterogeneity of myxomatous tumors (Fig. 3), it is possible that the present study underestimated the true incidence of *PRKAR1A* mutations in sporadic odontogenic myxomas. Nevertheless, the finding of an

11.8% rate of *PRKAR1A* mutations in this random sample of myxomatous lesions is not insignificant. It is lower than the rate of *PRKAR1A* mutations in sporadic adrenal adenomas (22%) (Bertherat et al., 2003) but higher than the corresponding rates in sporadic thyroid tumors (Sandrini et al., 2002a) and pituitary adenomas (Sandrini et al., 2002b). A similar study of sporadic heart myxomas (from non-CNC patients) failed to identify any *PRKAR1A* mutations (Farmakidis et al., 2001).

We also speculate that another biologic consequence of the heterogeneity in the studied specimens is that mutant *PRKAR1A*-induced alterations in various cell populations have the potential to affect intra- and intercellular signaling, promoting tumorigenicity in sporadic myxomatous lesions in a way similar to what has been reported for stromal–epithelial interactions in other settings (Barcellos-Hoff and Medina, 2005; Bhowmick and Moses, 2005).

We have concluded that *PRKAR1A* may be involved in the pathogenesis of odontogenic myxomas. Among sporadic, nonfamilial tumors, odontogenic myxomas are the first to be associated with changes in somatic *PRKAR1A* sequence and RI- α expression.

REFERENCES

- Acebo E, Val-Bernal JF, Gomez-Roman JJ, Revuelta JM. 2003. Clinicopathologic study and DNA analysis of 37 cardiac myxomas: a 28-year experience. *Chest* 123:1379–1385.
- Amano J, Kono T, Wada Y, Zhang T, Koide N, Fujimori M, Ito K. 2003. Cardiac myxoma: its origin and tumor characteristics. *Ann Thorac Cardiovasc Surg* 9:215–221.
- Amieux PS, McKnight GS. 2002. The essential role of RI alpha in the maintenance of regulated PKA activity. *Ann NY Acad Sci* 968: 75–95.
- Bast BT, Pogrel MA, Regezi JA. 2003. The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. *J Oral Maxillofac Surg* 61:1463–1466.
- Barcellos-Hoff MH, Medina D. 2005. New highlights on stroma–epithelial interactions in breast cancer. *Breast Cancer Res* 7:33–36.
- Bertherat J, Groussin L, Sandrini F, Matyakhina L, Bei T, Stergiopoulos S, Papageorgiou T, Bourdeau I, Kirschner LS, Vincent-Dejean C, Perlemoine K, Gicquel C, Bertagna X, Stratakis CA. 2003. 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* 63:5308–5319.
- Bhowmick NA, Moses HL. 2005. Tumor-stroma interactions. *Curr Opin Genet Dev* 15:97–101.
- Boom R, Sol CJ, Salimans MM, Jansen CL, Wertheim-van Dillen PM, van der Noordaa J. 1990. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. *J Clin Microbiol* 28:495–503.
- Boson WL, Gomez RS, Araujo L, Kalapothakis E, Friedman E, De Marco L. 1998. Odontogenic myxomas are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. *Anticancer Res* 18: 4415–4417.
- Bossis I, Stratakis CA. 2004. *PRKAR1A*: normal and abnormal functions. *Endocrinology* 145:5452–5458.
- Carney JA, Hruska LS, Beauchamp GD, Gordon H. 1986. Dominant inheritance of the complex of myxomas, spotty pigmentation, and endocrine overactivity. *Mayo Clin Proc* 61:165–172.
- Curran AE, Damm DD, Drummond JF. 2002. Pathologically significant pericoronal lesions in adults: histopathologic evaluation. *J Oral Maxillofac Surg* 60:613–618.

- DeMarco L, Stratakis CA, Boson WL, Jakbovitz O, Carson E, Andrade LM, Amaral VF, Rocha JL, Chrousos GP, Nördenskjold M, Friedman E. 1996. Sporadic cardiac myxomas and tumors from patients with Carney complex are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. *Hum Genet* 98:185–188.
- Dijkhuizen T, de Jong B, Meuzelaar JJ, Molenaar WM, van den Berg E. 2001. No cytogenetic evidence for involvement of gene(s) at 2p16 in sporadic cardiac myxomas: cytogenetic changes in ten sporadic cardiac myxomas. *Cancer Genet Cytogenet* 126:162–165.
- Farmakidis C, Sandrini F, Kirschner LS, Stratakis CA. 2001. The search for somatic mutations in the tumor suppressor gene coding for the R1α regulatory subunit of the cAMP-dependent protein kinase A in sporadic cardiac myxomas. National Institutes of Health Research Festival.
- Fogt F, Zimmerman RL, Hartmann CJ, Brown CA, Narula N. 2002. Genetic alterations of Carney complex are not present in sporadic cardiac myxomas. *Int J Mol Med* 9:59–60.
- Hendler BH, Abaza NA, Quinn P. 1979. Odontogenic myxoma. Surgical management and an ultrastructural study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 47:203–217.
- Hisatomi M, Asaumi J, Konouchi H, Yanagi Y, Matsuzaki H, Kishi K. 2003. 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* 9:152–157.
- Jia J, Tong C, Wang B, Luo L, Jiang J. 2004. Hedgehog signalling activity of Smoothened requires phosphorylation by protein kinase A and casein kinase I. *Nature* 432:1045–1050.
- Kaffe I, Naor H, Buchner A. 1997. Clinical and radiological features of odontogenic myxoma of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol* 26: 299–303.
- Kim C, Xuong NH, Taylor SS. 2005. Crystal structure of a complex between the catalytic and regulatory (R1α) subunits of PKA. *Science* 307:690–696.
- Kirschner LS, Carney JA, Pack SD, Taymans SE, Giatzakis C, Cho YS, Cho-Chung YS, Stratakis CA. 2000a. Mutations of the gene encoding the protein kinase A type I-alpha regulatory subunit in patients with the Carney complex. *Nat Genet* 26:89–92.
- Kirschner LS, Sandrini F, Monbo J, Carney JA, Stratakis CA. 2000b. Genetic heterogeneity and spectrum of mutation of the *PRKAR1A* gene in patients with the Carney complex. *Hum Mol Genet* 9:3037–3046.
- Lombardi T, Samson J, Bernard JP, Di Felice R, Fiore-Donno G, Muhlhauser J, Maggiano N. 1992. Comparative immunohistochemical analysis between jaw myxoma and mesenchymal cells of tooth germ. *Pathol Res Pract* 188:141–144.
- Okamoto S, Hisaoka M, Meis-Kindblom JM, Kindblom LG, Hashimoto H. 2002. 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* 440:12–15.
- Quintal MC, Tabet JC, Oigny L, Russo P. 1994. Oral soft tissue myxoma: report of a case and review of the literature. *J Otolaryngol* 23:42–45.
- Sandrini F, Matyakhina L, Sarlis NJ, Kirschner LS, Farmakidis C, Gimm O, Stratakis CA. 2002. Regulatory subunit type I-alpha of protein kinase A (*PRKAR1A*): a tumor-suppressor gene for sporadic thyroid cancer. *Genes Chromosomes Cancer*. 35:182–192.
- Sandrini F, Kirschner LS, Bei T, Farmakidis C, Yasufuku-Takano J, Takano K, Prezant TR, Marx SJ, Farrell WE, Clayton RN, Goussin L, Bertherat J, Stratakis CA. 2002. *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: e78.
- Sandrini F, Stratakis C. 2003. Clinical and molecular genetics of Carney complex. *Mol Genet Metab* 78:83–92.
- Stratakis CA. 2002. 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.
- Stratakis CA, Kirschner LS, Carney JA. 2001. Clinical and molecular features of the Carney complex: diagnostic criteria and recommendations for patient evaluation. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4041–4046.
- Tsilou ET, Chan CC, Sandrini F, Rubin BI, Shen de F, Carney JA, Kaiser-Kupfer M, Stratakis CA. 2004. Eyelid myxoma in Carney complex without *PRKAR1A* allelic loss. *Am J Med Genet* 130A: 395–397.
- Veugelers M, Wilkes D, Burton K, McDermott DA, Song Y, Goldstein MM, La Perle K, Vaughan CJ, O'Hagan A, Bennett KR, Meyer BJ, Legius E, Karttunen M, Norio R, Kaariainen H, Lavigne M, Neau JP, Richter G, Kirali K, Farnsworth A, Stapleton K, Morelli P, Takanashi Y, Bamforth JS, Eitelberger F, Noszian I, Manfroi W, Powers J, Mochizuki Y, Imai T, Ko GT, Driscoll DA, Goldmuir E, Edelberg JM, Collins A, Eccles D, Irvine AD, McKnight GS, Basson CT. 2004. Comparative *PRKAR1A* genotype-phenotype analyses in humans with Carney complex and *prkar1a* haploinsufficient mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 14222–14227.

AQ1: Note that human genes are designated with capital letters in italics (including numbers) and that the symbols should only contain Latin letters and Arabic numerals (i.e., no Greek letters or Roman numerals) and that there are no dashes or punctuations within the gene designation. All genes should be italicized. Proteins are designated as genes but are not italicized.

AQ2: Please provide locations (city/state if in U.S. or city/country if outside U.S.) of this and all suppliers that do not already have this information.

AQ3 Table 2 needs a caption.

AQ4 Table 3 needs a caption.





Ameloblastin gene (*AMBN*) mutations associated with epithelial odontogenic tumors[☆]

P.F. Perdigão^{a,b}, R.S. Gomez^b, F.J.G.S. Pimenta^b, L. De Marco^{a,c,*}

^aDepartment of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

^bDepartment of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 31270-901, Brazil

^cDepartment of Developmental Neurobiology, St Jude Children's Research Hospital, Memphis, TN 38105, USA

Received 15 March 2004; accepted 22 March 2004

KEYWORDS

Ameloblastin;
Epithelial odontogenic tumors;
AMBN;
Ameloblastoma

Summary Ameloblastin (*AMBN*, MIM *601259) gene expresses an important protein (*AMBN*), present in the organic matrix of enamel. The *AMBN* protein has an important role in the differentiation of ameloblast cells and epithelium-mesenchyme signaling during odontogenesis which prompted us to investigate this gene in aggressive epithelial odontogenic tumors, such as ameloblastomas, and in some non-aggressive ones, such as the adenomatoid odontogenic tumor and the squamous odontogenic tumor. Six cases of epithelial odontogenic tumors were studied and normal cells of the patient's mucosa were used as negative controls. The results demonstrated novel mutations in all tumors, while mucosal cells showed the wild type DNA sequence. Our data demonstrates that *AMBN* gene has an important role in the tumorigenesis of subtypes of epithelial odontogenic tumors and that this phenotypic heterogeneity could be caused by genetic heterogeneity.

© 2004 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Epithelial odontogenic tumors are histologically related to remnants of the odontogenic epithelium, which includes the dental lamina, the enamel organ, and the root sheath of Hertwig.^{1–4} Actively

growing dental lamina is present within the jaws for a considerable time after birth. Because of the widespread presence of odontogenic epithelium, some tumors may arise from residues of these cells in bone or in soft tissues such as the gingiva.¹ It has been demonstrated that odontogenesis and dental cytodifferentiation are tightly regulated events resulting from sequential and reciprocal epithelial-mesenchymal signalling^{5–7} that requires direct contact or matrix-mediated cell interaction.^{8,9} Some proteins of the enamel matrix have an important role to initiate these tightly regulated

[☆] Supported by grants from CNPq and Pronex, Brazil.

* Corresponding author. Tel.: +55-31-3499-2717 fax: +55-31-3499-2983.

E-mail addresses: ldemarco@ufmg.br, lui.zdemarco@stjude.org (L. De Marco).

processes of the cytodifferentiation.¹⁰ Ameloblastin (AMB) is the most important protein involved in these processes and shows high expression during the differentiation of inner enamel epithelium.^{11,12} The human *AMB* gene has been cloned and comprises a single-copy gene containing 13 exons with an open reading frame of 1341 bp that encodes 447 aminoacid¹¹ and also an alternatively spliced variant with a deletion of 12 aminoacid in exon 6 (GenBank AH09924). In humans, the *AMB* gene maps to chromosome 4q21. Mapping this protein matrix at this locus made *AMB* a strong candidate gene for autosomal dominant amelogenesis imperfecta¹³ a disease which was subsequently found to be caused by another organic matrix, enamelin.¹⁴

The World Health Organization classifies the epithelial odontogenic tumors in subtypes according to the presence or absence of odontogenic epithelium and odontogenic ectomesenchyme.¹⁵ Tumors comprising odontogenic epithelium include ameloblastoma, adenomatoid odontogenic tumor, calcifying epithelial odontogenic tumor and squamous odontogenic tumors.¹⁵ Ameloblastoma is an epithelial odontogenic tumor of the jawbones that is divided into three clinical-radiographic types. The solid type, or multicystic, is locally aggressive with high rates of the recurrence and causes marked facial deformity.³ The unicystic and peripheral subtypes of ameloblastoma are less aggressive and the recurrence rate is rare.^{16,17} The squamous odontogenic tumor is a rare benign odontogenic epithelial tumor that was first

described in 1975.¹⁸ Although this lesion does not show an invasive behaviour like that seen in solid ameloblastoma, recurrence is a relatively frequent event.¹⁸ Another tumor of the group is the adenomatoid odontogenic tumor that resembles a hamartoma.^{19,20} These tumors generally do not recur and because of its capsule, can be easily enucleated from the bone.²⁰

The objective of the present study is to demonstrate that the *AMB* gene has an important role in the differentiation of the undifferentiated epithelial odontogenic cells. We investigated a series of epithelial odontogenic tumors and showed that novel mutations of the *AMB* gene are responsible for their tumorigenesis.

Material and methods

In this report we studied two unicystic and two solid ameloblastomas, one adenomatoid odontogenic tumor and one squamous odontogenic tumor. These tumors were obtained during surgical removal procedure, after an informed written consent was signed. The University ethics committee also approved this work. Fixed tumor material was used for pathology review to confirm tumor diagnosis after a conventional hematoxylin eosin staining. All tumors studied showed typical histological features. Unicystic ameloblastoma consisted of a fibrous cyst wall with a lining that consists of ameloblastic epithelium (Fig. 1A). The

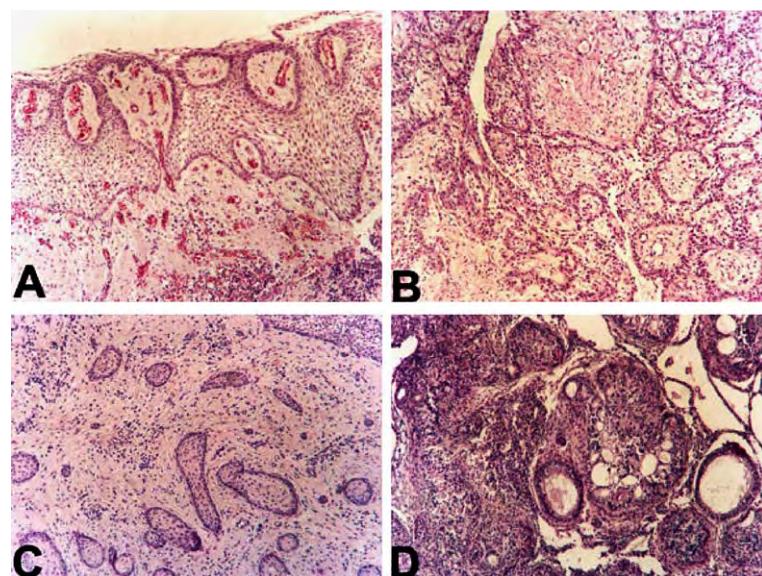


Figure 1 Photomicrographs depicting mutated epithelial odontogenic tumors. (A) Unicystic ameloblastoma, tumor #1; (B) Solid ameloblastoma, tumor #4; (C) Squamous odontogenic tumor #6; (D) Adenomatoid odontogenic tumor, tumor #5.

ameloblastoma plexiform showed interdigitating cords of epithelial cells and scant stellate reticulum (Fig. 1B). Follicular ameloblastoma demonstrated island of cells and a central loose meshwork of cells resembling stellate reticulum. Squamous odontogenic tumor consisted of varying-shape island of bland-appearing squamous epithelium in a mature fibrous connective tissue (Fig. 1C) and the adenomatoid odontogenic tumor was composed of spindle shaped epithelial cells that formed sheets, strands or whirl masses of cells in a scant stroma (Fig. 1D).

In addition, sections of 10 µm were obtained using a cryostat, stained with toluidine blue²¹ and then submitted to microdissection of tumors cells. Specimen samples were immediately stored at -70 °C for DNA extraction and mutation analyses. Furthermore, contra-lateral oral mucosa swabs were taken from each patient for DNA extraction and germline DNA sequencing. DNA extraction was carried out as previously described²² and all coding regions of the AMBN gene studied using specific PCR reaction conditions (Table 1). Briefly, PCR reactions were performed in a final volume of 50 µl containing 100 ng of template DNA, 200 µmol/l dNTPs, 10 pmol/L of each primer and 1.25 U Taq polymerase. Thirty-five cycles of amplification were done in a PTC-100-60 thermocycler (MJ

Research, Watertown, MA, USA) with the appropriate parameters. DNA sequencing reactions were carried out using the BigDye terminator kit and a DNA Sequencer ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, USA). Sequencing was performed in duplicate, both strands, from different amplification products. Mutation nomenclature follows published guidelines.²³ Numbering of nucleotide and aminoacid refers to the complete cDNA sequence (GenBank: AH009924).

Results

All amplified tumor cell products corresponded in size to those amplified from normal cells of the oral patient's mucosa, indicating that no major deletions/insertions were present. Sequencing analyses demonstrated that the AMBN gene was altered in all six tumors and different mutations were present (Table 2). All mutations were determined to be somatic in origin because of their absence in the matching germline DNA. In addition, since no polymorphisms were found in the coding regions of the AMBN gene in normal tissue, substitutions and the splicing site mutations found in these tumors are tumor-specific mutations. One unicystic ameloblastoma tumor had an 112C>A

Table 1 Primer sequences of the AMBN gene and their respective annealing temperatures

Exons	Primer sequence (5'-3')	Annealing temperature (°C)
1 and 2	F: ATCTTGGTTGGCATCATCAG R: CTAAGACTGACTTACCGGCAC	56
3	F: TTTCATTCACTCTTCCCTCAGC R: CTAGGAAAATGAGAACGACACG	60
4	F: AGCATATGCGATAAACAGTAACC R: TTACTCTGGTCTTCCAATCTTG	56
5	F: TTTAGTATTCTAGATACGGCTTG R: GAAGGCAAGTAAGAACAGGTTT	56
6	F: ACCTTGTAAATGAGCCATCC R: AAGGAAGTACCTCAGGCTTG	58
7 and 8	F: CATTGCAAATCTGGGTCAA R: GACCTGTGGATCAGGAAAATC	59
9	F: TAATATAGCTCCCAGGATTGGAT R: AGATTGTTTATTTGTGGCATTG	57
10	F: GGGATGTGCCTGTGAGAATTA R: AAGGCACGTACAACATTCTG	57
11	F: CCACATCTGTGGCAATTAC R: GTCTGGCCAAGATTATCCAATA	57
12	F: AAGGAGGCAAATCTATTGGG R: GTCTCTGCAGCCAGTCATAAG	58
13.1	F: ATGGCATCTTGACGAATGT R: ATCCTTAGGGAGAGCAAGGA	56
13.2	F: GAAGAAGGAGGTGCACAAGG R: CTTAGAGCTGTCAAGGCTTTG	60

Table 2 Epithelial odontogenic tumors subject to *AMBN* sequencing analysis

Tumor #	Type	Exon and codon mutation	Histological type
1	Unicystic ameloblastoma	Exon 6; 112C>A (Heterozygous)	Luminal
2	Unicystic ameloblastoma	Exon 5; 148T>G (Heterozygous)	Luminal
3	Solid ameloblastoma	Exon 11; Splicing site IVS11-3T>A, T604A	Follicular
4	Solid ameloblastoma	Exon 4; 200C>G (Homozygous) Exon 4; 203C>G (Heterozygous)	Plexiform
5	Adenomatoid odontogenic tumor	Exon 5; 189A>T (Heterozygous)	
6	Squamous odontogenic tumor	Exon 11; Splicing site IVS11-2A>G; A605G	

The nucleotides are numbered according to the GenBank AH09924.

transversion in exon 6, leading to an exchange of Glutamine for Proline (P81Q). The other unicystic tumour presented a heterozygous missense transversion in exon 5 (292T>G), causing a change from Methionine to Arginine (M76R). One solid ameloblastoma had an exon 11 splicing site mutation (IVS11-3T>A; T604A) and the other solid tumor presented a compound mutation in exon 4 (222C>G, homozygous; 225C>G, heterozygous), that caused an exchange of Leucine for Valine (L53V) and Glutamine for Glutamate (Q54E), respectively. The adenomatoid odontogenic tumor had a 334G>T transversion, causing a R90W amino acid change. Finally, the squamous odontogenic tumor also had a splicing mutation in exon 11 (IVS11-2A>G; A605G).

Discussion

In the present report we demonstrated that novel mutations in the *AMBN* gene are responsible for the tumorigenesis of subtypes of epithelial odontogenic tumors. Previous immunohistochemical studies have attempted to investigate the differentiation of neoplastic cells in odontogenic tumors.^{24,25} Proteins such as amelogenin, enamelin and sheathlin an orthologue of ameloblastin were evaluated in these neoplasm. Amelogenin, enamelin and sheathlin were not expressed in ameloblastoma, suggesting that ameloblastoma cells do not attain functional maturation as secretory phase ameloblast.^{24,25} The absence of sheathlin in epithelial odontogenic tumors has been considered a useful marker for the functional differentiation of secretory ameloblast.²⁵

Recently, the presence of a mutation of the β -catenin was investigated in a series of oral tumors comprising 11 calcifying odontogenic cyst (COC), 10 follicular and 10 plexiform ameloblastomas.²⁶ Nine of the eleven COC (82%) harbor somatic β -catenin mutations. However, only a single mutation in codon 45 was found in a 72 year old patient

with follicular ameloblastoma. In addition, the expression of β -catenin expression in this mutated follicular ameloblastoma was not remarkably different from the other tumors.

All 6 tumors investigated in our study showed mutations in the *AMBN* gene. The DNA extracted of the contra-lateral normal mucosa from each patient did not present any alterations, contributing to exclude for the presence of polymorphisms. Both unicystic ameloblastomas, the adenomatoid odontogenic tumor and one solid ameloblastoma showed a heterozygous mutated transversion. Although we have microdissected the tumoral cells, as the epithelial odontogenic tumors presented sheets, nests and cords of neoplastic epithelial cells surrounded by normal connective tissue, our finding of a heterozygous mutation could have occurred due to DNA contamination with normal cells. Normally, transversions result in a less conserved polypeptide causing a loss of its function.²⁷ In tumor #1 (unicystic ameloblastoma), the alteration occurred in the phosphorylation site PPLPSQPSL with the substitution of neutral and polar for a neutral and hydrophobic amino acid (P81Q). *AMBN* is a protein rich in proline and this hydrophobic amino acid is often located in tight turns in protein structure where the polypeptide chain must change direction. Proline can also function to introduce *kinks* into alpha helices, since it is unable to adopt a normal helical conformation. Besides, Proline plays an important role in intracellular signalling. Domains such as WW and SH3 bind to specific Proline-containing peptides that are key parts of many signalling cascades.²⁸ The other unicystic ameloblastoma presented an exchange of a non-polar and hydrophobic to a positively charged amino acid (M76R) in an important phosphorylation site KSFNSLWMH. While the adenomatoid odontogenic tumor presented the exchange of an arginine polarize positively charged for non-polarize triptophane amino acid R90W. The other two mutations also caused considerable changes in protein structure.²⁸

Mutations in splicing sites are important because they introduce a sham sequence in the vicinity of mRNA splicing junctions and these mutations are accompanied by aberrant splicing mRNA.²⁹ A splicing site mutation can lead to the exclusion of the exon, inclusion of intron or the skipping of the exon due to a cryptic splice site usage, almost always outside the consensus sequence for acceptor or donor splice site.^{29,30} In our study the mutation found in a solid ameloblastoma and in a squamous odontogenic tumor involved the acceptor site of the invariant AG dinucleotide. Splicing sites of intermediate similarity to the consensus sequence may thus be prone to the deleterious effects of a mutation. It has been previously shown that, at least for 5' splice site mutations, cryptic splice site usage is favored under conditions where a number of such sites are present in the immediate vicinity and these sites exhibit sufficient homology to the splice site consensus sequence for them to be able to compete successfully with the mutated splice site.³¹

Interestingly, only one previous study has shown that mutations in the *AMBN* gene, albeit different, were present in three ameloblastomas.¹¹ However, the authors did not report the clinical, radiographic, and histological type of those three studied ameloblastomas, nor did they exclude the presence of polymorphisms through the sequencing of germline DNA. The undifferentiated phenotype of neoplastic cells could result from a direct action of *AMBN* in the target tissue or and indirect effects due to reciprocal signalling between the epithelial and mesenchymal components. Clearly, further studies are needed to determine a genotype/phenotype relationship. In conclusion, in this report we describe novel mutations of the *AMBN* gene that are associated with variety of epithelial tumors.

References

1. Melrose RJ. Benign epithelial odontogenic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1999;16:271–87.
2. Schafer DR, Thompson LD, Smith BC, Wenig BM. Primary ameloblastoma of the sinonasal tract: a clinicopathologic study of 24 cases. *Cancer* 1998;82:667–74.
3. Waldron CA, el-Mofty SK. A histopathologic study of 116 ameloblastomas with special reference to the desmoplastic variant. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987;63:441–51.
4. Gardner DG, Pecak AM. The treatment of ameloblastoma based on pathologic and anatomic principles. *Cancer* 1980;46:2514–9.
5. Thesleff I, Vaahotokari A, Kettunen P, Aberg T. Epithelial-mesenchymal signaling during tooth development. *Connect Tissue Res* 1995;32:9–15.
6. Gritli-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* 2002;129:5323–37.
7. Lisi S, Peterkova R, Peterka M, Vonesch JL, Ruch JV, Lesot H. Tooth morphogenesis and pattern of odontoblast differentiation. *Connect Tissue Res* 2003;44(1):167–70.
8. Koch WE. In vitro differentiation of tooth rudiments of embryonic mice. I. Transfilter interaction of embryonic incisor tissues. *J Exp Zool* 1967;165:155–70.
9. Karcher-Djuricic V, Staubli A, Meyer JM, Ruch JV. A cellular dental matrices promote functional differentiation of ameloblasts. *Differentiation* 1985;29:169–75.
10. Fincham AG, Moradian-Oldak J, Simmer JP. The structural biology of the developing dental enamel matrix. *J Struct Biol* 1999;126:270–99.
11. Toyosawa S, Fujiwara T, Ooshima T, Shintani S, Sato A, Ogawa Y, et al. Cloning and characterization of the human ameloblastin gene. *Gene* 2000;256:1–11.
12. 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* 1998;106:963–70.
13. 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* 1997;41:115–8.
14. 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* 2001;10:1673–7.
15. Reichart PA, Philipsen HP. Revision of the 1992 edition of the WHO histological typing of odontogenic tumors. A suggestion. *Mund Kiefer Gesichtschir* 2003;7:88–93.
16. Dunsche A, Babendererde O, Luttges J, Springer IN. Dentigerous cyst versus unicystic ameloblastoma—differential diagnosis in routine histology. *Oral Pathol Med* 2003;32:486–91.
17. Li TJ, Wu YT, Yu SF, Yu GY. Unicystic ameloblastoma: a clinicopathologic study of 33 Chinese patients. *Am J Surg Pathol* 2000;24:1385–92.
18. 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* 1975;40:616–30.
19. Reichart PA, Philipsen HP, Sonner S. Ameloblastoma: biological profile of 3677 cases. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1995;31B:86–99.
20. 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* 2000;90:155–63.
21. 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* 2001;3:22–5.
22. 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* 1990;28:495–503.
23. den Dunnen JT, Antonarakis SE. Nomenclature for the description of human sequence variations. *Hum Genet* 2001;109:121–4.
24. Saku T, Okabe H, Shimokawa H. Immunohistochemical demonstration of enamel proteins in odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med* 1992;21:113–9.
25. Takata T, Zhao M, Uchida T, Kudo Y, Sato S, Nikai H. Immunohistochemical demonstration of an enamel sheath

- protein, sheathlin, in odontogenic tumors. *Virchows Arch* 2000;436:324–9.
26. Sekine S, Sato S, Takata T, Fukuda Y, Ishida T, Kishino M, et al. β -catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cyst, but rare in ameloblastomas. *Am J Pathol* 2003;163:1707–12.
27. Cooper DN, Youssoufian H. The CpG dinucleotide and human genetic disease. *Hum Genet* 1988;78:151–5.
28. Bohley P. Surface hydrophobicity and intracellular degradation of proteins. *Biol Chem* 1996;377:425–35.
29. Liu HX, Zhang M, Krainer AR. Identification of functional exonic splicing enhancer motifs recognized by individual SR proteins. *Genes Dev* 1998;12:1998–2012.
30. 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* 2000;14:1098–108.
31. 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* 1992;90:41–54.

Available online at www.sciencedirect.com



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)

[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)

[Baixar livros de Literatura Infantil](#)

[Baixar livros de Matemática](#)

[Baixar livros de Medicina](#)

[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)

[Baixar livros de Meio Ambiente](#)

[Baixar livros de Meteorologia](#)

[Baixar Monografias e TCC](#)

[Baixar livros Multidisciplinar](#)

[Baixar livros de Música](#)

[Baixar livros de Psicologia](#)

[Baixar livros de Química](#)

[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)

[Baixar livros de Serviço Social](#)

[Baixar livros de Sociologia](#)

[Baixar livros de Teologia](#)

[Baixar livros de Trabalho](#)

[Baixar livros de Turismo](#)