

Vinicius Magalhães Carvalho

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *SH3BP2* EM
LESÕES CENTRAIS DE CÉLULAS GIGANTES E NO
QUERUBISMO**

Belo Horizonte

Instituto de Ciências Biológicas da UFMG

2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Vinicius Magalhães Carvalho

**ANÁLISE MOLECULAR DO GENE *SH3BP2* EM
LESÕES CENTRAIS DE CÉLULAS GIGANTES E NO
QUERUBISMO**

Tese apresentada ao Curso de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor.

Orientador: Prof. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas da UFMG
2009

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	VI
LISTA DE TABELAS.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
RESUMO.....	IX
1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	25
3 ARTIGOS.....	27
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	36
5 CONCLUSÕES.....	41
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Fator de transcrição
C-terminal	Carboxi-terminal
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificador
LCCG	Lesão Central de Células Gigantes
M-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
MIM	Herança Mendeliana no Homem
Msx-1	Gene msh homeobox 1
N-terminal	Amino-terminal
NF-1	Neurofibromatose do tipo 1
NFAT	Fator nuclear de células T ativadas
NFATc1	NFAT citoplasmático calcineurina-dependente 1
OPG	Osteoprotegerina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PH	Domínio de Homologia pleckstrin
PLCg	Fosfolipase C gamma
pmol	Picomol
PTH	Hormônio da Paratireóide
PTHrP	Proteína relacionada ao PTH
RNA	Ácido ribonucleico
RANK	Receptor de ativação do fator nuclear Kapa B
RANKL	Ligante do Receptor de ativação do fator nuclear Kappa B
SH2	domínio de homologia 2 Src

<i>SH3BP2</i>	Gene <i>SH3BP2</i>
SH3BP2	Proteína 2 ligante do domínio de homologia 3 Src
SMLCG/TN	Síndrome de múltiplas lesões de células gigantes / tipo-Noonan
sRANK	RANK solúvel
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TCG	tumor de células gigantes
TNF	Fator de Necrose Tumoral
TRAP	Fosfatase ácida tartarato-resistente
μg	Micrograma

CÓDIGOS DOS NUCLEOTÍDEOS E AMINOÁCIDOS**Nucleotídeos**

A	Adenina
C	Citosina
G	Guanina
T	Timina

Aminoácidos

A	Alanina	Ala	C	Cisteína	Cis
D	Ácido Aspártico	Asp	E	Ácido Glutâmico	Glu
F	Fenilalanina	Phe	G	Glicina	Gly
H	Histidina	His	I	Isoleucina	Ile
K	Lisina	Lis	L	Leucina	Leu
M	Metionina	Met	N	Asparigina	Asn
P	Prolina	Pro	Q	Glutamina	Gln
R	Arginina	Arg	S	Serina	Ser
T	Treonina	Thr	V	Valina	Val
W	Triptofano	Trp	Y	Tirosina	Tyr

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – Dados clínicos, aspectos radiográficos e mutações detectadas em pacientes com Querubismo (caso1) e LCCG (caso 2-5).....	32
---	----

LISTA DE FIGURAS

Oral Oncology (2008)

FIGURA 1 a - Seqüência de DNA do exon 3 no tipo-selvagem.....29

FIGURA 1 b - Seqüência de DNA mostrando a deleção de uma Citosina (408delC)
no caso de Querubismo29

FIGURA 2 a - Estrutura esquemática do *SH3BP2* e seus domínios: domínio de
homologia pleckstrin (PH), região rica em prolina (Pro) e um domínio
SH2 (SH2).....29

FIGURA 2 b - Proteína truncada e perda de domínios
remanescentes.....29

Oral Diseases (2009)

FIGURA 1 a - Dados da seqüência do cromatograma (caso 1) mostrando a mutação
heterozigótica
c.320C>T.....33

FIGURA 1 b - Dados da seqüência do cromatograma (caso 2) mostrando a mutação
heterozigótica
c.1442A>T.....33

RESUMO

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão óssea que ocorre principalmente na mandíbula e é caracterizada histologicamente por células gigantes multinucleadas em um estroma de células mononucleares ovóides. Sua etiologia é desconhecida, sendo mais comum em adultos jovens. O padrão radiográfico e histológico das LCCG pode ser encontrado em outras doenças e síndromes que acometem os maxilares, sendo uma delas o Querubismo. O Querubismo é uma síndrome autossômica dominante, com penetrância variada, caracterizada por uma extensa destruição óssea maxilo-mandibular, causando o aspecto alterado da face. A síndrome foi relacionada com mutações no gene *SH3BP2*, localizadas no exon 9, mas um modelo para sua patogênese não foi definido até o momento. No presente estudo, quatro casos de LCCG e dois casos de Querubismo foram investigados, sendo um deles agressivo. O DNA foi extraído do sangue periférico e do tecido tumoral. Todas as regiões codificadoras do *SH3BP2* foram amplificadas por PCR e seqüenciadas. Uma mutação heterozigótica de sentido trocado (A1442T - Q481L) foi encontrada no exon 11 de um dos casos esporádicos de LCCG. O caso de Querubismo não-agressivo apresentou mutação heterozigótica no exon 4, germinativa e no tecido tumoral: C320T (T107M). O caso de Querubismo agressivo apresentou uma nova mutação localizada no exon 3, domínio de homologia pleckstrin (PH) do *SH3BP2*. Os resultados demonstraram que as mutações no gene *SH3BP2* podem estar fora da região hot spot em casos de Querubismo e que podem estar presentes em LCCG esporádicas. Estes achados sugerem uma nova perspectiva na investigação da possível relação entre a patogênese do Querubismo e da LCCG.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Lesão Central de Células Gigantes (LCCG)

A Lesão Central de Células Gigantes (LCCG) foi inicialmente descrita como sendo um granuloma reparativo de células gigantes dos maxilares (JAFJE, 1953). Recentemente, a Organização Mundial de Saúde definiu a LCCG como uma lesão benigna localizada, mas que eventualmente apresenta-se como uma proliferação osteolítica agressiva, consistindo de tecido fibroso com áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina, presença de células gigantes semelhantes a osteoclastos e formação óssea reacional (BARNES *et al.*, 2005).

A LCCG é uma lesão intra-óssea, geralmente única, que ocorre com maior frequência na região anterior da mandíbula, em pacientes do sexo feminino, na faixa etária entre 10 a 25 anos (WHITAKER & WALDRON, 1993). O termo reparativo, inicialmente descrito por Jaffe, foi abandonado, mas ainda é utilizado por alguns autores para as lesões que ocorrem em áreas de extração e ao redor de implantes (DE LANGE, 2007c).

Chuong *et al.* (1986), baseados em sinais, sintomas e nos aspectos histológicos, foram os primeiros a classificar as lesões em agressivas e não-agressivas. As lesões agressivas são caracterizadas por um ou mais aspectos como: dor, parestesia, reabsorção radicular, crescimento rápido, perfuração da cortical e um alto índice de recorrência após a curetagem cirúrgica. Elas são também maiores e histologicamente apresentam uma fração de superfície com maior ocupação por células gigantes. As lesões agressivas apresentam aspecto radiolúcido multilocular e o deslocamento dentário ocorre com frequência, podendo

acarretar mal-oclusão. No aspecto intra-bucal pode-se observar um aumento de volume, às vezes marrom-azulado (VAN DAMME & MOOREN, 1994; DE LANGE *et al.*, 2007c). As lesões não-agressivas normalmente apresentam-se indolores, assintomáticas, com crescimento lento, sem reabsorção de cortical ou envolvimento de raízes dentárias e com baixa recorrência. Radiograficamente, são solitárias e com aspecto unilocular (HORNER, 1989).

Na literatura, sempre houve uma tentativa de distinguir o tumor de células gigantes dos ossos longos (TCG) das LCCG, sendo que o TCG é mais agressivo e mais difícil de ser tratado. O TCG se destaca por ser um processo neoplásico que acomete epífises de ossos longos. Ele apresenta taxa de recorrência mais elevada do que a LCCG, além de envolver pacientes mais idosos (AUCLAIR *et al.*, 1988). Esses autores demonstraram que histologicamente, a única diferença quantitativa estatisticamente significativa entre as duas lesões foi o maior número de núcleos nas células gigantes do TCG. Eles sugeriram que o TCG e a LCCG representam um único processo patológico, modificado pela idade do paciente e área de ocorrência.

Souza *et al.* (1999) verificaram pequenas diferenças histológicas entre essas lesões: no TCG existe uma extensa área fibrosa, células gigantes mais arredondadas e com um maior número de núcleos; enquanto que na LCCG, a presença de hemorragia, depósito de hemossiderina e tecido osteóide são mais freqüentes.

As células gigantes multinucleadas apresentam tamanho e morfologia variada, com núcleos ovóides, vesiculosos e centralizados. Características típicas de osteoclastos foram observadas nelas. Localizadas em maior número ao redor de áreas hemorrágicas, não são necessariamente abundantes e podem estar

agregadas focalmente ou difusas na lesão, em um fundo de células mononucleares, cuja morfologia varia de fusiforme a ovóide (FLANAGAN *et al.*, 1988; MARX & STERN, 2002).

Em alguns casos, áreas de calcificação distrófica e ossificação metaplásica podem ser encontradas, especialmente na periferia das lesões (LOMBARDI *et al.*, 2006; DE LANGE *et al.*, 2007c).

A origem e a formação das células gigantes multinucleadas na LCCG e na lesão periférica de células gigantes (LPCG) tem sido alvo de vários estudos. Uma teoria hipotetizada é da fusão entre as células mononucleares da lesão, através de interdigitações na membrana citoplasmática das mesmas (TIFFEE & AUFDEMORTE, 1997).

As células gigantes presentes nas LCCG são derivadas de uma sub-série de fagócitos mononucleares. As células mononucleares precursoras diferenciam-se em células gigantes maduras, sob a influência das células fusiformes do estroma (semelhantes a osteoblastos), que se mantêm em proliferação e expressam o ligante do receptor de ativação do fator nuclear κ B (RANKL) (MIYAMOTO *et al.*, 2000).

Apesar de estarem presentes de forma destacada, não se presume que as células gigantes multinucleadas sejam as células tumorais proliferativas no TCG e na LCCG. Hipotetiza-se que estas células advenham de células mononucleares do sangue periférico e sejam recrutadas pelas células fusiformes do estroma. Provavelmente, estas últimas são as células proliferativas tumorais (ITONAGA *et al.*, 2002).

Itonaga *et al.* (2003) realizaram uma melhor definição das células mononucleares e gigantes da LCCG. Dentre as células mononucleares, três populações distintas foram identificadas através de reações de imunoistoquímica e imunofluorescência. A maioria das células apresentou características típicas de macrófagos, como positividade para CD68, CD11a, CD11b, CD14 e HLA-DR. A minoria das células mononucleares apresentou características típicas de precursores de osteoclastos como positividade para receptor de vitronectina (VNR) e para fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Poucas células fusiformes isoladas apresentaram características de osteoblastos como positividade para fosfatase alcalina e se encontravam espalhadas pela lesão ou ao redor de áreas de formação óssea. Estas células também foram positivas para o PCNA, ou seja, estavam em proliferação. Através de culturas de células da LCCG, os autores observaram ainda que as células fusiformes proliferavam e permaneciam por maior tempo que as células gigantes e as mononucleares ovóides. Elas ainda expressavam os marcadores de osteoblasto, RANKL e fosfatase alcalina, além de marcadores de fibroblasto como prolil-4-hidroxilase e vimentina. Ainda neste trabalho, os autores fizeram co-cultura de células mononucleares da LCCG com células mononucleares de sangue periférico de indivíduos saudáveis; acrescentaram à cultura M-CSF; observando posteriormente a formação de células multinucleadas TRAP⁺ e VNR⁺, dado este que confirma a tese de que as células tipo-osteoblastos possibilitam a formação de osteoclastos (ITONAGA *et al.*, 2003).

As células gigantes multinucleadas presentes na LCCG e na LPCG são morfológica e histoquimicamente semelhantes à osteoclastos. Possuem enzimas hidrolíticas e antígenos específicos de osteoclastos, além de receptores para calcitonina. São capazes de reabsorver osso *in vitro*, tendo sua função de

reabsorção óssea e mobilidade celular moduladas na presença de calcitonina (LIU *et al.*, 2003).

As LCCG podem ocorrer de forma isolada, em formas múltiplas, recorrentes ou ainda associadas a Síndromes como o Querubismo, a Síndrome de múltiplas lesões de células gigantes / tipo-Noonan (SMLCG/TN) e a Neurofibromatose do tipo 1 (NF-1) (HYCKEL *et al.*, 2005). Tais lesões são histológica e imunoistoquimicamente indistinguíveis (VAN DAMME & MOOREN, 1994).

Existe uma diferença considerável na literatura referente aos dados estatísticos destas lesões, provavelmente devido ao número de casos e critérios de seleção utilizados. Na maioria dos artigos, a amostra é relativamente pequena ($n < 20$) e os pacientes são referenciados de um único Centro de Saúde, sendo este um Bias (DE LANGE, 2007c).

de Lange & Van den Akker (2005) realizaram um estudo com o objetivo de avaliar aspectos clínicos e radiográficos das LCCG diagnosticadas na Holanda no período entre Janeiro de 1990 e Janeiro de 1995. A incidência foi de 89 lesões em 83 pacientes. Sinais e sintomas de agressividade (dor, parestesia e reabsorção radicular) foram encontrados em 16 pacientes (19,3%). Lesões múltiplas ocorreram em três pacientes (3,6%). A taxa de recorrência foi de 26,3%, sendo maior nos pacientes com lesões agressivas ($RR=1.6$). Em cinco pacientes (14 lesões) houve um diagnóstico clínico de Querubismo isolado ou concomitante com a NF-1. Os autores concluíram que em uma população em geral, lesões de células gigantes maiores e agressivas são menos comuns do que o sugerido pela literatura. Entretanto, lesões múltiplas ocorrem com maior frequência do que foi descrito previamente. Em pacientes com sinais e sintomas agressivos, a curetagem cirúrgica,

isoladamente, não é uma terapia efetiva.

O diagnóstico clínico diferencial para LCCG deve ser feito com Querubismo, tumor marrom do hiperparatireoidismo, Ameloblastoma e Ceratocisto. Nos casos em que a lesão se localiza periapicalmente, pode ser confundida com cistos ou granulomas radiculares de origem endodôntica, principalmente quando não há resposta pulpar (LOMBARDI *et al.*, 2006).

1.2 Querubismo

O Querubismo foi inicialmente descrito por Jones (JONES, 1933). É uma doença rara que apresenta herança autossômica dominante (MIM 118400). Geralmente caracteriza-se pela destruição bilateral da mandíbula, maxila ou ambas, podendo alcançar a região orbitária. A destruição é frequentemente acompanhada de um aumento de volume facial, causando uma assimetria indolor. A pele na região da bochecha fica esticada e projeta as pálpebras inferiores para baixo. Os olhos parecem estar deslocados para cima, lembrando os anjos querubins das pinturas renascentistas (MANGION *et al.*, 1999; UEKI *et al.*, 2001).

Radiograficamente, o Querubismo é caracterizado por áreas radiolúcidas multiloculares que podem ser unilaterais. Normalmente a doença restringe-se às regiões maxilar e mandibular, apesar de anormalidades radiográficas serem ocasionalmente observadas nas costelas (ARNOTT, 1978).

Avaliações histopatológicas das lesões mostram um tecido conjuntivo fibroso proliferativo, contendo numerosas células gigantes multinucleadas (SOUTHGATE *et al.*, 1998).

Os aspectos clínicos e histológicos do Querubismo podem apresentar similaridade diagnóstica com: TCG, LCCG, fibroma ossificante, displasias fibrosas dos maxilares e doença de Paget (WHITAKER & SINGH, 1995).

Os indivíduos afetados não apresentam alterações ao nascimento. Normalmente a doença se manifesta no início da infância (entre 2 a 5 anos) e se torna mais evidente até a puberdade, fase na qual as lesões ósseas começam a regredir. Entretanto, a distorção dos maxilares leva a anormalidades dentárias permanentes. Outras complicações como distúrbios visuais (devido as lesões que atingem a órbita) e mesmo óbito, foram descritos; porém são relativamente raros (HAWES, 1989). Segundo o autor, a penetrância da doença é alta, mas a estimativa precisa depende do critério diagnóstico utilizado. A frequência e gravidade da doença é maior no sexo masculino que no feminino.

Se apenas a mandíbula está envolvida e não há histórico familiar, torna-se impossível diferenciar o quadro de Querubismo de múltiplas LCCG (DE LANGE *et al.*, 2007b). Os achados microscópicos do Querubismo são essencialmente semelhantes àqueles da lesão central de células gigantes isoladas, não permitindo um diagnóstico específico de Querubismo na ausência de informações clínico-radiográficas (YAMAGUCHI *et al.*, 1999).

Histologicamente, as lesões do Querubismo contêm células gigantes multinucleadas com atividade osteoclástica, em um estroma fibroso contendo células mesenquimais ovais e fusiformes. Estes aspectos são similares àqueles presentes em outras lesões que contêm células gigantes, incluindo displasia fibrosa, LCCG e LPCG, granuloma reparativo do osso de células gigantes, TCG e tumor marrom do hiperparatireoidismo (DE LANGE *et al.*, 2005).

Normalmente, o contexto clínico e a história natural são pré-requisitos para um diagnóstico diferencial definitivo entre estas lesões histologicamente similares. A distinção e mesmo a nomenclatura entre estas doenças podem depender de cada instituição (LIETMAN *et al.*, 2007).

MANGION *et al.* (1999) e TIZIANI *et al.* (1999) demonstraram que o Querubismo é causado por mutação na região codificadora do gene *SH3BP2*, localizado no cromossomo 4p16.3.

Em 2003, Imai *et al.* encontraram uma mutação de sentido trocado Pro418Arg no exon 9 do gene *SH3BP2*, em uma paciente diagnosticada com Querubismo não-familiar. Segundo os autores, casos de Querubismo não-familiar como o estudado, apresentam grande similaridade clínica e difícil diagnóstico diferencial com LCCG.

Li & Yu (2006) investigaram uma família com 21 membros, sendo que 3 foram diagnosticadas com Querubismo, todas do sexo feminino. Um dos casos de Querubismo apresentou uma particularidade: o envolvimento da região orbitária ocorreu já na idade adulta, após remissão das lesões mandibulares. Dezesete membros foram recrutados para análise genética. Os autores realizaram o seqüenciamento do gene *SH3BP2* no exon 9, e encontraram uma mutação de sentido trocado nos pacientes com Querubismo: uma troca de base A1517G, causando uma substituição de aminoácido Asp419Gly. Esta mutação não foi encontrada em nenhum dos 100 controles avaliados.

de Lange *et al.* (2007a) realizaram a análise clínica, radiográfica e genética de 11 membros de uma família com histórico de Querubismo. Cinco membros apresentaram mutação pontual no exon 9, até então não descrita: uma transição C1513A, resultando em uma substituição Pro418Thr. Dois indivíduos apresentavam

os aspectos clássicos de Querubismo e a mãe de um deles, sinais de um “Querubismo solucionado”. Dos dois outros membros que não apresentavam sinais, sintomas e ou histórico de Querubismo, um era do sexo masculino, o que segundo os autores pode contradizer a literatura, que mostra 100% de penetrância da doença nos homens.

Lee *et al.* (2008) examinaram um paciente com 6 anos de idade e sua família. Encontraram uma mutação no gene *SH3BP2* Pro418Arg no probando e em sua mãe.

1.3 O gene *SH3BP2*

As mutações encontradas em pacientes com Querubismo foram evidenciadas em uma porção do exon 9 que codifica uma região rica em prolina (aminoácidos 415-420) (UEKI *et al.*, 2001).

A função específica desta região, codificada pelas mutações de sentido trocado no *SH3BP2* em pacientes com Querubismo permanece incerta, apesar deste padrão de sentido trocado sugerir uma mutação ativadora (UEKI *et al.*, 2001; LIETMAN *et al.*, 2006).

Todas as mutações identificadas no *SH3BP2* estão localizadas no exon 9 e afetam três aminoácidos, em uma sequência de seis (RSPPDG), no domínio de ligação SH3. As mutações no *SH3BP2* promovem um ganho de função ou atuam de forma negativa-dominante. Apesar desse gene ser um regulador da função da c-ABL em algumas células como osteoblastos, ele pode afetar diferentes moléculas

sinalizadoras em outras células, como as progenitoras de osteoclastos (UEKI *et al.*, 2001).

A região do cromossoma 4p16.3, localização do *SH3BP2*, está freqüentemente deletada nos pacientes com a Síndrome de Wolf-Hirschhorn; uma condição rara caracterizada pelo desenvolvimento debilitado, incluindo tamanho e crescimento limitados. Apesar da haploinsuficiência do *SH3BP2* nesta síndrome, estes pacientes possuem aspectos faciais e de desenvolvimento distintos que não se assemelham ao Querubismo (BATTAGLIA & CAREY, 1999).

A proteína codificada pelo cDNA com as mutações do *SH3BP2* no Querubismo é ativadora, pois ela aumenta a atividade do Fator nuclear de células T ativadas (NFAT) mais que no cDNA do *SH3BP2* tipo-selvagem (LIETMAN *et al.*, 2006).

É possível que a presença da *SH3BP2* nas LCCG, evidenciada pela imunoistoquímica, represente na verdade, uma relativa expressão aumentada do *SH3BP2* tipo-selvagem nas lesões de células gigantes não-sindrômicas. Tal aumento na quantidade de *SH3BP2* poderia aumentar a ativação de sua própria via, simulando assim, a atividade aumentada observada nas mutações de ativação do gene *SH3BP2* no Querubismo (LIETMAN *et al.*, 2006). De acordo com estes autores, existem indicações que o gene *SH3BP2* apresenta um papel na regulação da atividade aumentada de osteoblasto e osteoclasto, observada na erupção dentária normal.

Segundo Foucault *et al.* (2003), proteínas adaptadoras são componentes sinalizadores críticos que podem integrar múltiplos caminhos, ao permitirem a reunião de complexos sinalizadores multimoleculares. O adaptador citoplasmático

SH3BP2 promove atividades transcricionais do NFAT e da proteína ativadora 1 (AP-1) em células T através da ativação dos caminhos RAS e calcineurina dependentes. Entretanto, os mecanismos moleculares pelos quais o *SH3BP2* regula a sinalização e ativação celular permanecem pouco conhecidos. Os autores apresentaram evidências da interação física entre o *SH3BP2* e a proteína chaperona 14-3-3. Uma proteína *SH3BP2* mutante, incapaz de se ligar a 14-3-3, mostrou potencial aumentado para estimular atividades transcricionais do NFAT, sugerindo que esta interação regula negativamente a função adaptadora da *SH3BP2* em linfócitos.

Miah *et al.* (2004) sugeriram que mutações pontuais no *SH3BP2* poderiam causar a ativação patológica de osteoclastos, presumidamente pela disfunção deste gene na via regulatória da osteoclastogênese. Além disto, hipotetiza-se que a mutação no gene *SH3BP2* tem provavelmente alguma influência na regulação do desenvolvimento dental pelo gene *Msx-1* e que o desenvolvimento das LCCG poderia estar ligada a desregulação desse gene. A expressão não fisiológica do *Msx-1* poderia levar a uma falha na diferenciação osteoclástica que então causaria a formação de um tecido lesional.

Neste processo, o *SH3BP2* possui uma influência na regulação do receptor do Hormônio da Paratireóide (PTH) e na proteína relacionada ao PTH (PTHrP). O PTH medeia uma redução na expressão da osteoprotegerina (OPG) nos folículos dentários, que promovem osteoclastogênese (TAZAWA *et al.* 2003; WISE *et al.* 2004).

Segundo Hyckel *et al.* (2005), a ocorrência hereditária do Querubismo indica uma provável etiologia genética, uma vez demonstrada sua correlação com a mutação no gene *SH3BP2*. Uma definição de sua patogênese ainda não foi

elucidada. Devido a sua associação com o desenvolvimento dos segundos e terceiro molares, o Querubismo poderia ser definido como uma alteração do desenvolvimento dentário, geneticamente determinada. A determinação temporal e espacial dos sintomas clínicos é explicada pela interação entre o caminho de transdução de sinais *SH3BP2*-dependentes com a morfogênese mandibular. Devido à indeterminação da fase de capuz dos segundos e terceiros molares induzida pela doença, uma compartimentação espacial necessária para o desenvolvimento dentário normal não ocorre. Isto causa a desregulação da formação de tecido ósseo a partir do mesênquima.

Lietman *et al.* (2006) demonstraram que as mutações encontradas no *SH3BP2* comportam-se como ativadoras do NFAT e determinam um ganho de função ao promoverem a ativação de osteoclastos, o que é consistente com as lesões que produzem o fenótipo clínico do Querubismo. Ainda permanece desconhecido como as mutações relacionam-se com o fato das lesões serem sítio-específicas.

A função precisa do *SH3BP2* é incerta; seu domínio de homologia 2 Src (SH2) e domínio ligante de homologia 3 Src (SH3BD) são característicos de proteínas adaptadoras, que apesar de serem limitadas na atividade catalítica intrínseca, exercem papéis críticos ao acoplar receptores quinase a processos específicos de sinalização celular (DECKERT *et al.*, 1998; FOUCAULT *et al.*, 2003).

O domínio SH2 no *SH3BP2* liga-se às proteínas citoplasmáticas Syk, Vav, PLC- γ , 14-3-3, c-CBL e LAT. Em um nível celular, o gene *SH3BP2* foi relacionado à sinalização de células T e ao processo inflamatório, e sua atividade é reduzida ao interagir com a proteína chaperona 14-3-3. O NFAT está aumentado em resposta à

expressão elevada do *SH3BP2*, sendo que o NFAT citoplasmático calcineurina-dependente 1 (NFATc1), a isoforma primária do NFAT presente nos osteoclastos, é o regulador mestre da osteoclastogênese (DECKERT *et al.*, 1998; FOUCAULT *et al.*, 2003, TAKAYANAGI, 2005).

A proteína adaptadora SH3BP2 é conhecida por exercer um papel regulador na sinalização de imunoreceptores. Em linfócitos, a ligação de receptores de células B ou T desencadeia a fosforilação de tirosina. A análise genética revela que a SH3BP2 é requisitada para a proliferação de células B e receptores de sinalização de células B. As mutações pontuais no gene *SH3BP2* incluem substituições e deleções. As células mielóides em Camundongos Knockout exibem respostas aumentadas ao Fator Estimulador de Colônia de Macrófago (M-CSF) e ao RANKL, acarretando a ativação de osteoclastos (HATANI & SADA, 2008).

As células gigantes multinucleadas mostraram-se positivas para CD68 e para Fosfatase ácida tartarato-resistente (TRAP). Inúmeras células fusiformes do estroma expressaram RANKL. Estes resultados apontam evidências que o RANKL tem um papel crítico na diferenciação de células precursoras de osteoclastos em células gigantes multinucleadas no Querubismo (LEE *et al.*, 2008).

Lietman *et al.* (2008) investigaram o significado funcional da proteína SH3BP2 na osteoclastogênese, na presença do RANKL solúvel (sRANKL). O estudo indicou que a SH3BP2 aumenta tanto a translocação nuclear de NFATc1 quanto a expressão de TRAP em células pré-osteoclásticas tratadas com sRANK. Diante destes achados, os autores propuseram que as lesões do Querubismo resultam do efeito de ganho de função produzido pelas mutações no gene *SH3BP2* nas células pré-osteoclásticas.

1.4 Estudos moleculares das LCCG

de Lange *et al.* (2007b) analisaram o DNA extraído do sangue de quatro pacientes diagnosticados com LCCG agressiva – caracterizada por um ou mais dos seguintes aspectos: dor, parestesia, crescimento rápido e reabsorção radicular. Os autores não encontraram mutações no exon 9 do gene *SH3BP2*. Porém, sugeriram que uma mutação somática em um grupo específico de células poderia causar as lesões focais nas LCCG e indicaram a necessidade de análise do DNA tecidual destas lesões.

Lietman *et al.* (2007) investigaram se lesões de células gigantes esporádicas possuem mutações na mesma área do gene *SH3BP2* como nas raras lesões síndrômicas do Querubismo. Eles hipotetizaram que as mutações no *SH3BP2*, similarmente àquelas encontradas no Querubismo, estavam presentes em lesões centrais não-síndrômicas. A expressão das proteínas do *SH3BP2* e do *NFATc1* não pareceram correlacionar diretamente, uma vez que em algumas amostras a expressão da *NFATc1* é mais difusa que da *SH3BP2*. Neste estudo não foram identificadas mutações no exon 9 do gene *SH3BP2* no tecido da lesão de 10 amostras de TCG e nem em 9 casos de LCCG, sugerindo que mutações germinativas ou somáticas tipo-Querubismo são incomuns em Lesões de células gigantes não-síndrômicas.

Idowu *et al.* (2008) avaliaram o tecido de Lesões de células gigantes para mutações no exon 9 do gene *SH3BP2*. As células foram obtidas pela micro-dissecação do tecido lesional embebido em parafina. Os autores não detectaram mutações em 26 Lesões (15 centrais e 11 periféricas) e sugeriram que pacientes

com Lesões de células gigantes não portam as mutações germline no *SH3BP2* relacionadas ao Querubismo.

Apesar da etiologia da LCCG ser desconhecida, os aspectos histológicos similares desta lesão com o Querubismo sugerem que ambas as condições poderiam compartilhar da mesma alteração genética. Como até o momento, as mutações encontradas no *SH3BP2* foram pesquisadas somente no exon 9, torna-se extremamente relevante avaliar outras regiões do gene.

2 OBJETIVO

2 Objetivo

26

Realizar a análise molecular do gene *SH3BP2*, no Querubismo e em Lesões Centrais de Células Gigantes esporádicas, através do seqüenciamento das regiões codificadoras dos 13 exons.

3 ARTIGOS



A novel mutation of the *SH3BP2* gene in an aggressive case of cherubism

Vinicius Magalhães Carvalho ^a, Paôlla Freitas Perdigão ^{a,b},
Flávio Juliano Pimenta ^a, Paulo Eduardo Alencar de Souza ^c,
Ricardo Santiago Gomez ^b, Luiz De Marco ^{a,*}

^a Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antonio Carlos, 6627, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Dentistry School, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Avenida Dom José Gaspar 500, Belo Horizonte, MG, Brazil

Received 8 January 2007; accepted 9 January 2007
Available online 23 March 2007

KEYWORDS

Cherubism;
Pleckstrin homology
domain;
SH3BP2

Summary Cherubism is an autosomal dominant inherited syndrome characterized by excessive bone degradation of upper and lower jaw and its replacement with large amounts of fibrous tissue, which causes a characteristic facial swelling. A correlation with a mutation in the gene *SH3BP2* has been previously demonstrated, but a model for its pathogenesis is not yet available. Here we describe a novel mutation in an aggressive case of cherubism located in the pleckstrin homology domain (PH) of the *SH3BP2*.

© 2007 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Introduction

Cherubism (MIM #118400) is a rare autosomal dominant disorder with incomplete penetrance first described by Jones in 1933.¹ This condition is caused by germline mutations in the gene that encodes the adapter protein SH3BP2 (Src

Homology-3 Binding Protein-2; MIM #602104).^{2–6} Cherubism starts in early childhood, usually affecting both jaws with a symmetric distribution, causing an angel-like appearance of the patients. During its evolution, the bone is replaced by a proliferating fibrous tissue containing numerous giant cells, but spontaneous regression is expected to occur even without surgical intervention.³ The size and extent of the jaw lesions and the clinical presentation of patients with the condition range from minor lesions without facial deformity to large, deforming, destructive lesions with massive involvement of both jaws.^{7–9}

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

E-mail address: ldemarco@ufmg.br (L. De Marco).

The adaptor protein SH3BP2 contains three modular peptide recognition domains, an N-terminal pleckstrin homology domain (PH), a ten-amino acid SH3 binding site and a C-terminal SH2 domain.¹⁰ All mutations identified so far are in exon nine and affect three amino acids within a six-amino acid sequence (RSPPDG) located 31–36 amino acids upstream of the SH2 domain and 205–210 amino acids downstream of the SH3-binding domain.³

We have recently reported a case in an 8-year boy, which progressed rapidly and 17 months later he died of septicemia.¹¹ Considering the rapid and aggressive course of the lesions and the fact that *SH3BP2* is related to the condition, we aimed to investigate this gene in the case previously reported and advance the understanding of the etiology and pathogenesis of cherubism.

Materials and methods

Extraction of the tumor cell DNA was performed from the paraffin block in accordance with protocols described by Isola et al (1994).¹² The primers used have been previously described.¹³ Briefly, PCR reactions were performed in a final volume of 50 µl containing a proofreading taq DNA polymerase (Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity, Invitrogen). Thirty-five cycles of amplification were done in a PTC-100-60 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) with the appropriate parameters. The amplified products were analyzed by electrophoresis on a 6.5% polyacrylamide gel followed by silver stain. DNA sequencing reactions were carried out using the BigDye terminator kit and a DNA ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA) always performed in duplicate, both strands, from different amplification products to lessen artificial artifacts. Numbering of nucleotide and amino acid refers to the complete cDNA sequence of *SH3BP2* (GenBank NM003023).

Results

Sequencing of all coding regions of the *SH3BP2* gene demonstrated a novel mutation in the exon 3. The mutation corresponds to a deletion of cytosine (408delC) (Fig. 1). This mutation is located in a PH domain of the SH3BP2 (Fig. 2). The 408delC led to a premature stop codon 1460bp upstream the wild type stop codon TGA (GenBank: NM003023) with loss of SH3 and SH2 domains (GenBank AAH22996).

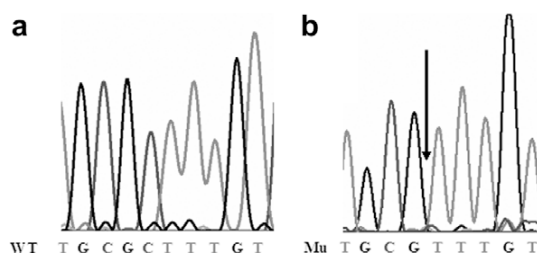


Figure 1 (a) Wild type DNA sequence of exon 3; (b) DNA sequence showing the deletion of cytosine (408delC).

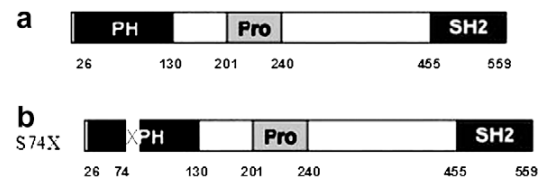


Figure 2 (a) Schematic structure of the SH3BP2 and its domains: pleckstrin homology domain (PH), a proline-rich region (Pro), and an SH2 domain (SH2). (b) The truncated protein and loss of remaining domains.

Discussion

The adaptor protein SH3BP2 was originally isolated as a proteintyrosine kinase c-Abl-Src homology 3 (SH3) domain-binding protein of unknown function.¹⁴ *SH3BP2* has 13 exons, but all *SH3BP2* mutations described in patients with cherubism occurred within a six amino acid region, encoded by exon 9.^{3,4,13} The *SH3BP2* gene lies within a region that is frequently deleted in individuals with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS; MIM #194190), but haploinsufficiency of *SH3BP2* in patients with WHS does not result in cherubism or cherubism-like characteristics.^{15,16}

Our genetic analysis showed a novel mutation (408del C) associated with an aggressive behavior of cherubism. This deletion occurred in an important N-terminal pleckstrin homology domain, which has diverse functions in the cell. It specifically binds phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphate (PtdIns(3,4,5)P3) via its PH domain and it acts as a PI 3-kinase effector mediating biological responses such as cell adhesion and membrane trafficking.¹⁷ PH domain is often involved in targeting proteins to the plasma membrane, but few display strong specificity in lipid binding.¹⁷

Although all studies have shown that *SH3BP2* mutations in cherubism affect different domains, it remains unclear how *SH3BP2* mutations could lead to different cherubism phenotypes. We believe that further genotype-phenotype association studies in individuals with cherubism will help to establish the basis for the phenotypic variability and provide important clues of the pathogenesis of this disease.

References

1. Jones WA. Familial multilocular cystic disease of the jaw. *Am J Cancer* 1933;17:946–50.
2. Mangion J et al. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. *Am J Hum Genet* 1999;65(1):151–7.
3. Ueki Y et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 2001;28:125–6.
4. Lo B, Faiyaz-Ul-Haque M, Kennedy S, Aviv R, Tsui LC, Teebi AS. Novel mutation in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 causes cherubism. *Am J Med Genet* 2003;121A:37–40.
5. Miah SM, Hatani T, Qu X, Yamamura H, Sada K. Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function. *Genes Cells* 2004;9:993–1004.
6. Lietman SA, Kalinchinko N, Deng X, Kohanski R, Levine MA. Identification of a novel mutation of SH3BP2 in cherubism and demonstration that SH3BP2 mutations lead to increased NFAT activation. *Hum Mutat* 2006;27(7):717–8.
7. Arnott DG. Cherubism: an initial unilateral presentation. *Br J Oral Surg* 1979;16:38–46.

8. Ramon Y, Engelberg IS. An usually extensive case of cherubism. *J Oral Maxillofac Surg* 1986;**44**:325–8.
9. Motamedi MHK. Treatment of cherubism with locally aggressive behaviour presenting in adulthood: Report of four cases and a proposed new grading system. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;**56**: 1336–42.
10. Bell SM, Shaw M, Jou YS, Myers RM, Knowles MA. Identification and characterization of the human homologue of SH3BP2, an SH3 binding domain protein within a common region of deletion at 4p16.3 involved in bladder cancer. *Genomics* 1997;**44**:163–70.
11. Silva EC, de Souza PE, Barreto DC, Dias RP, Gomez RS. An extreme case of cherubism. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2002;**40**(1):45–8.
12. Isola J, DeVries S, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequences copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994;**145**:1301–8.
13. Imai Y et al. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Cran J* 2003;**40**:632–8.
14. Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. *Science* 1993;**259**:1157–61.
15. Zollino M et al. Genotype-phenotype correlations and clinical diagnostic criteria in Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet* 2000;**94**(3):254–61.
16. Bergemann AD, Cole F, Hirschhorn K. The etiology of Wolf-Hirschhorn syndrome. *Trends Genet* 2005;**21**(3):188–95., Review.
17. Marchler-Bauer A et al. CDD: a Conserved Domain Database for protein classification. *Nucleic Acids Res* 2005;**33**:D192–6.

ORIGINAL ARTICLE

Novel mutations in the *SH3BP2* gene associated with sporadic central giant cell lesions and cherubism

VM Carvalho^{1,2}, PF Perdigão^{1,2}, FR Amaral^{1,2}, PEA de Souza³, L De Marco¹, RS Gomez²

¹Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ²Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil; ³School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

Central giant cell lesion (CGCL) is a reactive bone lesion that occurs mainly in the mandible, characterized by the multinucleated osteoclast-like giant cells in a background of oval to spindle-shaped mononuclear cells. The etiology is unknown and occurs more commonly in young adults. Cherubism, a rare disease found predominantly in females has histologic characteristics indistinguishable from those of CGCL and is caused by mutations mostly present in exon 9 of the *SH3BP2* gene. In this study, we investigated four cases of CGCL and one case of cherubism. DNA was extracted from peripheral blood and tumor tissue and all coding and flanking regions of the *SH3BP2* amplified by PCR and directly sequenced to identify underlying mutations. Two novel mutations were found; a heterozygous missense mutation c.1442A>T (Q481L) in exon 11 in one sporadic case of CGCL and a heterozygous germline and tumor tissue missense mutation c.320C>T (T107M) in exon 4 in one patient with cherubism. These findings open a new window to investigate the possible relationship between the pathogenesis of the cherubism and CGCL.

Oral Diseases (2009) 15, 106–110

Keywords: central giant cell lesion; SH3-binding protein; SH3BP2; cherubism

Introduction

The central giant cell lesion (CGCL) was first described by Jaffe (1953) as a giant-cell reparative granuloma of the jaw bones. CGCL is a reactive intra-osseous lesion resulting from a local reparative reaction of unknown

etiology. It occurs mainly in the mandible and the age of most patients ranges from 10 to 25 years (de Lange *et al*, 2007c). Radiographic findings are diverse, varying from small unilocular lesions to large multilocular lesions with displacement of teeth, root resorption, and cortical perforation (Horner, 1989). Histologically, CGCL is characterized by the presence of multinucleated osteoclast-like giant cells in a background of oval to spindle-shaped mononuclear cells (Neville *et al*, 2002). Cherubism (MIM 118400) is an autosomal dominant inherited syndrome characterized by excessive bone degradation of the upper and lower jaws followed by development of fibrous tissue masses, which causes a characteristic facial swelling (Ueki *et al*, 2001). The gene responsible for cherubism is located on chromosome 4p16.3 and named *SH3BP2* (Mangion *et al*, 1999). To date, all mutations of the *SH3BP2* identified in familial cherubism are present in exon nine and affect three amino acids within a conserved six amino acid sequence (RSPPDG), the SH3-binding domain (Hatani and Sada, 2008). Recently, a mutation in the *SH3BP2* gene was described in a case of non-familial cherubism (Imai *et al*, 2003) and also in one aggressive case of sporadic cherubism (Carvalho *et al*, 2008). Although the etiology of CGCL is unknown, the similar histologic features of this lesion with cherubism suggest that both conditions share the same genetic alteration. Therefore, we investigated all coding and flanking sequences of the *SH3BP2* gene in patients with CGCL.

Material and methods

In this report, we studied frozen samples from four cases of CGCL and one case of cherubism, collected between 1998 and 2004 and stored at –80°C. The criteria for CGCL diagnosis is described elsewhere (Neville *et al*, 2002; de Lange *et al*, 2007c). All lesions were located in the midline or posterior region of the mandible. The University Ethics Committee approved the work. After an informed written consent signed by all patients, fragments of the lesions were obtained during surgical

Correspondence: RS Gomez, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas, Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627 Belo Horizonte, CEP 31270-901 MG, Brazil. Tel: +55 31 3499 2477, Fax: +55 31 3499 2472, E-mail: rsgomez@ufmg.br
Received 6 August 2008; revised 24 September 2008; accepted 29 September 2008

removal procedures. A piece of the fragment was fixed in 10% formalin buffer and paraffin-embedded tissue blocks were used for routine histologic staining to confirm the clinical diagnosis. All five lesions studied showed typical histologic features of CGCL described in the literature (Neville *et al*, 2002; de Lange *et al*, 2007c). Another piece of the specimen sample was immediately stored at -80°C for subsequent molecular analyzes. In addition, peripheral blood was collected from all subjects. The CGCL was considered aggressive when the lesion was larger than 4 cm in size and the cortical bone was damaged or expanded and teeth displaced (Chuong *et al*, 1986).

One case was referred to the School of Dentistry as bilateral CGCL and her clinical chart did not report cherub face or familial cases of cherubism. After an intra oral examination, a discreet expansion of the mandible was noted. Radiographic findings showed bilateral multilocular lesions of the mandible with tooth displacement. Although no cherub face was seen, our diagnostic hypothesis was that of cherubism with low expressivity. Therefore, in addition to clinical and biochemical data, DNA of tumor and blood cells was extracted and the *SH3BP2* gene investigated.

All patients were unrelated and underwent detailed hematologic and biochemical evaluation, including parathyroid hormone (PTH) levels, alkaline phosphatase activity, serum calcium and phosphorus concentrations. All these parameters were within normal ranges.

Genomic DNA was extracted from lesions and peripheral blood using the GenomicPrep kit according to the manufacturer's instructions (Amersham Pharmacia Biotech Inc., Piscataway, NJ, USA). All coding and flanking regions of the *SH3BP2* gene were investigated using previously described PCR primers and reaction conditions (Imai *et al*, 2003). Briefly, PCR reactions were performed in a final volume of 50 μl containing 200 ng of template DNA, 200 μM dNTPs, 10 pM of each primer and 1.25 U of a proofreading Taq polymerase (Platinum[®] Taq DNA Polymerase High Fidelity; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Thirty-five cycles of amplification were performed in a PTC-100-60 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) with the appropriate parameters. The amplified products were analyzed by electrophoresis on a 6.5% polyacrylamide gel followed by silver stain. DNA bands corresponding to expected size were purified using the GFX PCR DNA

and Gel Band Purification Kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA). DNA sequencing reactions were carried out using the BigDye Terminator kit in a DNA ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All experiments were performed in duplicate with both strands and from different amplification products to lessen artificial artifacts. Numbering of nucleotide and amino acid refers to the complete cDNA sequence of *SH3BP2*. In order to exclude single nucleotide polymorphisms (SNPs), we sequenced DNA from 50 unrelated control subjects with the same ethnic background. This group was comprised of patients without history of CGCL or Cherubism. The NCBI SNP database was also checked to rule out polymorphisms.

Results

To verify the presence of mutations of the *SH3BP2* gene in CGCL and cherubism patients, all 13 coding and flanking regions were sequenced from PCR products from tumor DNA as well as peripheral blood DNA. Clinical and radiological features as well as the molecular alterations found in the *SH3BP2* gene are shown in Table 1.

The patient with cherubism (#1) presented a germline heterozygous substitution of cytosine to thymine c.320C > T (T107M) in exon 4 (Figure 1a). This mutation leads to an exchange of the amino acid threonine to methionine in the N-terminal pleckstrin domain. The presence of this germline mutation led us to screen the patient's close relatives. Besides her parents, no other relatives were available for clinical assay. Oral mucosal cells were collected from them, DNA extracted and sequencing of the *SH3BP2* gene performed.

The mother was shown to carry the same heterozygous mutation c.320C > T found in the propositus (data not shown). To predict whether the molecular alterations present in both patients would affect protein function, the algorithm SORTING INTOLERANT FROM TOLERANT (SIFT) (<http://blocks.fhcr.org/sift/SIFT.html>) was used.

Analysis of the *SH3BP2* gene in patient with non-aggressive CGCL (#2) showed the presence of a novel heterozygous mutation c.1442A > T (Q481L) in exon 11 (Figure 1b), leading to an exchange of amino acid Glutamine to Leucine in the C-terminal SH2 domain. No germline mutation was found in this patient.

Table 1 Clinical data, radiological features and mutations detected in patients with cherubism (#1) and central giant cell lesion (#2 to #5)

Case no.	Age (years)	Sex	Aggressiveness	X-ray findings	Mutation (germline)	Mutation (tumor)
1	12	F	Yes	Large destructive multilocular radiolucent lesions with tooth displacement	c.320C > T	c.320C > T
2	41	F	No	Small unilocular radiolucent lesion	Wild type	c.1442A > T
3	46	M	Yes	Large destructive multilocular radiolucent lesion	Wild type	Wild type
4	11	M	Yes	Large destructive multilocular radiolucent lesion	Wild type	Wild type
5	19	M	No	Multilocular radiolucent lesion	Wild type	Wild type

Nucleotides are numbered according to the ENST00000356331.

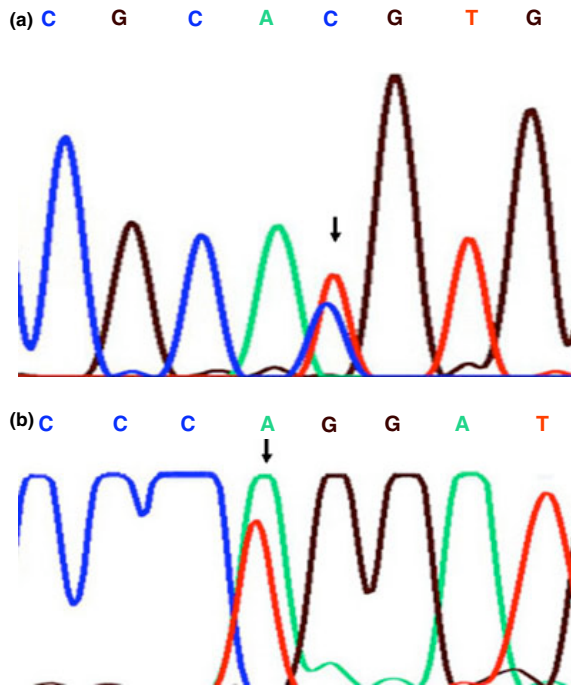


Figure 1 Chromatogram sequence data of the propositus #1 showing the heterozygous c.320C>T mutation (a); Chromatogram sequence data of the propositus #2 showing the heterozygous c.1442A>T mutation (b)

Discussion

A number of conditions can present with lesions that histologically are indistinguishable from CGCL of the jaws, including giant cell tumors, aneurysmal bone cyst, brown tumors of hyperparathyroidism, cherubism and other inherited syndromes associated with genetic mutations such as Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome, Neurofibromatosis type 1 and Ramon syndrome (Pina-Neto *et al*, 1986; van Damme and Mooren, 1994; Lee *et al*, 2005).

The gene *SH3BP2* that codes for the adapter protein SH3BP2 was identified in 2001 on chromosome 4p16.3 (Mangion *et al*, 1999; Tiziani *et al*, 1999; Ueki *et al*, 2001). A mutation in exon 9 of the *SH3BP2* gene was described in a case of non-familial cherubism (Imai *et al*, 2003). Subsequently, *SH3BP2* gene molecular analysis of exon 9 in patients with sporadic central or peripheral giant cells lesions have not demonstrated the presence of mutations (de Lange *et al*, 2007b; Lietman *et al*, 2007; Idowu *et al*, 2008). In this report, we analyzed all coding and flanking regions of the *SH3BP2* gene and found two novel mutations of *SH3BP2*, one associated with a sporadic case of CGCL and one in a patient with cherubism.

Three functional domains of *SH3BP2* have been described; the N-terminal pleckstrin homology domain (PH), a 10-amino acid SH3 binding site and C-terminal SH2 domain (Ren *et al*, 1993). Patient #2 presented a

heterozygous mutation c.1442A>T (Q481L) in exon 11, a SH2 domain of the *SH3BP2*. This mutation was present only in tumor cells. The Src homology 2 domain (SH2) is involved in recognition of phosphorylated tyrosine (pTyr) and SH2 domains typically bind pTyr-containing ligands via two surface pockets allowing proteins with SH2 domains to localize to tyrosine phosphorylated sites (Ingley, 2008). Analysis of the protein function based on sequence homology and the physical properties of amino acids using the SIFT software program shows that the Q481L alteration in the SH2 domain affects protein function, possibly arresting SH3BP2 to localize tyrosine phosphorylated sites. To date, functional studies of *SH3BP2* mutations have not been performed. But their association with disease, location in areas of the molecule that are highly conserved between species (http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/searchview?species=;idx=;q=sh3bp2) and most important, their absence in normal controls, suggest that they are pathogenic.

Lietman *et al* (2007) studied exon 9 of *SH3BP2* gene in 10 giant cell tumors of bone and nine giant cell reparative granulomas and did not find any molecular alteration. In addition, they showed that SH3BP2 transcript and protein as well as NFATc1 protein were abundantly expressed in CGCL. They also found a smaller transcript in the RNA from one giant cell lesion and speculated that a mutation outside exon 9 could be responsible for this truncated protein. Idowu *et al* (2008) did not find mutations in exon 9 of the *SH3BP2* gene in CGCL of the jaw and neither did de Lange *et al* (2007b). It is important to emphasize that these authors limited to exon 9 their search for *SH3BP2* gene mutations.

At this study, we found a novel germline mutation in exon 4 (c.320C>T) in one young female patient presenting with cherubism with low expressivity. This mutation led to a substitution of threonine to methionine in the N-terminal pleckstrin domain. PH domain is only found in eukaryotes and is the eleventh most populous domain family in the human genome (Lander *et al*, 2001). PH domains is only found in cellular signaling proteins such as serine/threonine kinase, tyrosine kinases, regulators of G-proteins, endocytotic GTPases, adaptors, as well as cytoskeleton associated molecules and in lipid associated enzymes (Ingley and Hemmings, 1994; Lemmon, 2004).

Our patient with cherubism fulfilled some clinical and radiographic criteria used in its diagnosis such as bilateral swelling of the jaw with expansion or thinness of the cortical bone, bilateral multilocular radiolucencies, tooth displacement and root resorption (de Lange *et al*, 2007a). Cherubism shows 100% penetrance in males and 50–70% in females (von Wower, 2000; Horton, 2002; Marx and Stern, 2002) and the expressivity is wide, ranging from bilateral non-expandable to highly destructive lesions (von Wower, 2000). Because of incomplete penetrance of cherubism in females and to its variability of expressivity, some cases of cherubism may be under-diagnosed. Recently, we reported a novel mutation in the *SH3BP2* gene outside exon 9 in one aggressive case of cherubism (Carvalho *et al*, 2008).

Given that all but one previous report of mutations in the *SH3BP2* have looked only in exon 9, additional studies analyzing the entire gene and trying to correlate genotype–phenotype features in individuals with cherubism will help to establish the basis for the disease's phenotypic variability.

Up to now, it has been suggested that the *SH3BP2* gene plays a role in regulating increased osteoblast and osteoclast activities (Ueki *et al*, 2007). Furthermore, it is proposed that mutations in the *SH3BP2* gene could cause pathologic activation of osteoclasts, probably by dysfunction of the *SH3BP2* gene in the regulatory pathway of osteoclastogenesis (Miah *et al*, 2004; Hyckel *et al*, 2005). In this process, *SH3BP2* has an influence on the regulation of the PTH receptor and PTH-related protein (PTHrP), interacting with the chaperone protein 14-3-3 (Foucault *et al*, 2003), which was recently described as a regulatory protein of type I PTH/PTHrP receptor (Tazawa *et al*, 2003).

Lietman *et al* (2006) showed that heterozygotic mutations in exon 9 of the *SH3BP2* led to increased NFAT (nuclear factor of activated T-cells), an osteoclastogenic mediator, indicating that the cherubism results from gain of function mutations in *SH3BP2*. The NFATc1 isoform (also termed NFAT2) has been proposed as an important master transcription factor for osteoclastogenesis (Foucault *et al*, 2003a,b). Dysfunction of SH3BP2 protein by point mutations causes pathologic activation of osteoclasts in cherubism, suggesting that endogenous SH3BP2 has a regulatory role in the development and/or activation of osteoclasts in jaw bones (Miah *et al*, 2004). The maturation of osteoclasts requires osteoblasts and stromal cells releasing macrophage colony-stimulating factor and the receptor for activation of nuclear factor κ B ligand (RANKL) that are essential to promote osteoclastogenesis (Roodman, 1999).

In this study, novel *SH3BP2* gene mutations in sporadic CGCL and in one case of cherubism were demonstrated. Considering the diverse clinical behavior of cherubism it is possible that some non-familial cases of cherubism are undistinguishable from sporadic cases of CGCL. Further sequencing of all coding as well as flanking and promoter regions of the *SH3BP2* gene in CGCL and non-familial cherubism cases with variable expressivity and penetrance are necessary to provide important insights into molecular mechanisms associated with these lesions.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) and from Milênio/Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Brazil; L De Marco and RS Gomez are Research Fellows of CNPq.

Author contributions

VM Carvalho, PF Perdigão, L De Marco and RS Gomez contributed in study concepts, study design, definition of

intellectual content and in manuscript preparation and editing. VM Carvalho, PF Perdigão, FR Amaral and PEA Souza contributed in data acquisition.

References

- Carvalho VM, Perdigão PF, Pimenta FJ, de Souza PE, Gomez RS, De Marco L (2008). A novel mutation of the *SH3BP2* gene in an aggressive case of cherubism. *Oral Oncol* **44**: 153–155.
- Chuong R, Kaban LB, Kozakewich H, Perez-Atayde A (1986). Central giant cell lesions of the jaws; a clinicopathologic study. *J Oral Maxillofac Surg* **44**: 708–713.
- van Damme PA, Mooren RE (1994). Differentiation of multiple giant cell lesions, Noonan-like syndrome, and occult hyperparathyroidism. Case report and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* **23**: 32–36.
- Foucault I, Liu YC, Bernard A, Deckert M (2003). The chaperone protein 14-3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function. *J Biol Chem* **278**: 7146–7153.
- Hatani T, Sada K (2008). Adaptor protein 3BP2 and cherubism. *Curr Med Chem* **15**: 549–554.
- Horner K (1989). Central giant cell granuloma of the jaws: a clinico-radiological study. *Clin Radiol* **40**: 622–626.
- Horton WA (2002). Abnormalities of bone structure. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR, eds. *Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics*, 4th edn. Churchill Livingstone: London, pp. 4155–4156.
- Hyckel P, Berndt A, Schleier P *et al* (2005). Cherubism – new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. *J Craniomaxillofac Surg* **33**: 61–68.
- Idowu BD, Thomas G, Frow R, Diss TC, Flanagan AM (2008). Mutations in *SH3BP2*, the cherubism gene, were not detected in central or peripheral giant cell tumours of the jaw. *Br J Oral Maxillofac Surg* **46**: 229–230.
- Imai Y, Kanno K, Moriya T *et al* (2003). A missense mutation in the *SH3BP2* gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Craniofac J* **40**: 632–638.
- Ingle E (2008). Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* **1784**: 56–65.
- Ingle E, Hemmings BA (1994). Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction. *J Cell Biochem* **56**: 436–443.
- Jaffe HL (1953). Giant-cell reparative granuloma, traumatic bone cyst, and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of the jawbones. *Oral Surg* **6**: 159–175.
- Lander ES, Linton LM, Birren B *et al* (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860–921.
- de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJ (2007a). A new mutation in the *SH3BP2* gene showing reduced penetrance in a family affected with cherubism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **103**: 378–381.
- de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJ (2007b). DNA analysis of the *SH3BP2* gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. *Br J Oral Maxillofac Surg* **45**: 499–500.
- de Lange J, van den Akker HP, Van den Berg H (2007c). Central giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **104**: 603–615.
- Lee JS, Tartaglia M, Gelb BD *et al* (2005). Phenotypic and genotypic characterisation of Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome. *J Med Genet* **42**: e11.

- Lemmon MA (2004). Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* **32**: 707–711.
- Lietman SA, Kalinchinko N, Deng X, Kohanski R, Levine MA (2006). Identification of a novel mutation of *SH3BP2* in cherubism and demonstration that *SH3BP2* mutations lead to increased NFAT activation. *Hum Mutat* **27**: 717–718.
- Lietman SA, Prescott NL, Hicks DG, Westra WH, Levine MA (2007). *SH3BP2* is rarely mutated in exon 9 in giant cell lesions outside cherubism. *Clin Orthop Relat Res* **459**: 22–27.
- Mangion J, Rahman N, Edkins S et al (1999). The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. *Am J Hum Genet* **65**: 151–157.
- Marx RE, Stern D (2002). *Oral and maxillofacial pathology*. Quintessence: Chicago, pp. 744.
- Miah SM, Hatani T, Qu X, Yamamura H, Sada K (2004). Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function. *Genes Cells* **9**: 993–1004.
- Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE (2002). *Oral and maxillofacial pathology*, 2nd edn. WB Saunders Co: Philadelphia.
- Pina-Neto JM, Moreno AF, Silva LR et al (1986). Cherubism, gingival fibromatosis, epilepsy, and mental deficiency (Ramon syndrome) with juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Med Genet* **25**: 433–441.
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D (1993). Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* **259**: 1157–1161.
- Roodman GD (1999). Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* **27**: 1229–1241.
- Tazawa H, Takahashi S, Zilliacus J (2003). Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta* **1620**: 32–38.
- Tiziani V, Reichenberger E, Buzzo CL et al (1999). The gene for cherubism maps of chromosome 4p16. *Am J Hum Genet* **65**: 158–166.
- Ueki Y, Tiziani V, Santanna C et al (2001). Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein *SH3BP2* cause cherubism. *Nat Genet* **28**: 125–126.
- Ueki Y, Lin CY, Senoo M et al (2007). Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in *SH3BP2* ‘cherubism’ mice. *Cell* **128**: 71–83.
- von Wowern N (2000). Cherubism: a 36-year long-term follow-up of 2 generations in different families and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* **90**: 765–772.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

4 Considerações Finais

O TCG, o tumor marrom do hiperparatireoidismo, o Querubismo e outras Síndromes herdadas como a de Noonan, a Neurofibromatose tipo1 e a de Ramon são doenças podem apresentar lesões histologicamente indistinguíveis das LCCG (VAN DAMME & MOOREN, 1994; PINA-NETO *et al.*, 1986; LEE *et al.*, 2005).

O gene *SH3BP2* foi identificado no cromossomo 4p16.3 e relacionado à etiologia do Querubismo (UEKI *et al.*, 2001; MANGION *et al.*, 1999; TIZIANI *et al.*, 1999). Três domínios funcionais do *SH3BP2* foram descritos: um domínio de homologia pleckstrin N-terminal (PH), um sítio de ligação SH3 com 10 aminoácidos e um domínio SH2 C-terminal (REN *et al.*, 1993).

O gene *SH3BP2* possui 13 exons, mas todas as mutações descritas em pacientes com Querubismo ocorreram em uma região de 6 aminoácidos, codificada pelo exon 9 (UEKI *et al.*, 2001; IMAI *et al.* 2003, LO *et al.* 2003). Outros trabalhos demonstraram a ocorrência de mutação ao avaliarem o mesmo exon em casos de Querubismo (LI & YU, 2006; DE LANGE *et al.*, 2007a).

Apesar de todos os estudos mostrarem que as mutações no *SH3BP2* do Querubismo afetam diferentes domínios, ainda permanece incerto como estas mutações poderiam acarretar diferentes fenótipos.

Neste trabalho, todas as regiões codificadoras do gene *SH3BP2* foram analisadas e três novas mutações encontradas: uma associada a LCCG esporádica e outras duas associadas a casos de Querubismo.

A nova mutação (408delC) no caso de Querubismo agressivo deste estudo ocorreu em um importante domínio de homologia pleckstrin N-terminal, que tem

funções diversas na célula. Ela se liga especificamente ao fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato através de seu domínio PH e medeia respostas como adesão celular e tráfego de membrana. O domínio PH está normalmente envolvido na captura de proteínas para a membrana plasmática (MARCHLER-BAUER *et al.*, 2005).

A mutação heterozigótica associada ao caso de LCCG: A1442T (Gln481Leu), ocorreu no exon 11, no domínio SH2 do *SH3BP2*. A análise da função da proteína baseada na sequência de homologia e nas propriedades físicas de aminoácidos usando o programa SIFT (<http://blocks.fhcrc.org/sift/SIFT.html>) mostra que esta alteração afeta a função da proteína, possivelmente impedindo a *SH3BP2* de localizar regiões de tirosina fosforiladas.

Enfatiza-se que tanto Lietman *et al.* (2007) quanto Idowu *et al.* (2008) e de Lange *et al.* (2007b) não encontraram mutações nas LCCG, porém, eles limitaram seus estudos ao exon 9 do gene *SH3BP2*.

Estudos funcionais das mutações no *SH3BP2* não foram realizados até o momento, mas por elas estarem associadas com a doença, localizadas em áreas da molécula que são altamente conservadas entre espécies (www.ensembl.org/Homo_sapiens/Search/Summary?species=Homo_sapiens;idx=:q=sh3bp2) e principalmente, por estarem ausentes em controles normais, torna-se sugestivo que elas sejam patogênicas.

Uma nova mutação germinativa no exon 4 (C320T) foi encontrada na paciente diagnosticada com Querubismo de baixa expressividade. Esta mutação acarretou a substituição de Treonina por Metionina em um domínio Pleckstrin N-terminal. O domínio PH é encontrado apenas em Eucariotos e é uma das famílias de domínio mais populosa no genoma humano (LANDER *et al.*, 2001). Ele está presente em

proteínas de sinalização celular, tais como serina-treonina quinase, tirosina quinase, reguladores de proteína G, GTPases, assim como moléculas associadas ao citoesqueleto e em enzimas associadas a lipídeos (INGLEY & HEMMING, 1994; LEMMON, 2004).

O Querubismo apresenta 100% de penetrância em homens e 50-70% em mulheres (VON WOWER, 2000; HORTON, 2002; MARX AND STERN, 2002) e a expressividade é ampla, variando de lesões bilaterais sem expansão óssea a lesões muito destrutivas (VON WOWER, 2000).

Devido à penetrância incompleta do Querubismo em mulheres e de sua variabilidade de expressão, alguns casos podem ser diagnosticados erroneamente. Considerando seu comportamento clínico variável, é provável que alguns casos de Querubismo não-familiar sejam indistinguíveis de casos esporádicos de LCCG.

Lietman *et al.* (2007) mostraram que o transcrito e a proteína do *SH3BP2*, assim como a proteína NFATc1, estavam expressos de forma abundante nas LCCG. Eles encontraram também um transcrito menor no RNA de uma LCCG e sugeriram que uma mutação fora do exon 9 poderia ser a responsável por esta proteína truncada.

Ueki *et al.* (2007) sugeriram que o gene *SH3BP2* exerce um papel regulador em osteoblastos e osteoclastos, aumentando a atividade deles. Foi proposto que mutações neste gene podem causar ativação patológica de osteoclastos, provavelmente pela disfunção do *SH3BP2* na regulação da via da osteoclastogênese (MIAH *et al.*, 2004; HYCKEL *et al.*, 2005).

A disfunção da proteína SH3BP2, devido a mutações pontuais no gene, causam a ativação patológica de osteoclastos observada no Querubismo, sugerindo

que a SH3BP2 endógena exerce um papel regulador no desenvolvimento e/ ou ativação de osteoclastos nesta Síndrome (MIAH *et al.*, 2004).

Mutações heterozigóticas no exon 9 do *SH3BP2* causaram o aumento de NFAT, que é um mediador osteoclastogênico, indicando que o Querubismo resulta de mutações funcionais (LIETMAN *et al.*, 2006).

Considerando que este é o primeiro trabalho a avaliar o gene *SH3BP2* por completo, estudos adicionais similares, que relacionem genótipo-fenótipo em indivíduos com Querubismo e LCCG esporádicas, ajudarão a estabelecer a base da variabilidade fenotípica destas doenças, assim como aspectos patogênicos compartilhados entre elas.

5 CONCLUSÕES

5 CONCLUSÕES

1 Existe uma variabilidade genética nas alterações moleculares das Lesões centrais de células gigantes e do Querubismo, assim como na expressão fenotípica destas doenças.

2 As Lesões centrais de células gigantes esporádicas podem apresentar mutações no gene *SH3BP2*.

3 Avaliações moleculares do gene *SH3BP2* em LCCG e no Querubismo devem incluir o seqüenciamento de todos os exons, uma vez que as mutações podem estar fora da região hot spot em ambos os casos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Arnott DG. Cherubism: An initial unilateral presentation. *Br J Oral Surg* 1979;**16**:38-46.
- 2 Auclair PL, Cuenin P, Kratochvil FJ, Slater LJ, Ellis GL. A clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumour. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;**66**:197-208.
- 3 Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Kleihues P, Sobin LH, series eds. World Health Organization Classification of Tumours. Lyon, France: IARC Press, 2005. p. 324.
- 4 Battaglia A, Carey JC. Health supervision and anticipatory guidance of individuals with Wolf-Hirschhorn syndrome. *Am J Med Genet.* 1999 Jun 25;**89**(2):111-5.
- 5 Bell SM, Shaw M, Jou YS, Myers RM, Knowles MA. (1997) Identification and characterization of the human homologue of SH3BP2, an SH3 binding domain protein within a common region of deletion at 4p16.3 involved in bladder cancer. *Genomics*, **44**:163-170.
- 6 Carvalho VM, Perdigão PF, Pimenta FJ, de Souza PE, Gomez RS, De Marco L. A novel mutation of the SH3BP2 gene in an aggressive case of cherubism. *Oral Oncol* 2008; **44**(2):153-5.
- 7 Chuong R, Kaban LB, Kozakewich H, Perez-Atayde A. Central giant cell lesions of the jaws; a clinicopathologic study. *J Oral Maxillofac Surg* 1986; **44**:708-13.
- 8 Cossio, P.F. et al. Recurrent central giant cell granuloma in the mandible: surgical treatment and dental implant restoration. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2007; **12**:229-32.
- 9 de Lange J, van den Akker HP, Klip H. Incidence and diseasefree survival after surgical therapy of central giant-cell granulomas of the jaw in The Netherlands: 1990-1995. *Head Neck* 2004;**26**:792-5.
- 10 de Lange J, van den Akker HP, Veldhuijzen van Zanten GO, Engelshove HA, van den Berg H, Klip H. Calcitonin therapy in central giant cell granuloma of the jaw: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2006; **35**:791-5.
- 11 de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJ. A new mutation in the *SH3BP2* gene showing reduced penetrance in a family affected with cherubism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*

Endod 2007a;**103**:378-81.

- 12 de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJ. DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007b;**45**:499-500.
- 13 de Lange J, van den Akker HP, Van den Berg H. Central giant cell granuloma of the jaw: a review of the literature with emphasis on therapy options. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2007c;**104**(5):603-15.
- 14 Deckert M, Tartare-Deckert S, Hernandez J, Rottapel R, Altman A. Adaptor function for the Syk kinases-interacting protein 3BP2 in IL-2 gene activation. *Immunity*. 1998 Nov;**9**(5):595-605.
- 15 Flanagan AM, Nui B, Tinkler SM, Horton MA, Williams DM, Chambers TJ. The multinucleate cells in giant cell granulomas of the jaw are osteoclasts. *Cancer*. 1988 Sep 15;**62**(6):1139-45.
- 16 Foucault I, Liu YC, Bernard A, Deckert M: The chaperone protein 14-3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function. *J Biol Chem* 2003;**278**(9): 7146–53.
- 17 Hatani T, Sada K. Adaptor protein 3BP2 and cherubism. *Curr Med Chem* 2008;**15**(6):549-54.
- 18 Hawes M. J. Cherubism and its orbital manifestations. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1989;**5**:133–140.
- 19 Hirschhorn, K., Cooper, H.L. & Firschein, I.L. *Humangenetik* 1965;**1**:479–482.
- 20 Horner K. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinico-radiological study. *Clin Radiol* 1989;**40**(6):622-6.
- 21 Horton WA. Abnormalities of bone structure. In: Rimoin DL, Connor JM, Pyeritz RE, Korf BR. Emery and Rimoin's principles and practice of medical genetics. 4th ed. London: Churchill Livingstone, 2002. p. 4155-6.
- 22 Hyckel P, Berndt A, Schleier P, Clement JH, Beensen V, Peters H, et al. Cherubism - new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. *J Craniomaxillofac Surg* 2005;**33**(1):61-8.
- 23 Idowu BD, Thomas G, Frow R, Diss TC, Flanagan AM. Mutations in SH3BP2, the cherubism gene, were not detected in central or peripheral giant cell tumours of the jaw. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008;**46**(3):229-30.

- 24 Imai Y, Kanno K, Moriya T, Kayano S, Seino H, Matsubara Y, et al. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Craniofac J* 2003;**40**(6):632-38.
- 25 Ingley E, Hemmings BA. Pleckstrin homology (PH) domains in signal transduction. *J Cell Biochem* 1994; **56**(4):436-43.
- 26 Ingley E. Src family kinases: regulation of their activities, levels and identification of new pathways. *Biochim Biophys Acta* 2008;**1784**(1):56-65.
- 27 Isola J, DeVries, Ghazvini S, Waldman F. Analysis of changes in DNA sequences copy number by comparative genomic hybridization in archival paran-embedded tumor samples. *Am J Pathol* 1994;**145**:1301-8.
- 28 Itonaga I, Schulze E, Burge PD, Gibbons CLMH, Ferguson D, Athanasou NA. Phenotypic characterization of mononuclear and multinucleated cells of giant cell reparative granuloma of small bones. *J Pathol* 2002;**198**:30-6.
- 29 Itonaga I, Hussein I, Kudo O, Sabokbar A, Watt-Smith S, Ferguson D, Athanasou NA. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar resorption in giant cell granuloma of the jaw. *J Oral Pathol Med* 2003;**32**(4):224-31.
- 30 Jones WA. Familial multilocular cystic disease of the jaws. *Am J Cancer* 1933; **17**:946-950
- 31 Jaffe HL. Giant-cell reparative granuloma, traumatic bone cyst, and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of the jawbones. *Oral Surg* 1953;**6**:159-75.
- 32 Katsikeris N, Kakarantza-Angelopoulou E, Angelopoulos AP. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1988;**17**(2):94-9.
- 33 Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; **409**(6822):860-921.
- 34 Lee JS, Tartaglia M, Gelb BD, Fridrich K, Sachs S, Stratakis CA, et al. Phenotypic and genotypic characterisation of Noonan-like/multiple giant cell lesion syndrome. *J Med Genet* 2005;**42**(2):e11.
- 35 Lee JY, Jung YS, Kim SA, Lee SH, Ahn SG, Yoon JH. Investigation of the SH3BP2 gene mutation in cherubism. *Acta Med Okayama* 2008; **62**(3):209-12.
- 36 Lemmon MA. Pleckstrin homology domains: not just for phosphoinositides. *Biochem Soc Trans* 2004;**32**(Pt 5):707-11.

- 37 Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathological bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med* 2004;**15**:64-81.
- 38 Li, C.; Yu, S. A novel mutation in the SH3BP2 gene causes cherubism: case report. *BMC Medical Genetics* 2006;**84**:17.
- 39 Lietman SA, Kalinchinko N, Deng X, Kohanski R, Levine MA. Identification of a novel mutation of SH3BP2 in cherubism and demonstration that SH3BP2 mutations lead to increased NFAT activation. *Hum Mutat* 2006;**27**(7):717-8.
- 40 Lietman SA, Prescott NL, Hicks DG, Westra WH, Levine MA. SH3BP2 is rarely mutated in exon 9 in giant cell lesions outside cherubism. *Clin Orthop Relat Res* 2007;**459**:22-7.
- 41 Lietman SA, Yin L, Levine MA. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008;**371**:644-8.
- 42 Liu B, Yu SF, Li TJ. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med* 2003;**32**(6):367-75.
- 43 Lo B, Faiyaz-UI-Haque M, Kennedy S, Aviv R, Tsui LC, Teebi AS. (2003) Novel mutation in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 causes cherubism. *Am J Med Genet* **121A**:37-40.
- 44 Lombardi T, Bischof M, Nedir R, Vergain D, Galgano C, Samson J, Küffer R. Periapical central giant cell granuloma misdiagnosed as odontogenic cyst. *Int Endod J* 2006;**39**(6):510-5.
- 45 Mangion J, Rahman N, Edkins S, Barfoot R, Nguyen T, Sigurdsson A, et al. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. *Am J Hum Genet* 1999;**65**(1):151-7.
- 46 Marchler-Bauer A, Anderson JB, Cherukuri PF, DeWeese-Scott C, Geer LY, Gwadz M, He S, Hurwitz DI, Jackson JD, Ke Z, Lanczycki CJ, Liebert CA, Liu C, Lu F, Marchler GH, Mullokandov M, Shoemaker BA, Simonyan V, Song JS, Thiessen PA, Yamashita RA, Yin JJ, Zhang D, Bryant SH (2005), "*CDD: a Conserved Domain Database for protein classification.*", *Nucleic Acids Res.* **33**: D192-6.
- 47 Marx RE, Stern D. Oral and maxillofacial pathology. Chicago: Quintessence, 2002. p. 744.
- 48 Miah SM, Hatani T, Qu X, Yamamura H, Sada K. Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of

function. *Genes Cells* 2004;**9**(11):993–1004.

- 49 Miyamoto N, Higuchi Y, Tajima M, Ito M, Tsurudome M, Nishio M, et al. Spindle-shaped cells derived from giant-cell tumor of bone support differentiation of blood monocytes to osteoclast-like cells. *J Orthop Res* 2000;**18**:647-54.
- 50 Motamedi MHK. Treatment of cherubism with locally aggressive behaviour presenting in adulthood: Report of four cases and a proposed new grading system. *J Oral Maxillofac Surg* 1998;**56**:1336-1342.
- 51 Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Oral & Maxillofacial Pathology, 2nd Ed, Philadelphia: WB Saunders Co, 2002.
- 52 Pina-Neto JM, Moreno AF, Silva LR, Velludo MA, Petean EB, Ribeiro MV, et al. Cherubism, gingival fibromatosis, epilepsy, and mental deficiency (Ramon syndrome) with juvenile rheumatoid arthritis. *Am J Med Genet* 1986;**25**(3):433-41.
- 53 Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 1993;**259**(5098):1157-61.
- 54 Roodman GD. Cell biology of the osteoclast. *Exp Hematol* 1999;**27**(8):1229-41.
- 55 Southgate J, Sarma U, Townend JV, Barron J, Flanagan AM. Study of the cell biology and biochemistry of cherubism. *J Clin Pathol* 1998;**51**(11):831-7.
- 56 Souza, P.E.A.; Paim, J.F.O.; Carvalhais, J.N.; Gomez, R.S. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. *J Oral Pathol Med* 1999;**28**:54-58.
- 57 Takayanagi H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med*. 2005 Mar;**83**(3):170-9. Epub 2005 Jan 26.
- 58 Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, et al. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 2001;**29**:465-8.
- 59 Tazawa H, Takahashi S, Zilliacus J. Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta* 2003;**1620**(1-3):32-8.
- 60 Tiffée JC, Aufdemorte TB. Markers for macrophage and osteoclast lineages in giant cell lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 1997;**55**(10):1108-12.

- 61 Tiziani V, Reichenberger E, Buzzo CL, Niazi S, Fukai N, Stiller M, et al. The gene for cherubism maps of chromosome 4p16. *Am J Hum Genet* 1999;**65**(1):158-66.
- 62 Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, Fukai N, Maulik C, Garfinkle J, et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 2001;**28**(2):125-6.
- 63 Ueki Y, Lin CY, Senoo M, Ebihara T, Agata N, Onji M, Saheki Y, Kawai T, Mukherjee PM, Reichenberger E, Olsen BR. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell* 2007;**128**(1):71-83.
- 64 van Damme PA, Mooren RE. Differentiation of multiple giant cell lesions, Noonan-like syndrome, and occult) hyperparathyroidism. Case report and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg* 1994;**23**(1):32-6.
- 65 von Wowern N. Cherubism: a 36-year long-term follow-up of 2 generations in different families and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2000;**90**(6):765-72.
- 66 Whitaker SB, Singh BB. Intraoral giant cell lesions: the peripheral and central forms of these entities. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 199;**7**(6):41-7.
- 67 Whitaker SB, Waldron CA. Central giant cell lesions of the jaws. A clinical, radiologic, and histopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1993;**75**(2):199-208.
- 68 Wise GE, Ding D, Yao S. Regulation of secretion of osteoprotegerin in rat dental follicle cells. *Eur J Oral Sci* 2004; **112**:439-44.
- 69 Yamaguchi T, Dorfman HD, Eisig S. Cherubism: clinicopathologic features. *Skeletal Radiol* 1999;**28**(6):350-3.

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](#)