

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS:
FARMACOLOGIA BIOQUÍMICA E MOLECULAR

ESTUDO MOLECULAR DAS LESÕES DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES

FABRÍCIO REZENDE DO AMARAL

BELO HORIZONTE
2009

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Fabício Rezende do Amaral

ESTUDO MOLECULAR DAS LESÕES DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES

Tese apresentada ao programa de pós-graduação em Farmacologia Bioquímica e Molecular do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração Farmacologia Bioquímica e Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

BELO HORIZONTE

2009

AGRADECIMENTOS

Agradeço esta vitória ao meu pai, minha mãe, irmãs e também à minha amada Beatriz que sempre me apoiaram de forma incondicional para que eu chegasse até aqui.

Agradeço também aos meus colegas de laboratório que tanto me ensinaram nestes dois anos e meio de convivência, principalmente a Carolina, o João, a Marina e a Paula que foram pessoas com quem pude compartilhar não só o conhecimento, mas também uma amizade sincera que vou levar para toda minha vida.

Agradeço de forma especial ao Professor Ricardo pela sua orientação que serviu tanto para o meu aprendizado em estomatologia, patologia e biologia molecular como para o meu crescimento como ser humano.

Agradeço à UFMG por ter me dado a oportunidade de lá estudar e desta forma realizar um antigo sonho.

Agradeço a coordenação do curso, a secretaria e a todos os outros professores que contribuíram para minha formação.

RESUMO

Algumas das lesões que acometem os maxilares possuem como característica histopatológica a presença marcante de células gigantes multinucleadas. Dentre essas está a Lesão central de células gigantes (LCCG), a Lesão periférica de células gigantes (LPCG) e o querubismo. A LCCG é intra-óssea e se caracteriza clinicamente por uma destruição óssea, expansão da cortical, podendo haver ou não perfuração da cortical e reabsorção radicular dependendo da agressividade das lesões. A LPCG é extra-óssea e clinicamente apresenta-se como um nódulo de coloração arroxeada localizado, na maioria dos casos, na gengiva. O querubismo é uma doença genética causada por uma mutação no cromossomo 4p16 e tem como principal característica a presença de múltiplas lesões nos maxilares que ocorrem bilateralmente. A natureza clonal dos diversos tipos de neoplasias tem sido bastante estudada com o objetivo de se formular teorias da carcinogênese, de determinar a origem destas lesões além de buscar novas terapias. No presente estudo, esse aspecto foi investigado em amostras de LCCG e LPCG. Para essa investigação foi utilizada uma técnica em que se analisa a região polimórfica do gene que codifica o receptor de andrógeno (*HUMARA*) presente no cromossomo X. Os resultados mostraram seis lesões com um padrão monoclonal, sendo três LCCG e três LPCG e cinco com um padrão policlonal, sendo três LCCG e duas LPCG. O fato de haver lesões com padrão monoclonal indica que elas podem ter uma origem genética comum. A proteína SH3BP2 está presente no citoplasma de células mielóides progenitoras e, depois de ativada, forma complexos protéicos que irão ativar genes importantes na transformação de células mielóides em osteoclastos. Dentre esses genes, estão o NFATc1, que é considerado o mais importante fator de transcrição na osteoclastogênese, e o TNF α que também participa efetivamente na perda óssea e na inflamação. As células gigantes multinucleadas encontradas nas LCCG, LPCG e no querubismo possuem características ultraestruturais de osteoclastos. No querubismo, há a presença de mutações no gene *SH3BP2* principalmente no exon 9. Recentemente, foi também encontrada uma mutação desse gene em amostra de LCCG. Devido à semelhança histopatológica das três lesões, foi realizado nesse estudo o seqüenciamento de todos os exons desse gene na LPCG. O seqüenciamento não mostrou mutação em nenhuma das LPCGs. Foi realizada também a análise da expressão dos genes NFATc1 e TNF α através da técnica de PCR em tempo real em amostras das três lesões devido à importante participação destes genes na osteoclastogênese. O resultado da expressão dos dois genes mostrou um aumento de NFATc1 e uma diminuição de TNF α nos três grupos de lesões. Para identificar a localização da proteína NFATc1 nas lesões de células gigantes, foi realizada a análise imunoistoquímica visando determinar a imunolocalização dessa proteína nas lesões. O resultado mostrou uma marcação nuclear principalmente nas células gigantes multinucleadas das lesões com apenas algumas células mononucleares marcadas. Os resultados do PCR em tempo real associado à análise imunoistoquímica reforçam a hipótese de que o NFATc1 tem efetiva participação na formação das células gigantes multinucleadas que compõem o quadro histopatológico das lesões, podendo constituir interessante alvo em novas ferramentas terapêuticas.

Palavras chaves: **Lesão central de células gigantes, lesão periférica de células gigantes, NFATc1, TNF α , osteoclastogênese, SH3BP2**

ABSTRACT

The clonal nature of tumors has been widely studied in order to formulate theories of carcinogenesis. In this study the clonality was investigated in samples of central giant cell lesions (CGCL) and peripheral giant cell lesions (PGCL) of the jaws. To investigate the clonal pattern of the lesions we used the analysis of the polymorphic region of the gene encoding the androgen receptor (HUMARA) present on the X chromosome. The results showed that three out of six PGCL and three out of five CGCL exhibited a monoclonal pattern. The monoclonal pattern found in some of the giant cells lesions suggests that these lesions may have a common genetic origin. The SH3BP2 protein is present in the cytoplasm of myeloid progenitor cells and, once activated, has the ability to form protein complexes that activate important genes in the transformation of myeloid cells into osteoclasts, such as NFATc1 and TNF α . Missense mutations in the *SH3BP2* gene were reported in cherubism and were recently found in a case CGCL. As these lesions show histopathological similarities to PGCL, we investigated all exons of this gene in a set of PGCL cases. No mutation was observed after sequencing all exons of the *SH3BP2* gene. NFATc1 is considered the most important transcription factor in osteoclastogenesis, while TNF α is an important cytokine involved in bone loss and inflammation. As both cytokines are involved in osteoclastogenesis, we also analyzed both factors using the real-time PCR. Fresh samples of five PGCL, five CGCL, and one cherubism cases were included in this study. One of the samples of CGCL presented a somatic heterozygous mutation c.1442A>T in exon 11. The cherubism case showed a heterozygotic substitution c.320C>T in both blood and lesion. Our results showed increased transcription of NFATc1 and a decreased expression of TNF α in the three groups of lesions studied. The transcription of these genes were not influenced by the presence or absence of *SH3BP2* mutation. To identify the location of the protein in giant cell lesions we also performed the immunohistochemical analysis of the NFATc1 protein. All the lesions showed a predominant nuclear positive staining in the multinucleated giant cells. Only a few mononuclear cells showed a positive staining. The results of real-time PCR associated with immunohistochemical analysis support the hypothesis that overexpression of NFATc1 in the nucleus of the multinucleated giant cells have effective participation in the development of giant cells lesions. The modulation of this pathway can be a potential target on future molecular therapy.

Key words: giant cell lesion, NFATc1, TNF α , osteoclastogenesis, SH3BP2

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Gel de eletroforese mostrando amplificação do gene humano receptor de andrógeno (HUMARA) nas LCCG e LPCG	43
FIGURA 2	Eletoferograma de parte do exon 4 do gene <i>SH3BP2</i> de uma LPCG	44
FIGURA 3	Análise do resultado da expressão dos genes NFATc1 e TNF α nas Lesões Periféricas de Células Gigantes	45
FIGURA 4	Análise do resultado da expressão dos genes NFATc1 e TNF α nas Lesões Centrais de Células Gigantes	46
FIGURA 5	Teste de eficiência de amplificação do TNF α	47
FIGURA 6	Teste de eficiência de amplificação do NFATc1	48
FIGURA 7	Marcação imunoistoquímica para proteína NFATc1 nas células gigantes multinucleadas	49

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Dados clínicos e resultados da clonalidade das LCCG e LPCG utilizando-se da técnica para amplificação do gene humano receptor de andrógeno (HUMARA)	42
----------	---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DNA	Ácido desoxiribonucleico
cDNA	DNA complementar
CFU-M	Unidade formadora de colônia de macrófago
DEPC	Dietilpirocarbonato
dNTPs	Desoxinucleotídeos trifosfatados
EDTA	Ácido etilenodiamino tetraacético
ERK	Extracellular signal-regulated kinases
HCL	Ácido clorídrico
<i>HUMARA</i>	Gene Human androgen receptor
IPI3	Inositol-1,4,5-trifosfato
LPCG	Lesão periférica de células gigantes
LCCG	Lesão central de células gigantes
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófago
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MITF	Fator de transcrição associado à microphthalmia
MMP-9	Metaloproteinase da matriz 9
NFATc1	Fator nuclear ativador de células T
OPG	Osteoprotegerina
OSCAR	Osteoclast-associated receptor
PLC γ 2	Fosfolipase γ 2
PCNA	Antígeno nuclear de proliferação celular
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
qPCR	PCR em tempo real
PIP2	fosfatidilinositol-4-5-bifosfato
RANK	receptor do ativador do fator nuclear Kappa B
RANK-L	ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa β
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa
RNA	Ácido ribonucleico
RNA _m	RNA mensageiro
<i>SH3BP2</i>	Gene SH3 binding protein 2
SFK	Src family Kinase
SH2	Domínio de homologia à Proteína Src 2
SH3	Domínio de homologia à Proteína Src 3
TE	Tris EDTA
TCG	Tumor de células gigantes
TNF α	Fator de necrose tumoral alfa
TRAP	Fosfatase ácida tartarato resistente
TRIS	Tampão Hidroximetil aminometano
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
VNR	Vitronectina

SUMÁRIO

1- Introdução	10
2- Revisão da Literatura	12
2.1- Lesão central de células gigantes	12
2.2- Lesão periférica de células gigantes	14
2.3- Querubismo	16
2.4- Clonalidade	18
2.5- Via da proteína SH3BP2	22
3- Objetivos	26
4- Material e métodos	27
4.1- Amostragem	27
4.2- Extração de DNA e RNA	29
4.2.1- DNA	29
4.2.2- RNA	30
4.3- Transcrição reversa	32
4.4- Clonalidade	33
4.5- Sequenciamento genético	34
4.6- PCR em tempo real	37
4.7- Imunoistoquímica	40
5- Resultados	41
5.1- Clonalidade	41
5.2- Sequenciamento genético	43
5.3- PCR em tempo real	44
5.4- Imunoistoquímica	48
6- Discussão	50
7- Conclusões	57
8- Referências	58
Anexos	

1-INTRODUÇÃO

Algumas das várias lesões que acometem os maxilares possuem como característica histopatológica a presença marcante de células gigantes multinucleadas. Dentre essas está a Lesão central de células gigantes (LCCG), a Lesão periférica de células gigantes (LPCG) e o querubismo. A LCCG é intra-óssea e se caracteriza clinicamente por uma destruição óssea com conseqüente expansão da cortical óssea, podendo haver ou não perfuração da cortical e reabsorção radicular dependendo da agressividade das lesões. A LPCG é extra-óssea e clinicamente apresenta-se como um nódulo de coloração arroxeada com uma base sésil ou pedunculada localizada, na maioria dos casos, na gengiva. O querubismo é uma doença genética causada por uma mutação autossômica dominante no cromossomo 4p16 e tem como principal característica a presença de múltiplas lesões nos maxilares que ocorrem bilateralmente.

O estudo da natureza clonal dos tumores tem sido utilizado para a formulação de teorias sobre a carcinogênese e estudo da origem dos tumores. Um clone de células é aquele composto por células que se originaram após a divisão de uma única célula mãe e, portanto, carrega inicialmente características genéticas idênticas a ela. Desta forma, foi feito neste estudo a investigação da natureza clonal da LCCG e LPCG.

A proteína adaptadora SH3BP2 presente no citoplasma de células mielóides progenitoras tem a capacidade de formar complexos protéicos com outras proteínas através da interação de domínios de ligação. Esses complexos protéicos irão transmitir sinais para o núcleo que irão ativar genes importantes na transformação de células mielóides em de osteoclastos. Dentre os genes importantes, está o NFATc1, que é considerado o fator de transcrição chave na ativação das células mielóides. Outro

importante gene no processo de reabsorção óssea que também pode ser ativado após a ação da SH3BP2 é o $\text{TNF}\alpha$. Estudos têm demonstrado que as células gigantes multinucleadas encontradas em LCCG, LPCG e querubismo possuem características estruturais de osteoclastos. O gene que codifica a proteína SH3BP2 está localizado no cromossomo 4p16 e mutações nesse gene estão relacionadas com o querubismo. As mutações encontradas nesta doença se localizam principalmente no éxon nove, em uma região rica em prolinas, porém estudos recentes têm demonstrado a presença de mutações em outros exons como o três e o quatro. As mutações que ocorrem nesse gene propiciam um ganho de função da referida proteína, causando, conseqüentemente, um aumento na reabsorção óssea. As lesões centrais e periféricas de células gigantes possuem características histopatológicas semelhantes ao querubismo e, em um estudo recente, foi demonstrada a presença de uma mutação no éxon 11 do gene em um caso de LCCG. Considerando as semelhanças morfológicas existentes entre a LCCG, LPCG e o querubismo, foram investigados inicialmente neste estudo todos os exons do gene SH3BP2 na LPCG. Diante dos dados que demonstram a importância dos genes NFATc1 e $\text{TNF}\alpha$ na ativação de osteoclastos e reabsorção óssea, levantou-se a hipótese de que alterações na transcrição dos genes estariam envolvidas na patogênese destas lesões. Sendo assim, a expressão desses dois genes na LCCG, LPCG e querubismo, além da análise imunoistoquímica da proteína NFATc1 também foram analisadas nesse trabalho.

2- REVISÃO DA LITERATURA

2.1- Lesão central de células gigantes

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão benigna, intra-óssea e de etiologia desconhecida, que ocorre em maior número na mandíbula em relação à maxila e tem uma predileção pelo sexo feminino, podendo ser única ou múltipla (CARINCI *et al.*, 2005).

Essa lesão foi descrita inicialmente como granuloma reparativo dos maxilares (JAFFE *et al.*, 1953) na tentativa de separá-la dos tumores de células gigantes (TCG) encontrados nos ossos longos. Atualmente, o termo reparativo não é mais usado devido ao fato de o comportamento clínico dessas lesões serem inconsistentes com o termo. Ela se caracteriza clinicamente por uma destruição óssea com conseqüente expansão da cortical óssea, podendo haver ou não perfuração da cortical e reabsorção radicular dependendo da agressividade das lesões (HORNER, 1989).

A agressividade da LCCG foi primeiramente citada por Chuong *et al.*, (1986), que as classificou em agressivas e não agressivas de acordo com os aspectos clínicos e radiográficos. As lesões agressivas foram aquelas que apresentavam crescimento rápido, dor, expansão das corticais podendo haver perfuração dessas, deslocamento dentário, reabsorção radicular, coloração arroxeadada da mucosa, além de índices de recorrência maiores após sua remoção. Radiograficamente são lesões grandes e geralmente apresentam um aspecto multilocular.

Apesar de as lesões agressivas apresentarem um comportamento similar ao de um tumor, sua classificação como tumor de células gigantes nos maxilares é

controversa. Os tumores de células gigantes (TCG) são lesões encontradas nas epífises de ossos longos de pacientes mais velhos, e com um aspecto histopatológico que apresenta células gigantes multinucleadas com mais núcleos do que as células multinucleadas da LCCG (de SOUZA *et al.*, 1999).

Histologicamente, a LCCG assim como a LPCG e o querubismo se caracteriza pela presença de células gigantes multinucleadas que se apresentam em número e tamanhos variados e possuem características estruturais semelhantes aos osteoclastos (ITONAGA *et al.*, 2003). Essas células estão dispostas em um tecido conjuntivo fibroso com presença de células mononucleares semelhantes a macrófagos e fibroblastos, áreas de hemorragia e eventuais calcificações distróficas (FARRIER *et al.*, 2006).

Nas lesões agressivas, as células gigantes multinucleadas estão em maior número. As células gigantes multinucleadas presentes na LCCG são provavelmente, derivadas das células mononucleares que, por sua vez, são derivadas de células mielóides progenitoras. Estas células, após sofrerem estímulos de fatores importantes na diferenciação celular, como o ligante do receptor do ativador do fator nuclear Kappa β (RANKL) e a unidade formadora de colônia de macrófago (M-CSF) produzido por outras células componentes da lesão, e por osteoblastos, irão se diferenciar nas células gigantes (LIU *et al.*, 2003).

Itonaga *et al.*, (2003), realizaram um estudo em que demonstraram, por meio da técnica de imunoistoquímica, a origem das células gigantes presentes nessas lesões. Eles demonstraram características de precursores de osteoclastos devido à marcação positiva para vitronectina (VNR) e fosfatase ácida tartarato resistente (TRAP), que são marcadores específicos na diferenciação de osteoclastos.

O tratamento indicado para as lesões não agressivas é a curetagem; as lesões com comportamento agressivo devem ser removidas através de cirurgia com margem de segurança devido a uma maior possibilidade de recorrência (de LANGE *et al.*, 2007a). Tem sido proposta, na literatura, a injeção de corticóide no interior das lesões maiores e mais agressivas para que elas diminuam antes da sua remoção cirúrgica definitiva (CARLOS *et al.*, 2002).

2.2- Lesão periférica de células gigantes

A LPCG é uma lesão bucal, classificada como um processo proliferativo não neoplásico que se origina do periósteo ou ligamento periodontal. Algum fator irritante local como presença de biofilme, cálculo salivar e restaurações mal adaptadas, está relacionado ao aparecimento destas lesões, mas a sua patogênese ainda permanece incerta (KATSIKERIS *et al.*, 1998).

Clinicamente, a LPCG apresenta-se como um nódulo de coloração arroxeada com uma base séssil ou pedunculada localizada, na maioria dos casos, na gengiva. Acometem pacientes de qualquer idade, sendo as mulheres mais afetadas, e podem provocar uma reabsorção óssea superficial na região onde se encontra (MOTAMEDI *et al.*, 2007).

Histologicamente, a LPCG não se apresenta encapsulada e se caracteriza pela presença de células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos, células mononucleares, células fusiformes e inflamatórias entremeadas em um tecido conjuntivo fibroso. Áreas de hemorragia e presença de áreas com tecido calcificado no

interior do tecido conjuntivo podem completar o quadro. Pode ocorrer também a reabsorção óssea superficial da região onde a lesão se localiza (LIU *et al.*, 2003).

Liu *et al.*, (2003), demonstraram semelhança entre as células gigantes presentes na LCCG, LPCG e no querubismo com osteoclastos. Neste estudo, tanto as células mononucleares como as multinucleadas presentes nas lesões apresentaram marcação para TRAP, V-ATPase, Carbonic anidrase II (CAII), Catepsina K e MMP-9 que são marcadores específicos de osteoclastos. Esse resultado indica que as células mononucleares da lesão podem dar origem às células gigantes multinucleadas. O RANK-L apresentou marcação apenas nas células multinucleadas, reafirmando o papel chave desta citocina na formação das células. Com relação à osteoprotegerina (OPG), que é um fator inibidor da osteoclastogenese e compete com o receptor para RANK-L, houve marcação nas células multi e mononucleares. A razão entre RANK-L e OPG é importante na formação de osteoclastos através de um mecanismo de *feedback*. A OPG assim como RANK-L também se liga no receptor RANK. Neste estudo, apenas as células mononucleares apresentaram marcação para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) indicando serem estas as células responsáveis pela proliferação da lesão.

O tratamento para a LPCG consiste na remoção cirúrgica além de uma raspagem das áreas adjacentes para a eliminação de fatores irritativos locais como presença de cálculo e placa afim evitar as recidivas (BODNER *et al.*, 1997).

2.3- Querubismo

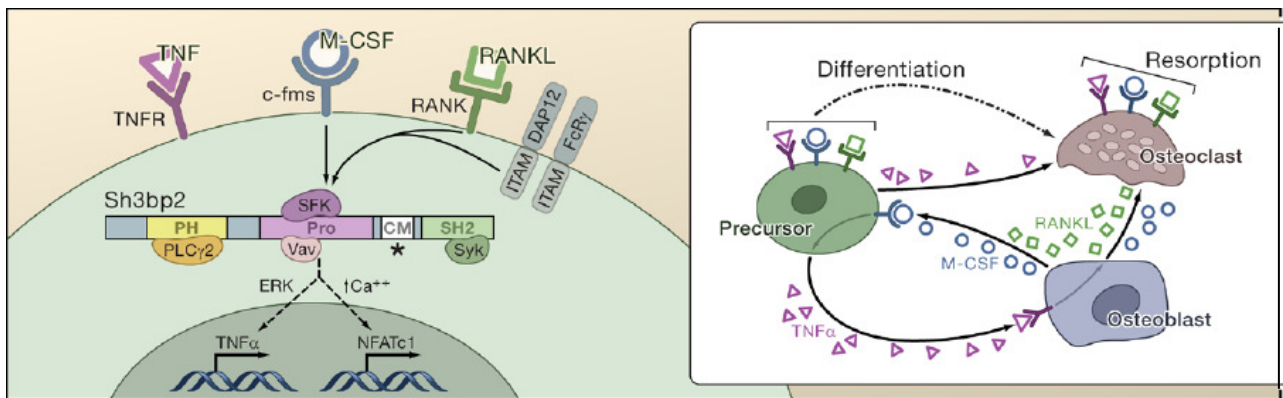
O querubismo foi descrito por Jones, em 1933, e é uma doença causada por uma mutação autossômica dominante no cromossomo 4p16, com alta penetrância, que pode ser herdada ou, mais raramente, aparecer de maneira esporádica (VON WOWERN, 2000).

A doença tem como principal característica, a presença de múltiplas lesões nos maxilares que ocorrem bilateralmente, causando destruição, inflamação e fibrose com conseqüente expansão desses ossos e assimetria facial. A expansão causada pelas lesões dá aos portadores desta condição uma impressão clínica semelhante aos anjos *querubins* dos quadros pintados no renascimento, causado pelo deslocamento dos olhos para cima. Outra característica marcante da doença é o fato de ela se manifestar no início da infância e regredir após a puberdade, embora as deformidades faciais e dentárias causadas pela doença poderem ser permanentes (HYCKEL et al., 2005).

Vários autores (LIETMAN 2006; de LANGE *et al.*, 2007b) realizaram estudos tanto nos pacientes com querubismo quanto nos seus familiares e encontraram a presença de mutações na região rica em prolina presente no exon nove do gene *SH3BP2* (SH3 binding protein 2). Esse gene está presente no cromossomo 4p16 e codifica uma proteína adaptadora chamada SH3BP2 que possui três domínios, sendo um domínio homólogo à plequistrina, um domínio SH2 e um domínio rico em prolina (REN *et al.*, 1993).

Novack e Faccio, (2007), demonstraram que a mutação no gene *SH3BP2* em ratos resulta em um aumento da produção do fator de necrose tumoral alfa (TNF α) pelas células mielóides e conseqüentemente, no aumento da perda óssea e inflamação

como demonstrado na figura abaixo. Nessa figura pode-se ver a formação de complexos protéicos intracitoplasmáticos com a proteína SH3BP2 após a estimulação de RANK-L e M-CSF em seus respectivos receptores extracelulares. Esses complexos irão transmitir sinais para o núcleo onde haverá um aumento da transcrição de genes importantes na osteoclastogenese como o NFAT e o $TNF\alpha$.



Hyckel *et al.*, (2005), sugere que o querubismo resulta de uma desregulação da tradução do sinal do paratormônio de forma similar ao que ocorre no tumor marron do hiperparatireoidismo. Segundo o autor, a proteína SH3BP2 participa na regulação desse hormônio. Além disto, a SH3BP2 se liga à proteína chaperona 14-3-3 que também regula a ação do paratormônio. A interação do paratormônio com seu receptor participa, igualmente do desenvolvimento dos germes dentários e osso alveolar adjacente, o que sugere ser o querubismo o resultado de um distúrbio no desenvolvimento dental, principalmente dos 2º e 3º molares que estão nas áreas onde ocorrem as lesões resultantes da doença.

Radiograficamente, o querubismo caracteriza-se pela presença de múltiplas lesões multiloculares na maxila e mandíbula. Histopatologicamente, as lesões encontradas nos pacientes com querubismo apresentam características semelhantes às aquelas encontradas nas LCCG, LPCG, TCG e tumor marrom do hiperparatireoidismo.

Essas lesões são caracterizadas pela destruição óssea em ambos os maxilares e substituição deste osso por tecido fibroso, além da existência de inúmeras células gigantes multinucleadas. A semelhança com a LCCG torna possível o diagnóstico definitivo desta condição somente com uma associação das características clínicas, radiográficas e histopatológicas, principalmente quando não há múltiplas lesões e histórico familiar (KAUGARS *et al.*, 1992).

Por se tratar de uma condição em que as lesões presentes nos maxilares tendem a se estabilizar ou até mesmo regredir após a puberdade, não está indicado a remoção das mesmas através de procedimentos cirúrgicos. Somente quando houver um crescimento exacerbado e sem regressão na idade adulta, resultando em extrema deformidade estética associada a limitações funcionais a cirurgia deverá ser indicada (ROGYNSKY *et al.*, 2009).

2.4-Clonalidade

Uma população clonal de células é definida como aquela que se origina após a divisão mitótica de uma única célula somática (SECKER-WALKER, 1995). Esse clone de células não é necessariamente idêntico geneticamente, pois, durante a evolução das células diferentes eventos podem ocorrer, como o aparecimento de diferentes mutações (NOWELL, 1976).

A maioria dos tumores possui um padrão monoclonal, devido ao fato de se originarem de uma única célula que, em dado momento, adquiriu uma ou mais mutações somáticas. O estudo da natureza clonal dos diferentes tipos de tumores tem sido usado para auxiliar na formulação de teorias da carcinogênese, de novas

ferramentas terapêuticas moleculares e para estudar a origem dos tumores. (LEEDHAM e WRIGHT, 2008) .

Algumas técnicas têm sido utilizadas para se determinar a clonalidade dos tumores. Dentre elas existem aquelas baseadas na inativação do cromossomo X, análise das cadeias de linfócitos, detecção de mutações somáticas e/ou perdas cromossômicas, translocações cromossômicas e análises de integração viral (WAINSCOAT, 1990).

As técnicas baseadas na inativação do cromossomo X são utilizadas exclusivamente em tumores de pacientes do sexo feminino, já que as mulheres possuem dois cromossomos X, sendo um herdado do pai e outro da mãe. Um deles é aleatoriamente inativado dentro das células através do processo de metilação da citosina durante a embriogenese (RIGGS, 1975). A inativação ocorre de forma que as mulheres se tornam um mosaico de células, em que haverá de forma randômica, a inativação do cromossomo X do pai ou da mãe, nos diferentes tecidos. Durante as sucessivas divisões mitóticas pelas quais as células do organismo passam, todas as suas características genéticas são transmitidas às suas descendentes. Dentre essas características, está aquela que determina qual cromossomo X foi aleatoriamente inativado (MARTIN *et al.*, 1978).

Desta forma, uma lesão tumoral presente em pacientes do sexo feminino, que se originou de uma única célula alterada geneticamente, irá apresentar um padrão de inativação do cromossomo X idêntico em todas as células da lesão. A semelhança genética encontrada nas células de algumas neoplasias dá às mesmas um padrão denominado monoclonal (FEARON *et al.*, 1997).

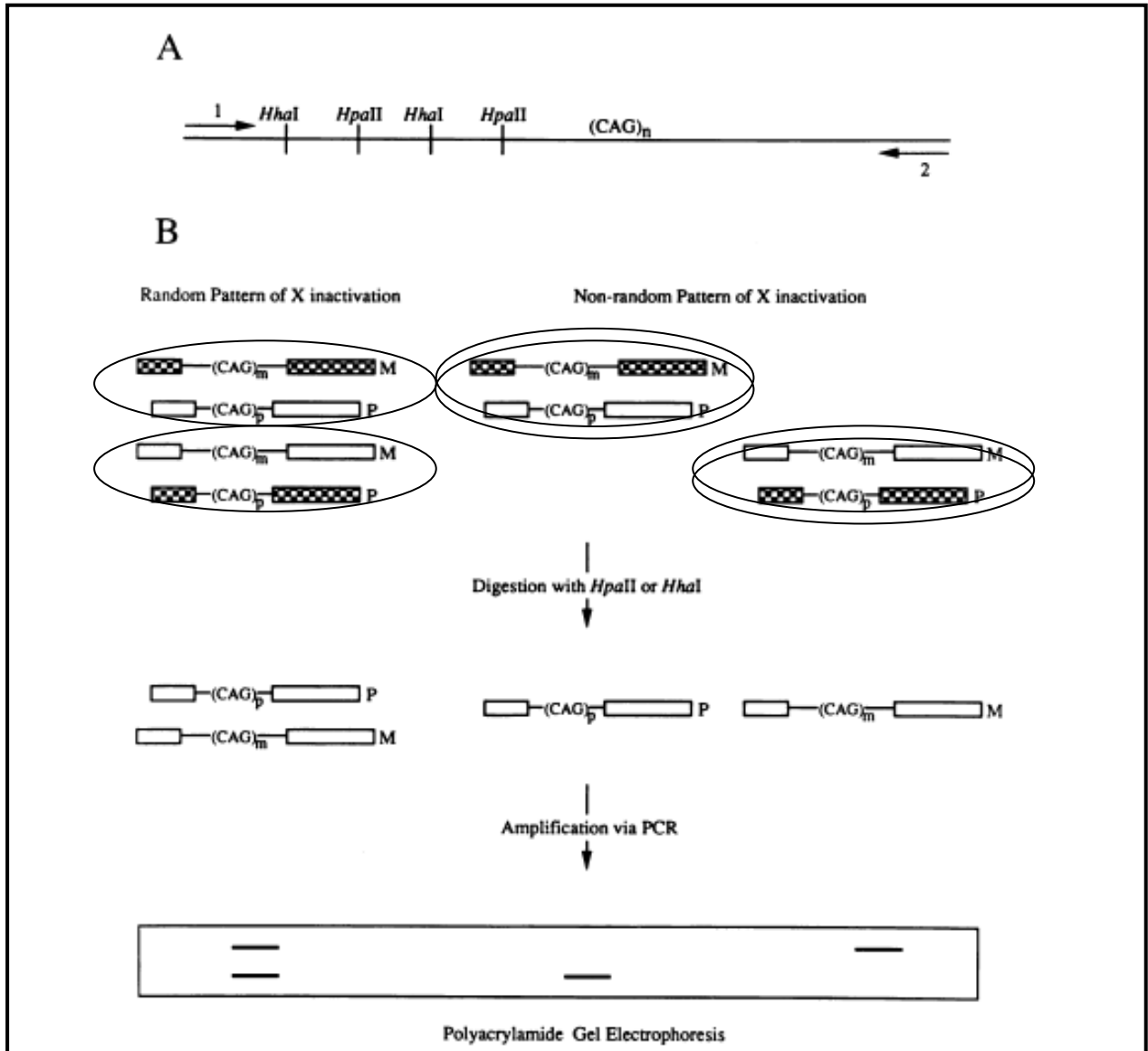
Quando são encontradas em uma lesão, células com diferentes padrões de inativação do cromossomo X, há uma indicação de que ela se originou de diferentes clones de células, sendo, portanto, denominada policlonal (CHEN e PRCHAL, 2007).

Para que se possa determinar qual cromossomo X foi inativado dentro das células, pode-se utilizar uma técnica baseada na análise do gene que codifica o receptor de andrógeno, denominado HUMARA (*Human Androgen-receptor Gene*). Este gene se localiza no cromossomo X e possui uma região altamente polimórfica localizada no exon um, onde há a presença de 11 a 31 repetições de resíduos de glicina (CAG). Como as mulheres possuem dois cromossomos X que são herdados de pessoas diferentes, o pai e a mãe, a região polimórfica localizada no exon um será de tamanhos diferentes nos dois cromossomos. Devido à diferença no tamanho dos dois cromossomos, será possível determinar por meio de uma amplificação desta região pela técnica de PCR e posterior eletroforese em gel de acrilamida para visualização das bandas, qual cromossomo foi inativado (ALLEN *et al.*, 1992).

A região polimórfica possui áreas sensíveis a ação de enzimas de restrição. Uma vez digeridas pelas enzimas, estas áreas não podem ser amplificadas por meio da técnica de PCR. Somente os cromossomos que possuem a região polimórfica do exon 1 metilada podem ser amplificados, pois as enzimas de restrição não irão digerir-las. Os cromossomos metilados e, conseqüentemente, não digeridos são aqueles que foram inativados. Por outro lado, os cromossomos que não sofreram metilação e podem ser digeridos pelas enzimas de restrição são aqueles que permaneceram ativos nas células (ALLEN *et al.*, 1992).

O diagrama abaixo ilustra o princípio da técnica utilizada para se determinar a clonalidade das lesões, baseada na região polimórfica do gene HUMARA.

Região polimórfica do gene HUMARA



ALLEN *et al.*, 1992, adaptado pelo autor.

A- Região polimórfica do exon um do gene *HUMARA* com as repetições de glicina onde ocorrerá a ação das enzimas de digestão.

B- Após a digestão e amplificação pela técnica de PCR o gel mostrará a presença de duas bandas quando houver um padrão aleatório de inativação do cromossomo X, ou

apenas uma banda quando houver um padrão único de inativação do cromossomo X naquele tecido.

2.5- Via da proteína SH3BP2

A proteína chamada *SH3 binding protein 2* ou SH3BP2 é codificada por um gene localizado no braço curto do cromossomo quatro, mais especificamente no *locus* 16 (4p16) (BELL *et al.*, 1997). Esse gene possui 13 éxons que codificam 561 aminoácidos. A SH3BP2 é uma proteína adaptadora citoplasmática, que possui três domínios, sendo um domínio N-terminal homólogo à pleckstrina, um domínio rico em prolinas que tem afinidade por domínios SH3 de outras proteínas e um domínio C-terminal SH2. Esta proteína se expressa em células T, B, Natural Killer (NK), monócitos e osteoclastos e foi identificada por Ren *et al.*, (1993), devido a sua capacidade de ligação com o domínio SH3 da proteína tirosino kinase c-abl. Posteriormente, outros autores (DECKERT *et al.*, 1998; FOUCALT *et al.*, 2003,2005; JEVREMOVIC *et al.*, 2001) descobriram que a SH3BP2 também possuía a capacidade de formar complexos com outras proteínas como, Src family Kinase (SFK), Syk Kinase, fosfolipase γ 2 (PLC γ 2), VAV e 14-3-3 por meio de fosforilação de resíduos de serina e tirosina. A formação desses complexos contendo a proteína SH3BP2 promove alterações citoplasmáticas que irão propiciar a transcrição de genes importantes. Dentre os genes estão a isoforma c1 do fator nuclear ativador de células T (NFATc1), considerado o mais importante fator de transcrição na osteoclastogênese (TAKAYANAGI, 2007) e o fator de necrose tumoral (TNF α), também associado à reabsorção óssea e à inflamação. A transcrição destes dois genes é de fundamental importância na inflamação e ativação das células mielóides progenitoras

que irão se transformar em osteoclastos. Os osteoclastos são responsáveis pela reabsorção óssea e, de acordo com alguns estudos, são as células gigantes predominantes nas lesões central e periférica de células gigantes e no querubismo (ITONAGA *et al.*, 2003; LIU *et al.*, 2003).

Para ocorrer toda esta cascata de eventos na ativação dos osteoclastos, primeiramente é necessária a participação de moléculas que ativam receptores extracelulares, como o ligante do receptor ativador do fator nuclear NF- κ B (RANKL) e o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF) (ASAGIRI e TAKAYANAGI, 2007).

O RANKL, após se ligar em seu receptor específico, irá ativar a proteína SH3BP2 que, por sua vez, se ligará às proteínas SFK, SYK Kinase e PLC γ 2 através de seu domínio SH2. A PLC γ 2, após fosforilada, cliva o fosfolípido de membrana fosfatidilinositol-4-5-bisfosfato (PIP2) em inositol-1,4,5-trifosfato (IPI3), que irá proporcionar o aumento dos níveis de cálcio intracelular através da abertura dos canais de cálcio do retículo endoplasmático (LIETMAN *et al.*, 2008).

A estimulação por RANK-L por si só não é capaz de aumentar os níveis de cálcio. Para isto ocorrer é necessário haver uma co-estimulação que ocorra por meio da interação entre receptores semelhantes à imunoglobulina (*immunoglobulin-like receptors*) presentes nas células precursoras, como o *Osteoclast-associated receptor* (OSCAR) e proteínas adaptadoras como a *DNAX-activating protein* (DAP12) e *Fc receptor common γ subunit* (FcR γ). A interação irá fosforilar um imunoreceptor citoplasmático conhecido como ITAM (*immunoreceptor tyrosine-based activation motif*), que desempenha papel fundamental no aumento dos níveis de cálcio. Ratos com ausência de DAP12 e FcR γ exibiram severa osteopetrose (TAKAYANAGI, 2005).

O aumento dos níveis de cálcio possibilita, inicialmente, uma mudança de conformação e posterior deslocamento de NFATc1 para o núcleo. Estando presente no núcleo, o NFATc1 irá causar sua autoamplificação além da ativação de outros genes específicos na diferenciação dos osteoclastos como TRAP, catepsina K, integrin $\beta 3$ e OSCAR. Este aumento de NFATc1 é, do mesmo modo, importante na fusão dos osteoclastos e consequente formação das células gigantes multinucleadas (KIM *et al.*, 2008).

O M-CSF também participa da ativação dos osteoclastos de várias formas, sendo a primeira, a promoção da proliferação das células mielóides e a sua transformação em unidades formadoras de colônias de macrófagos que são as células precursoras de macrófagos e osteoclastos. Outra forma, é a ativação do fator de transcrição associado a microftalmia (MITF), que promoverá a transcrição do gene *bcl-2* e, conseqüentemente, a sobrevivência dessas células por se tratar de um gene anti-apoptótico. O M-CSF, após ativar SH3BP2, também promove o aumento dos níveis de TNF- α pelas células progenitoras através da via MAPK-ERK. Este aumento dos níveis de TNF- α é importante tanto na ativação direta das células precursoras de osteoclastos como na estimulação dos osteoblastos no sentido de eles produzirem mais RANK-L e M-CSF, deixando o ciclo ativo (YAVROPOULOU e YOVOS, 2008).

Ueki *et al.*, (2007), em um estudo realizado em ratos portadores de querubismo e, portanto, com a proteína SH3BP2 mutada, mostraram aumento da diferenciação de osteoclastos, da inflamação e perda óssea. O aumento na diferenciação de osteoclastos ocorreu devido a uma resposta exacerbada por parte das células progenitoras, após estimulação com RANK-L e M-CSF. Houve também um aumento na

produção de TNF α . Os resultados desse estudo indicam que a mutação desta proteína no querubismo proporciona a ela um ganho de função.

No querubismo, as células com mutações no gene que codifica a SH3BP2 irão, por mecanismos já descritos, aumentar a produção de TNF α e, assim, estimular os osteoblastos presentes na lesão a produzirem maior quantidade de RANK-L e M-CSF. As duas citocinas irão agir na diferenciação das células progenitoras em osteoclastos, aumentando a quantidade destas e, conseqüentemente, a reabsorção óssea (NOVACK e FACCIO, 2007). Além da maior produção destas citocinas, há uma deficiência na ligação da SH3BP2 mutada com a proteína chaperona 14-3-3 que a regula negativamente (FOUCALT *et al.*, 2003).

3- OBJETIVOS

3.1-Objetivo Geral:

Investigar a clonalidade e a via do *SH3BP2* nas lesões de células gigantes dos maxilares.

3.2-Objetivos Específicos:

- 1- Investigar a natureza clonal das lesões centrais e periféricas de células gigantes.
- 2- Investigar a presença de alterações moleculares no gene *SH3BP2* na LPCG
- 3- Investigar a transcrição dos genes *NFATc1* e *TNF α* na LCCG, LPCG e querubismo, relacionando-os com a presença ou não de alterações moleculares no gene *SH3BP2*.
- 4- Investigar a imunolocalização de NFATc1 nas lesões de células gigantes

4-MATERIAL E MÉTODOS

4.1-Amostragem

Este trabalho foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG no qual se encontra registrado sob o número ETIC 365/07 (Anexo A). Foram utilizadas para a realização do mesmo um total de 19 lesões, sendo 10 amostras de LPCG, oito LCCG e um querubismo.

Antes da remoção cirúrgica das lesões, todos os pacientes assinaram o consentimento livre e esclarecido para a utilização das mesmas na pesquisa. As amostras foram coletadas durante a cirurgia, sendo separado um fragmento para fixação em formol a 10% e inclusão em parafina. Nesses fragmentos, foram feitos cortes de quatro micrometros de espessura para realização da coloração com hematoxilina e eosina com a finalidade de confirmar o diagnóstico histopatológico. A outra parte da lesão foi colocada em um tubo contendo *Tissue Tek* e armazenada em um freezer a menos 80 °C para posterior extração de DNA e RNA. O DNA, após ser extraído, foi utilizado para a realização da técnica baseada no polimorfismo do gene receptor de andrógeno (HUMARA) com a finalidade de determinar a natureza clonal das lesões. Trabalhou-se nessa técnica com seis amostras de LPCG e cinco de LCCG, sendo todas elas provenientes de pacientes do sexo feminino. O DNA foi também utilizado para a realização da técnica de seqüenciamento genético. Foram utilizadas quatro LPCG, em que todos os éxons do gene *SH3BP2* foram sequenciados. O RNA extraído foi utilizado para a síntese de cDNA e posterior determinação da expressão

dos genes *NFATc1* e *TNF α* utilizando da técnica de PCR em tempo real. Para esta etapa foram utilizadas cinco amostras de LPCG, 5 LCCG e o caso de querubismo.

Em um estudo anterior a este (CARVALHO *et al.*, 2009), foi realizado o seqüenciamento dos 13 exons do gene *SH3BP2* de cinco das amostras de LCCG e do caso de querubismo utilizados neste estudo. Os resultados mostraram a presença de uma mutação somática heterozigótica c.1442A>T localizada no éxon 11 em um dos casos de LCCG e de uma mutação somática heterozigótica c.320C>T localizada no éxon 4 tanto em amostra do sangue como na lesão do caso de querubismo.

Foram utilizadas amostras de sangue de cinco pacientes saudáveis, não portadores de nenhuma das lesões estudadas para a confecção do calibrador da reação de PCR em tempo real. Antes da extração de RNA dessas amostras, elas foram centrifugadas a fim de separar as células mononucleares circulantes.

Após realizado o PCR em tempo real e demonstrado um aumento da expressão de *NFATc1* em todas as amostras estudadas, foi feita a análise imunoistoquímica em duas amostras de LCCG e em duas de LPCG a fim de determinar a localização dessa proteína no interior das células componentes destas lesões.

4.2-Extração de DNA e RNA

4.2.1- DNA

Para a extração do DNA, utilizou-se a técnica da sílica proposta por Boom *et al.*, (1990). Primeiramente, as amostras foram colocadas em um tubo com 900µl de uma solução chamada *Lysis Buffer*, composta por cloridrato de guanidina (GuHCl), tris HCl 0,1 M com PH 6,4, EDTA 0,2 M com PH 8,0 e TRITON 100x . Essa etapa serve para que ocorra a lise das membranas citoplasmática e nuclear e a conseqüente exposição do DNA. Após a amostra estar homogeneizada com a solução, adicionou-se 40µl de sílica. Foi feita uma nova homogeneização por 5 segundos no vortex, e a solução permaneceu em repouso a 56°C por 10 minutos. A amostra foi novamente homogeneizada por 5 segundos para, então, ser centrifugada por um minuto e ser descartado o sobrenadante. O *pellet* remanescente no tubo foi lavado por 2 vezes com 900µl de uma solução tampão para lavagem composta por cloridrato de guanidina (GuHCl) e tris HCl 0,1 M com PH 6,4. Esse *pellet* foi também lavado por 2 vezes com 900µl de etanol (Merck GE) a 70% e uma vez com 900µl de acetona. Para todas essas lavagens, o *pellet* foi centrifugado por um minuto com estas soluções. Após a lavagem, o *pellet* foi colocado em um banho de água a 56° para secagem. Depois de seco, colocou-se 100µl de Tris EDTA (TE) em pH 8,0 e os tubos foram homogeneizados e incubados a 56° *overnight*. No outro dia, os tubos contendo o *pellet* com o TE foram novamente homogeneizados e centrifugados por 2 minutos. O sobrenadante contendo o DNA foi então transferido para outro tubo e armazenado a -20°C.

4.2.2- RNA

A extração do RNA foi realizada segundo o protocolo recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA). Primeiramente, o tecido foi macerado em recipiente específico com nitrogênio líquido e, posteriormente, com um Tissue Grinder (Kontes, Vineland, NJ) em Trizol. Foi adicionado 200 µl de Clorofórmio (Merk, Darmstadt, Germany), sendo a mistura agitada em vortex por 15 segundos e incubada por 3 minutos à temperatura ambiente (TA). Em seguida, a mistura foi centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g a 4°C. Após a centrifugação, foi observada a separação de três fases: vermelha (fase orgânica) composta pelo fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase aquosa incolor, na qual está presente o RNA. A fase aquosa foi removida cuidadosamente e transferida para outro tubo. Para precipitação do RNA presente na fase aquosa, foi adicionado 500 µl de álcool isopropílico (Merck), sendo, então, homogeneizada e incubada por 10 minutos a TA e centrifugada por 15 minutos a 12.000 x g em uma temperatura de 4°C. Após a centrifugação, foi formado um *pellet* contendo o RNA precipitado. O líquido sobrenadante foi eliminado e então o RNA foi lavado com a adição de 1 ml de álcool etílico 75% (Merck) e centrifugado por 5 minutos a 12.000 x g em uma temperatura de 4°C. O sobrenadante foi eliminado e o *pellet* contendo o RNA foi deixado à TA de 5 a 10 minutos para que ocorresse a secagem. Após seco, o RNA foi ressuscitado em 20 µl de água DEPC, aliquoteado e armazenado a temperatura de -80°C.

O sangue foi processado com o objetivo de separar a parte celular do sangue. Posteriormente o material foi submetido a extração de RNA segundo o protocolo

recomendado pelo fabricante do reagente Trizol (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA, USA), como descrito acima.

As amostras de RNA das lesões e do sangue foram submetidas à quantificação através da espectrofotometria e a pureza considerada foi de 1,9 a 2,0 (leitura 260/280 nm) (BANDRÉS *et al.*, 2006). A concentração de RNA foi calculada da seguinte forma: $[\text{RNA (g/mL)}] = A \times A_{260} \times \text{diluição}$, em que “A” é uma constante definida como a capacidade intrínseca do material analisado de absorver luz em um determinado comprimento de onda, sendo para o RNA, igual a 40. A_{260} é a leitura da amostra no comprimento de onda de 260 nm. A diluição aplicada foi de 50, correspondente a quantas vezes a amostra foi diluída para ser feita a leitura.

O RNA (1µg) foi aplicado em gel de acrilamida a 15% para verificação da sua qualidade. O gel foi confeccionado respeitando as seguintes proporções: 7,2 g de Ureia, 1,5 ml de 10X TBE, 5,6 ml Acrilamida 40% (acrilamida:bis acrilamida = 19:1), H₂O livre de nuclease para 15 ml, 75 µl TAE (persulfato de amônio 10%) e 15 µl de TEMED. Foi adicionado à amostra *Gel Loading Buffer II* (Ambion) em igual volume e aquecido a 95°C por 5 minutos e submetido à eletroforese 30-45 mA. Posteriormente, o gel foi revelado em solução brometo de ethidium por 5 minutos, lavado por 5 minutos em 1x TBE e analisado em transluminador de ultravioleta (UV). Foram observadas duas bandas distintas representando o RNA ribossomal 28S e 18S, o que confirmou a integridade e qualidade do RNA.

4.3-Transcrição reversa

Para eliminar possível contaminação com o DNA genômico, o RNA extraído das lesões foi tratado com Deoxyribonuclease I, Amplification Grade (InvitrogenLife Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA). Após a quantificação, 1,5 µg de RNA extraído foi tratado com a DNase, de acordo com o manual do fabricante. O volume de RNA correspondente a 1,5 µg foi adicionado a 1,0µl de tampão 10x (DNase I Reaction Buffer), 1,0 µl de DNase e completado com água DEPC para obter um volume final de 10 µl. A mistura ficou incubada por 15 minutos à temperatura ambiente. Para inativar a DNase, 1,0 µl de EDTA (25mM) foi adicionado e a mistura, incubada em um termociclador Mastercycler gradient (Eppendorf AG, Hamburg) por 10 minutos a 65º C. Posteriormente, a amostra foi retirada do termociclador e colocada no gelo para então ser realizado o RT-PCR.

A síntese de cDNA foi realizada a partir do mRNA total extraído das amostras, via transcrição reversa pelo kit SuperScript First-Strand Synthesis Systems for RT-PCR (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carsbad, CA, USA). Para a síntese do cDNA, foi utilizado 1,2 µg de RNA tratado com DNase, de acordo com o manual do fabricante. Foi feito um mix contendo 1µl de oligo DT, 1µl de DNTPs e 8µl do RNA tratado. Essa mistura foi incubada no termociclador a 65°C por 5 minutos para a desnaturação e colocada em um recipiente contendo gelo por um minuto. O próximo passo foi acrescentar nas amostras 2µl do tampão 10x RT, 4µl de Mgcl₂ 25mM, 2µl de DTT 0,1M, 1 µl de RNase OUT (inibidor de RNase) e incuba-las a 42°C por 2 minutos para o anelamento. Após essa etapa, foi adicionado 1µl de *SuperScript II*- RT, que é a enzima responsável pela transcrição reversa propriamente dita, e as amostras foram incubadas

a 42°C por 50 minutos e a 70°C por 15 minutos. Finalmente, foi adicionado 1µl de RNase, as amostras foram incubadas a 37°C por 20 minutos e adicionado 79µl de água, totalizando um volume final de 100µl.

4.4-Clonalidade

Para o estudo da clonalidade, foram utilizadas 6 amostras de LPCG e 5 de LCCG. Após a extração do DNA das lesões, foi realizada a quantificação do DNA e posterior digestão das amostras, utilizando-se a enzima *HhaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). Para a digestão, foi usado 1µg da amostra de DNA, 0,5 µl da enzima de digestão, 2 µl do tampão que acompanha a enzima e quantidade de água suficiente para o volume final de 20 µl. As amostras contendo a enzima de digestão foram submetidas a uma temperatura de 37°C por uma hora e, em seguida, a uma temperatura de 65°C por 20 minutos no termociclador. Após a digestão, foi realizada uma reação de PCR para se amplificar a região do gene receptor de andrógeno no qual se encontram as repetições de glicina (CAG). A reação de PCR foi feita em um volume final de 25µl, com dois tubos por amostra, sendo que em um havia 100ng de DNA digerido e no outro 100ng de DNA não digerido. Além das amostras, a mistura também tinha 2.5µl de dNTPs (100µM), 2.5µl de tampão 10x (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.8µl de 50mM MgCl₂, (Invitrogen), 10 pmol de cada *primer* (XXIDT, Coralville, IA, USA), e 0.5 µl de Taq platinum (Invitrogen). As condições da reação de PCR incluíram uma desnaturação inicial a 95°C por 8 minutos, seguidos por 34 ciclos de amplificação de 40s a 95°C, 45s a 58°C e 45s a 72°C. Para a extensão final, as mostras permaneceram a 72°C por 10 minutos. Depois de concluída a reação de PCR, foi realizada uma

eletroforese em gel de poliacrilamida em uma concentração de 8% para a determinação da clonalidade das lesões. A análise dos géis foi realizada por duas pessoas no sentido de dar maior confiabilidade aos resultados. O método utilizado para a verificação das bandas nos géis foi o mesmo descrito por Lee *et al.*, 2000, o qual se comparava a amostra digerida e a não digerida. A amostra não digerida mostrava duas bandas próximas uma da outra na região equivalente a 300pb no padrão, já que o fragmento amplificado da região polimórfica do gene contendo as repetições CAG tinha esse tamanho. Como não houve ação da enzima de restrição, foram amplificadas tanto as regiões que estavam metiladas quanto as regiões não metiladas. Por outro lado, a mesma amostra que após digerida mostrasse, no gel revelado, dois alelos na mesma região indicava a presença de células com inativação aleatória do cromossomo X, sendo portanto considerada uma lesão policlonal. Se após a revelação do gel, na canaleta da amostra digerida, apenas uma banda estivesse presente ou uma das duas bandas estivesse com uma densidade bastante fraca, a lesão seria considerada monoclonal, pois todas as células da lesão teriam o mesmo padrão de inativação do cromossomo X, sendo, originadas de uma mesma célula mãe.

4.5-Sequenciamento genético

O seqüenciamento genético é uma técnica utilizada em biologia molecular que permite a verificação de toda a sequência genômica de qualquer amostra de DNA ou de de RNAm convertida em cDNA. O princípio dessa técnica é a realização de uma reação semelhante à de PCR, na qual há não só os desoxinucleotídeos (dNTPs), mas também os didesoxinucleotídeos (ddNTPs) em menor quantidade. Os ddNTPs são moléculas

que possuem apenas um átomo de hidrogênio ao invés de um grupo OH, ligado ao carbono 3' da base nitrogenada. Essa característica faz com que o anelamento das bases durante a reação pare no momento da incorporação de uma das referidas moléculas. Esta parada no anelamento ocorre devido a não possibilidade da ocorrência de uma nova ligação fosfodiéster da molécula com outro nucleotídeo. Desta forma, haverá a formação de cadeias de nucleotídeos truncadas que serão separadas por eletroforese e dentro do aparelho seqüenciador, poderão ser identificadas. A identificação ocorre devido ao fato de estas moléculas ddNTPs, também chamadas de *Dyes*, possuírem marcadores fluorescentes que serão captados pelo laser do seqüenciador. Um computador acoplado ao aparelho seqüenciador possui um *software* que irá transformar a leitura em um gráfico denominado eletroferograma, que terá toda a sequência da porção do DNA que se deseja estudar.

Para a realização deste estudo, foi utilizado o seqüenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram seqüenciados todos os 13 éxons do gene *SH3BP2* em quatro amostras de LPCG.

As amostras de DNA extraídas das lesões, foram primeiramente submetidas à técnica de PCR, em que cada um dos 13 éxons do gene *SH3BP2* foram amplificados para posteriormente serem seqüenciados. Os iniciadores (*primers*) utilizados na reação de PCR foram previamente descritos (IMAI *et al.*, 2003) e a técnica foi realizada em um volume final de 25µl, nos quais havia 200ng de DNA, 200µmol/L de dNTPs, 10 pmol/L de cada um dos *primers forward e reverse*, 1.25 U de Taq polymerase e água para PCR suficiente para completar os 25µl. Foi utilizado o termociclador PTC-100-60 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA) no qual as amostras foram

submetidas inicialmente por 5 minutos a uma temperatura de 95°C para ocorrer a desnaturação inicial. Após a desnaturação inicial, foram realizados 35 ciclos de 45 segundos a 62°C para o anelamento, 72°C durante um minuto para extensão e 94°C por 30 segundos para desnaturação. Após os 35 ciclos de amplificação, as amostras foram submetidas a 62°C por um minuto e 72°C por 5 minutos e, depois, foram armazenadas a uma temperatura de -20°C. Posteriormente, para a confirmação da presença das bandas correspondentes a cada éxon, uma eletroforese com gel de poliacrilamida a 6,5% foi realizada com os produtos amplificados. Feita a confirmação, os produtos do PCR foram purificados utilizando-se o GFX PCR DNA kit (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) com seu respectivo protocolo. Após a purificação, foi realizada a reação de sequenciamento com o Big Dye Terminator Kit. O volume final dessa reação foi de 20µl, sendo 2µl do Big Dye (a solução contendo os dNTPs e os ddNTPs), 3µl de tampão, 1µl do primer F ou R a 3,2 pmol, 200 a 400 ng do DNA purificado e a quantidade de água suficiente para o volume de 20µl. Para essa reação, foi utilizado o termociclador PTC-100-60 thermocycler (MJ Research, Watertown, MA, USA), no qual a temperatura para desnaturação inicial foi de 95°C por um minuto. Após esta desnaturação inicial, foram realizados 30 ciclos de 96°C por 20 segundos para desnaturação, 50°C por 15 segundos para o anelamento e 60°C por 4 minutos para extensão. A última etapa antes da amostra de DNA ser levada ao seqüenciador foi a precipitação da amostra. Para isso, foi acrescentado às amostras, após a reação do Big Dye, 60µl de isopropanol e 20µl de água. Essa mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 25 minutos e, a ela, foi adicionado 150µl de etanol 70%. Houve, então, nova centrifugação a 14000 rpm por 10 minutos e após a secagem completa do *pellet*,

adicionou-se 12 µl de formamida para a ressuspensão do DNA. A solução foi levada ao seqüenciador para a realização da leitura e confecção do eletroferograma contendo a seqüência dos éxons que foram estudados.

4.6-PCR em tempo real - qPCR

A PCR quantitativa em tempo real é uma técnica empregada para inferir a quantidade inicial de um determinado produto por meio do comportamento da cinética de amplificação. Essa análise se dá através da detecção de um sinal fluorescente que é coletado e transformado em gráfico por um *software* a cada ciclo de amplificação. Para isso é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência no qual todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente. Para se estabelecer uma base de comparação entre as amostras, utiliza-se o valor de Ct (*Threshold cycle*) em que cada curva de amplificação atravessa o *Threshold*.

Para que seja possível a detecção do aumento de produto de uma PCR ao longo de cada ciclo por meio da fluorescência, é preciso marcar o fragmento amplificado com alguma molécula fluorescente. Para essa marcação, utiliza-se basicamente dois sistemas de detecção: o SYBRTM Green e TaqManTM. O SYBRTM Green emite sinal fluorescente ao intercalar com DNA dupla-fita, enquanto no TaqManTM a fluorescência depende do anelamento de uma sonda específica entre os dois *primers*, sendo ele, portanto, mais preciso.

Existem, basicamente, dois tipos de quantificação. Na quantificação absoluta, obtêm-se valores numéricos como número de cópias ou nanogramas de DNA, já a

quantificação relativa consiste na comparação entre os Cts de cada amostra a ser estudada com uma amostra calibradora, sendo os resultados apresentados em ordem de grandeza.

A técnica do PCR em tempo real tem sido amplamente empregada em estudos de carga viral, transgênicos, expressão gênica e de microRNA. Para sua realização, primeiramente deve-se proceder a escolha do endógeno que servirá como normalizador da reação. As amostras das lesões centrais e periféricas de células gigantes, do querubismo e de sangue foram submetidas às técnicas de extração de RNA, tratamento com DNase, transcrição reversa e, finalmente, ao PCR em tempo real para verificação da cinética de amplificação da β -actina. Sendo observada uma amplificação regular e semelhante deste endógeno em todas as amostras, ele foi escolhido para a realização do estudo.

Após a seleção do endógeno, optou-se por verificar a eficiência de sua amplificação em relação aos alvos a serem estudados. Para se obter o dado desejado foram utilizados o valor de *slope* (que corresponde à inclinação da reta passando por diferentes pontos de diluição) e o valor de R^2 . Os valores de *slope* e R^2 ideais, deverão ser iguais a -3,33 e 0,99 respectivamente. O valor de eficiência tem que variar entre 88 e 105%.

Para a determinação da eficiência de amplificação dos ensaios, foram realizadas diluições seriadas de uma solução de estoque com concentração conhecida em cinco pontos. A diluição seriada foi feita de modo que, de um ponto para outro, foi realizada uma diluição de duas vezes, obtendo-se as seguintes concentrações: (100 ng - 50ng - 25 ng - 12,5 ng - 6,25 ng). A variação de Ct (*Threshold cycle*) esperada nesta diluição é

de 1. Após analisados os resultados, pôde-se estabelecer a concentração ideal onde a eficiência do controle (endógeno) e do mRNA alvo é próximo de 100%.

Como pode ser visto nas figuras cinco e seis os resultados do teste de eficiência mostraram que em qualquer das concentrações a eficiência era próxima de 100%. Sendo assim para a realização desse estudo foi utilizada a concentração de 50ng.

O próximo passo foi a confecção do calibrador da reação. Primeiramente, foi realizada uma reação com cinco amostras de sangue coletadas de pacientes que não apresentavam lesão central ou periférica de células gigantes ou querubismo. A finalidade desta reação foi determinar a variação dos Cts tanto dos genes alvos como do endógeno nas amostras. Para formarem o calibrador, estas amostras deveriam ter, entre elas, pouca variação nos valores dos Cts. Nesse trabalho, três das cinco amostras testadas apresentaram pouca variação nos Cts, sendo, dessa forma, escolhidas para compor o calibrador.

Para a detecção da expressão dos alvos, foi utilizado o Step-One Real-time PCR 48-well plate (Applied Biosystems), por meio da quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$, e os resultados apresentados em Log10 (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001). Os genes analisados foram *NFATc1* e *TNF α* (TaqMan® Assays, Applied Biosystems). A reação foi realizada utilizando TaqMan Gene Expression Master Mix sem UNG (Applied Biosystems) e as condições de reação seguiram as recomendações do fabricante (95°C por 10 minutos, 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por um minuto) com um volume final de 20 μ l, e todas as amostras feitas em triplicata.

A expressão foi normalizada utilizando o endógeno β -actina. Para isso foi realizada a comparação da expressão dos genes *NFATc1* e *TNF α* com a expressão do endógeno, tanto nas amostras das lesões estudadas quanto no calibrador.

A comparação foi feita subtraindo o Ct dos genes alvo pelo Ct do endógeno, dando como resultado o Δ Ct. Com os Δ Cts das amostras e do calibrador determinados foi então realizada a subtração do Δ Ct da amostra pelo do calibrador, obtendo desta forma o $\Delta\Delta$ Ct. Esse valor foi aplicado à fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (SCHMITTGEN e LIVAK, 2008).

O método Ct comparativo ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) é um método de quantificação relativa que descreve a mudança na expressão de um gene alvo, em um grupo de amostra estudada, normalizada com um gene constitutivo, comparado com um grupo de referência (Applied Biosystems User Bulletin Nº2 – P/N 4303859). Análises utilizando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ tem sido amplamente utilizada em estudos de expressão gênica.

4.7- Imunoistoquímica

Os cortes montados em lâminas gelatinizadas foram desparafinizados em Xilol (C_8H_{10}), por 18 horas, e reidratados gradativamente por cinco minutos, em etanol 100%, 95% e 80%. Posteriormente, os cortes foram tratados com hidróxido de amônio 10% em etanol a 95% por 10 minutos e lavado sete vezes em água destilada. A recuperação antigênica foi realizada com a solução ácido cítrico, (pH 6,0), em TA, por uma hora e lavada em cinco banhos de água destilada. Para bloqueio da peroxidase endógena, foi realizado dois banhos de cinco minutos em solução de metanol com peróxido de

hidrogênio 20 v (1:1). As amostras foram lavadas em água destilada e, posteriormente, em três banhos de cinco minutos de solução de TRIS-HCl (pH=7.4).

A incubação primária foi realizada por 30 minutos em temperatura ambiente, sob agitação leve, com o anticorpo NFATc1, (diluição 1:25) , Clone 7A6 (Santa Cruz® Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA). Após lavagem com TRIS-HCL, foi realizada incubação com o sistema Envision (Dako® Corporation, Carpinteria, CA, USA), por 30 minutos, em temperatura ambiente, sob agitação leve.

A revelação foi realizada com solução de diaminobenzidina (Sigma, St Louis, MO, USA) com peróxido de hidrogênio 10% e a contra coloração com hematoxilina de Mayers. Cortes sem o anticorpo primário foram utilizados como controle negativo.

Apenas os cortes contendo áreas de tumor suficientes para avaliação foram considerados. Dois patologistas avaliaram os cortes e classificaram as reações de acordo com o número de células positivas

5-RESULTADOS

5.1-Clonalidade

Os resultados da técnica para análise do gene humano receptor de andrógeno (HUMARA) utilizada na determinação do padrão clonal das LCCG e LPCG, assim como os dados clínicos dos pacientes portadores das lesões estão expostos na tabela um. Das seis LPCG analisadas, três apresentaram um padrão monoclonal e das cinco LCCG estudadas, três também apresentam um padrão monoclonal. O padrão de amplificação visto no gel de poliacrilamida, objetivando, determinar a clonalidade das

lesões, tanto de uma amostra monoclonal como de uma policlonal, é exposto na figura um.

Tabela 1- Dados clínicos e resultados da clonalidade

Diagnóstico	Idade	Localização	Clonalidade
LPGC			
1	08	Maxila	Monoclonal
2	22	Maxila	Monoclonal
3	15	Mandíbula	Policlonal
4	50	Maxila	Monoclonal
5	24	Mandíbula	Policlonal
6	52	Maxila	Policlonal
LCCG			
1	12	Mandíbula	Monoclonal
2	41	Mandíbula	Monoclonal
3	26	Mandíbula	Policlonal
4	25	Mandíbula	Policlonal
5	23	Mandíbula	Monoclonal

LPCG= lesão periférica de células gigantes; LCCG= lesão central de células gigantes

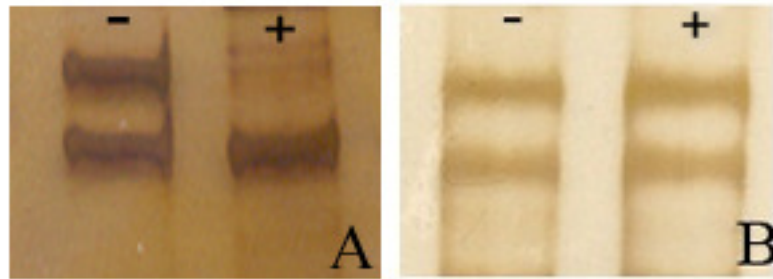


Figura 1 - Gel de eletroforese mostrando amplificação da região polimórfica do exon um do gene humano receptor de andrógeno (HUMARA). **A:** Amplificação sem (-) e com (+) digestão pela enzima *HhaI*. Pode-se observar a perda significativa de um dos alelos na amostra digerida representando um padrão monoclonal da lesão. **B:** Amplificação sem e com digestão pela enzima *HhaI*. Pode-se observar amplificação dos dois alelos na amostra digerida representando um padrão policlonal da lesão.

5.2-Sequenciamento genético

Após realizadas as reações de sequenciamento genético de todos os 13 éxons do gene SH3BP2, em quatro lesões periféricas de células gigantes, não foi constatada nenhuma mutação genética nestas lesões. Pôde-se notar apenas um polimorfismo genético c.300T>C - já descrito na literatura - que se encontrava no éxon quatro e que não ocasionava a mudança do aminoácido daquela posição. (Figura 2).

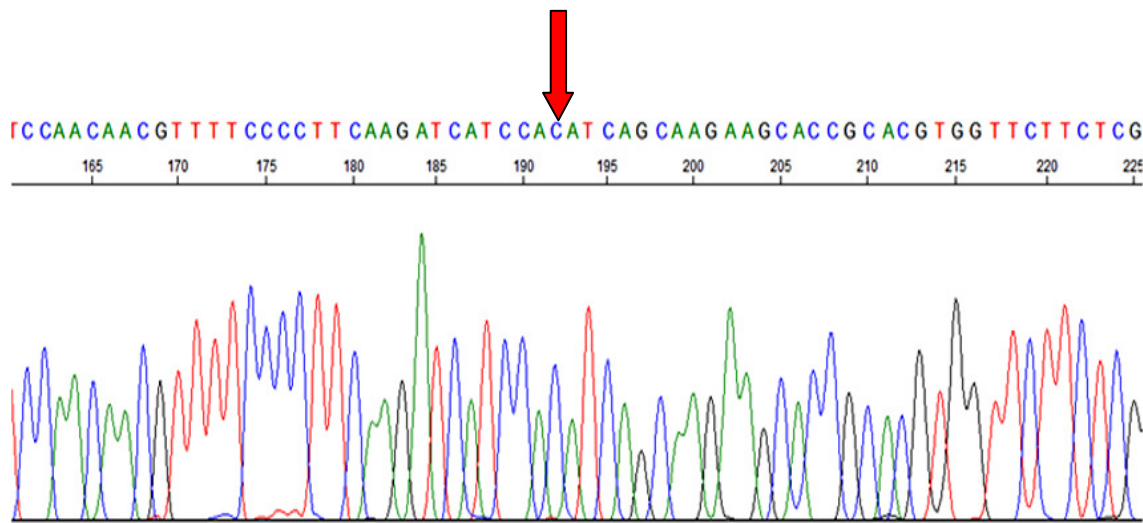


Figura 2 – Eletroferograma mostrando o resultado do sequenciamento genético de um fragmento do exon 4 do gene *SH3BP2* de uma amostra de LPCG em que há um polimorfismo c.300T>C que não ocasionou a mudança do aminoácido histidina.

5.3-PCR em tempo real qPCR

Como pode ser visto nas figuras três e quatro, os resultados obtidos com esta técnica mostraram que todas as amostras de LPCG, LCCG e querubismo estudadas tiveram um aumento significativo na expressão de NFATc1 quando comparados com o calibrador da reação. Por outro lado, quando comparadas com o calibrador da reação formado por sangue de indivíduos controle, menor expressão de TNF α foi observada em quase todas as lesões estudadas (somente uma LPCG mostrou um pequeno aumento da expressão deste fator). Estes resultados também estão demonstrados nas figuras três e quatro. As figuras cinco e seis demonstram as curvas de amplificação e as retas que passam pelos pontos contendo as diluições seriadas com os valores de slope e R² dos dois genes investigados a fim de determinar a eficiência da reação.

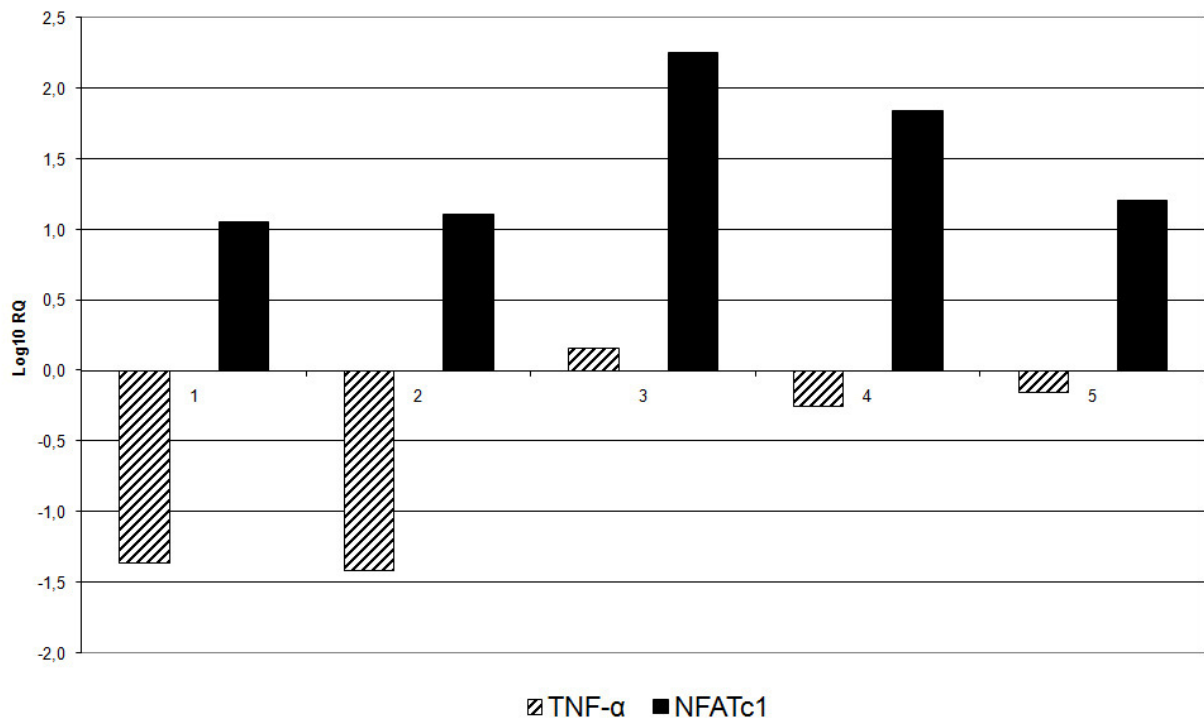


Figura 3 - Análise do resultado da técnica de PCR em tempo real mostrando a expressão de NFATc1 e TNF- α nas lesões periféricas de células gigantes (1-5). A figura mostra um aumento da expressão de NFATc1 simultaneamente à diminuição da expressão de TNF- α na maioria das amostras.

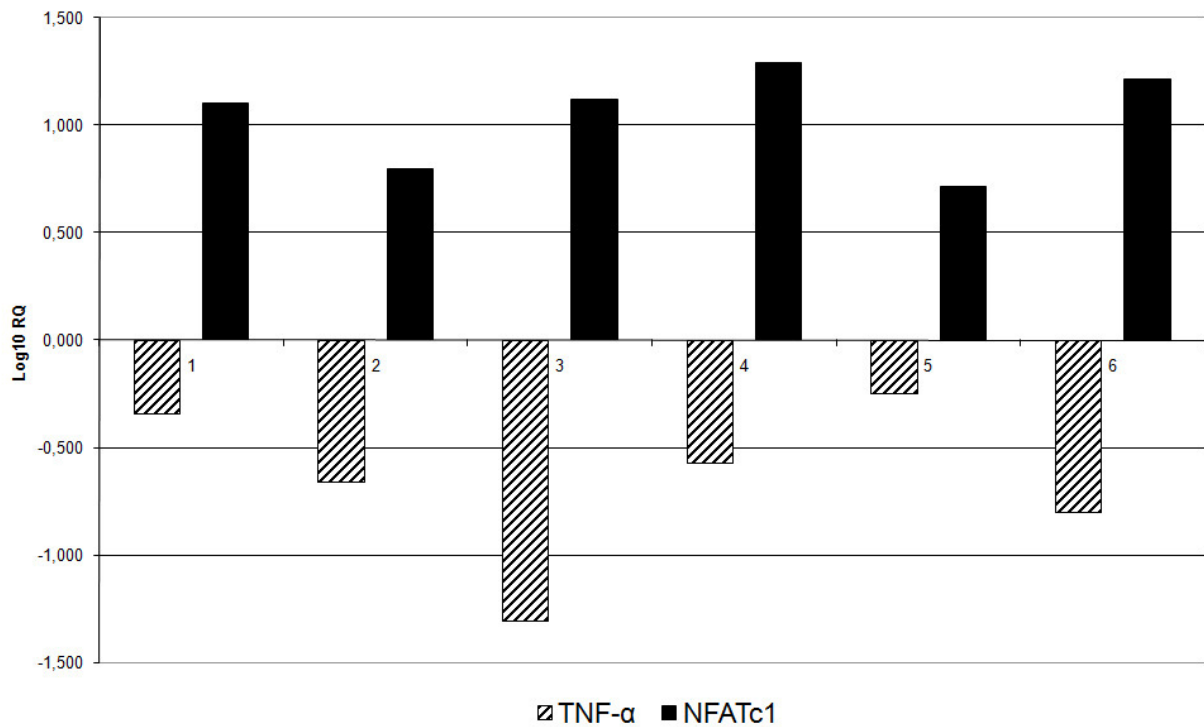


Figura 4 - Análise do resultado da técnica de PCR em tempo real mostrando a expressão de NFATc1 e TNF- α nas lesões centrais de células gigantes (1-5) e no querubismo (6). A figura mostra um aumento da expressão de NFATc1 simultaneamente à diminuição na expressão de TNF- α nas LCCG e no querubismo.

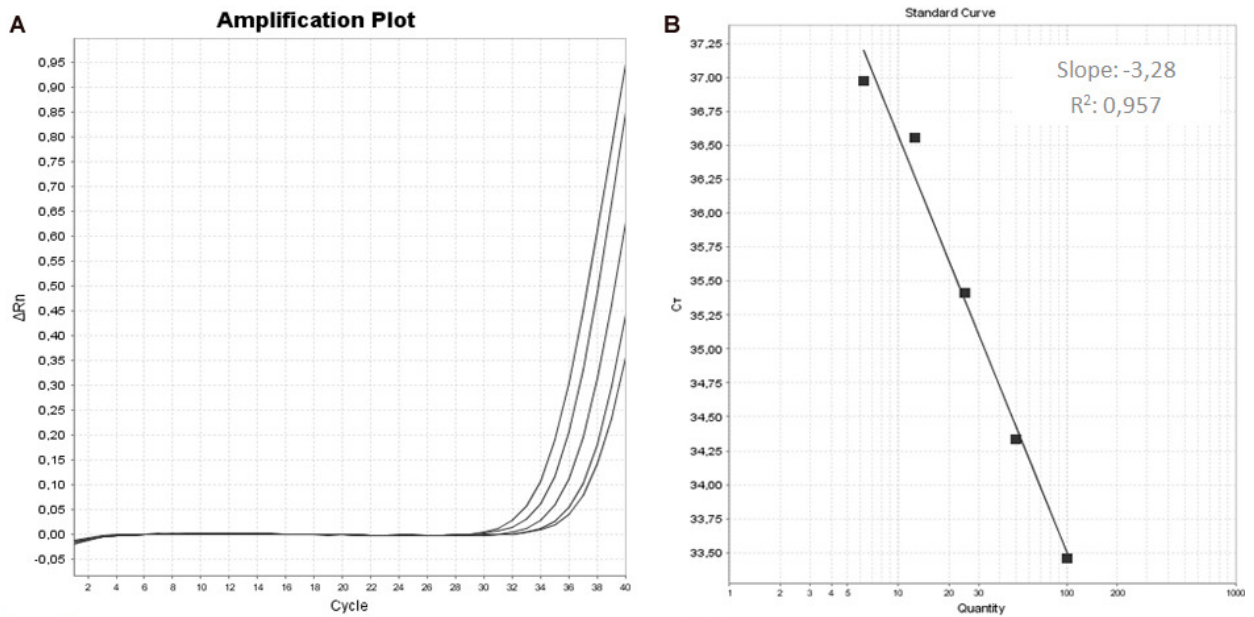


Figura 5 – Teste de eficiência de amplificação do TNF- α . **A**: Gráfico com as curvas de amplificação dos cinco pontos contendo as concentrações pré-estabelecidas após a diluição seriada. **B**: Gráfico com a reta passando pelos pontos de diluição, indicando os valores de R^2 e slope.

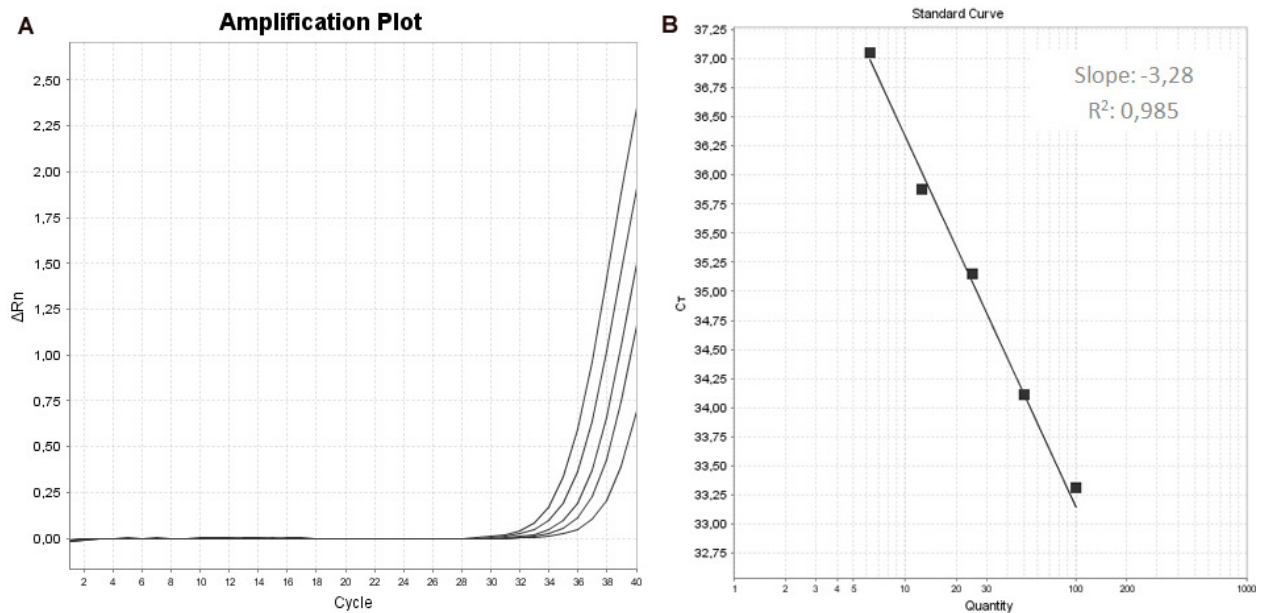


Figura 6 - Teste de eficiência de amplificação do NFATc1. **A:** Gráfico com as curvas de amplificação dos cinco pontos contendo as concentrações pré-estabelecidas após a diluição seriada. **B:** Gráfico com a reta passando pelos pontos de diluição, indicando os valores de R^2 e slope .

5.4-Imunoistoquímica

Como pode ser visualizado na figura sete, os resultados da técnica de imunoistoquímica mostraram uma marcação predominantemente nuclear nas células gigantes multinucleadas com eventual marcação nas células mononucleares presentes nas lesões.

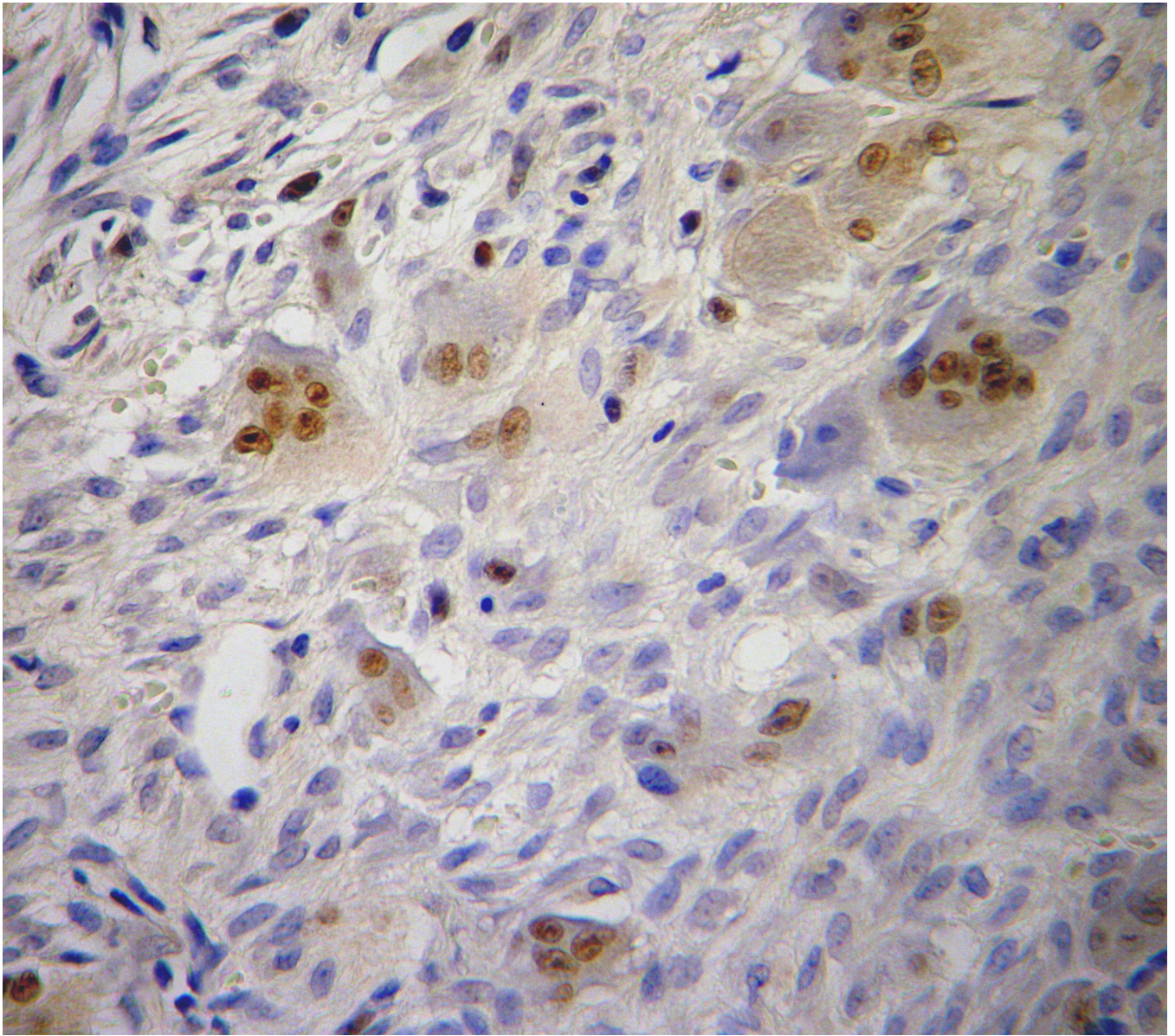


Figura 7 - Imunomarcacão para a proteína NFATc1, mostrando positividade nuclear principalmente nas células gigantes multinucleadas (400x).

6-DISCUSSÃO

A ausência de trabalhos sobre a natureza clonal das lesões de células gigantes dos maxilares motivou a investigação deste estudo. Há na literatura, apenas alguns estudos sobre a natureza clonal do TCG dos ossos longos (VOGRINCIC *et al.*, 1997 e SHWARTZ *et al.*, 2002). Nesses dois estudos, o TCG apresentou um padrão predominantemente policlonal.

O estudo da clonalidade de lesões é importante na determinação de sua patogênese assim como no desenvolvimento de novas terapias. Tanto a LCCG como a LPCG são classificadas atualmente como lesões reativas. A LCCG ainda tem sua etiologia desconhecida enquanto a LPCG está possivelmente associada a fatores irritativos locais (CARINCI *et al.*, 2005 e KATSIKERIS *et al.*, 1998). Os resultados deste estudo mostraram que seis das 11 lesões apresentaram um padrão monoclonal, o que sugere uma natureza neoplásica dos processos. Por outro lado, cinco das 11 lesões apresentaram um padrão policlonal, de maneira semelhante ao que ocorre com lesões reativas.

Um importante aspecto a ser observado nesses resultados é em qual estágio de desenvolvimento as lesões foram estudadas. Algumas lesões que se iniciam com vários clones de células alterados podem, em dado momento, apresentar a predominância de determinado clone (ALEXANDER *et al.*, 1985). Neste caso, o campo clonal é grande e, mesmo que a lesão origine de vários clones alterados, a parte estudada poderá se encontrar dentro do mesmo campo e, dessa forma apresentar um aspecto monoclonal. Pode também haver, dentro de uma mesma lesão neoplásica, uma expansão clonal

uniforme de diferentes clones celulares que adquiriram alterações genéticas separadamente, dando a esta lesão uma característica policlonal.

Outra questão importante a ser considerada na análise dos resultados deste estudo é o fato de que, durante a progressão tumoral, pode ocorrer uma situação em que, inicialmente, a lesão tem um comportamento reativo e policlonal evoluindo para uma situação monoclonal, após a ocorrência de alguma alteração genética em determinado clone (GARCIA *et al.*, 1999).

A presença de um número quase igual de lesões mono e policlonais pode também ser resultado de uma mistura das células das lesões com células estromais, inflamatórias ou da mucosa adjacente, dando o aspecto policlonal a algumas delas.

A monoclonalidade encontrada em algumas amostras está de acordo com a teoria da carcinogênese, que diz que uma célula, após adquirir uma ou mais mutações, se divide dando origem a um clone de células alteradas e consequentemente, a uma neoplasia (KNUDSON, 1985). Desta forma, mesmo com a monoclonalidade observada em algumas das lesões de células gigantes, o resultado deve ser interpretado com cautela antes da conclusão de que elas sejam neoplásicas. Um trabalho realizado por Gomes *et al.*, (2009) pode ser citado como exemplo da dificuldade existente para a interpretação desses achados. Neste trabalho, o mixoma e o tumor odontogênico epitelial calcificante, apesar de apresentarem natureza neoplásica, mostraram um caso de cada com padrão policlonal. Em outro estudo, Gong *et al.*, (2008), mostraram que a displasia fibrosa, que possui uma mutação no gene *GNAS1*, apresenta um padrão monoclonal apesar de ser uma lesão reativa.

De qualquer modo, pode-se dizer que ainda que tenham sido encontradas seis lesões com um padrão monoclonal, outros parâmetros devem ser usados para a sua

classificação como neoplasia ou processo reativo. A natureza monoclonal presente em algumas lesões indica uma origem genética comum a esses processos. Novos estudos poderão indicar que, apesar da diversidade de comportamento, formas terapêuticas comuns poderão ser encontradas na abordagem destes processos.

A principal característica que faz com que LPCG, LCCG e querubismo apresentem um aspecto histopatológico bastante semelhante e que os tornam indistinguíveis sem os dados clínicos e radiográficos associados, é a presença das células gigantes multinucleadas entremeadas em um estroma de tecido conjuntivo com presença de células fusiformes mononucleares (KAUGARS *et al.*, 1992). As células gigantes possuem características ultra-estruturais de osteoclastos e, conseqüentemente, a capacidade de causar reabsorção óssea (ITONAGA *et al.*, 2003). Nas três lesões investigadas neste estudo, uma das características marcantes é a presença de destruição óssea, que aparece de forma intensa na LCCG e no querubismo, por se tratarem de lesões intra-ósseas, e, em menor grau, na LPCG, que é uma lesão extra-óssea, podendo levar apenas a reabsorção óssea superficial no local aonde ela se encontra (HORNER, 1989).

Os osteoclastos derivam de células mielóides progenitoras localizadas na medula óssea e necessitam de uma série de eventos bioquímicos para se diferenciarem nestas células que terão a capacidade de reabsorver osso. As principais citocinas envolvidas nesta ativação são, o RANKL, o M-CSF e o TNF- α , que ativam seus respectivos receptores extracelulares e causam alterações intra-citoplasmáticas importantes no processo de diferenciação. A ativação dos receptores permite a formação de complexos protéicos importantes na transmissão de sinais para o núcleo,

onde genes serão ativados possibilitando a diferenciação das células mielóides em osteoclastos (NOVACK e FACCIO, 2007).

A ligação de RANKL, M-CSF e $TNF-\alpha$ nos seus receptores extracelulares é de fundamental importância na ativação da proteína SH3BP2. Essa proteína adaptadora citoplasmática possui vários domínios de ligação que permitem sua interação com outras proteínas importantes na transmissão de diversos sinais para o núcleo (DECKERT, 1998).

O M-CSF é uma citocina que atua na proliferação das células precursoras de osteoclastos bem como na sua diferenciação em unidades formadoras de colônias de macrófagos (CFU-M). Outra função importante do M-CSF, é a capacidade de ativar uma outra citocina MITF, que irá se ligar na região promotora do gene *bcl-2* e desta forma promover a sobrevivência das células. Esta citocina também faz com que haja um aumento da transcrição do gene *TNF- α* após a ativação de SH3BP2 através da via MAPK/ERK. O $TNF-\alpha$ também possui importância fundamental na osteoclastogênese, pois, além de ativar diretamente a diferenciação das células precursoras, irá também estimular a produção de RANK-L e M-CSF - principalmente pelos osteoblastos - fazendo com que o ciclo de ativação dos osteoclastos permaneça ativo (YAVROPOULOU E YOVOS, 2008).

O RANK-L, após ativar SH3BP2, irá promover o aumento do NFATc1, que é considerado o principal fator de transcrição na diferenciação de osteoclastos. A mutação no gene que codifica a proteína SH3BP2 faz com que ela, tenha um ganho de função e que haja uma maior ativação das células que irão promover a reabsorção óssea devido, principalmente, ao aumento dos níveis de NFATc1 (UEKI *et al.*, 2007).

Estudos moleculares do gene que codifica a proteína SH3BP2 nas lesões presentes no querubismo têm mostrado de mutações nos éxons nove (UEKI *et al.*, 2001; de LANGE *et al.*, 2007b) e três (CARVALHO *et al.*, 2008). Recentemente, alguns autores também investigaram a presença de mutações no éxon nove em LCCG e LPCG (LIETMAN *et al.*, 2007; de LANGE *et al.*, 2007c; IDOWU *et al.*, 2008). Nesses estudos, nenhuma mutação foi encontrada nas lesões. Em um estudo recente, no qual os autores investigaram todos os 13 éxons do gene *SH3BP2* na LCCG, foi encontrada uma nova mutação, localizada no éxon 11 (CARVALHO *et al.*, 2009).

Diante da presença destas diferentes mutações previamente encontradas nas lesões do querubismo e LCCG, foi feito, neste estudo, o sequenciamento de todos os 13 éxons do mesmo gene em quatro LPCG. Nenhuma mutação foi encontrada na LPCG, apenas polimorfismos já descritos, localizados no exon quatro, e que não causam mudança de aminoácido.

Sendo o NFATc1 uma citocina já consagrada na literatura como um fator essencial na via de diferenciação dos osteoclastos, assim como o fato de que há também evidências que as células gigantes multinucleadas encontradas nas lesões presentes no querubismo, LCCG e LPCG possuem características de osteoclastos, neste estudo, propôs-se também, avaliar quantitativamente a sua expressão nestas lesões através da técnica de PCR em tempo real. Optou-se também por estudar a expressão do TNF α devido a sua direta participação na ativação das células progenitoras de osteoclastos e na estimulação para um aumento da produção de RANK-L e M-CSF. Além disso, essa citocina tem uma importante participação no processo inflamatório (KITAURA *et al.*, 2005).

Os resultados da avaliação feita pela técnica de PCR em tempo real, mostraram um aumento na expressão de NFATc1 associado a uma diminuição da expressão de $\text{TNF}\alpha$, indicando a efetiva participação deste transcrito na patogenia das lesões. É interessante enfatizar que, dentre as LCCGs estudadas, há uma que possui uma mutação no éxon 11, no domínio SH2, levando a uma alteração do aminoácido glutamina para leucina. Já o caso de querubismo também incluído neste estudo, possui tanto na lesão como no sangue periférico, uma mutação no éxon quatro, no domínio homólogo à pleckstrina localizado na porção N-terminal da proteína. Essa mutação envolveu uma região diferente dos casos de querubismo relatados na literatura, que descreve casos de mutações encontradas no éxon nove. As outras lesões centrais e periféricas que também foram avaliadas neste trabalho pela técnica de PCR em tempo real não possuíam mutações e mostraram, de forma semelhante, um aumento da expressão de NFATc1 e diminuição de $\text{TNF}\alpha$.

Após a avaliação da expressão de NFATc1 e a constatação do seu aumento em todas as lesões estudadas, foi realizada também a análise imunoistoquímica, visando saber qual a localização desta proteína nas células constituintes das lesões. Os resultados mostraram que a proteína localiza-se principalmente no núcleo das células gigantes multinucleadas com eventuais marcações em células mononucleares. Esses resultados reforçam a hipótese da possibilidade de efetiva participação de NFATc1 na formação das células gigantes multinucleadas que constituem as lesões estudadas.

Os dados descritos acima mostram que o aumento de NFATc1 principalmente no núcleo das células gigantes multinucleadas associado à diminuição do $\text{TNF}\alpha$, parece ocorrer independentemente da mutação na SH3BP2. Isso sugere que diferentes

alterações genéticas ou epigenéticas em outros genes importantes nesta via ou a existência de vias distintas também podem estar envolvidas no desenvolvimento das lesões. As diferentes alterações podem causar um efeito semelhante ao da mutação de *SH3BP2*.

Diante dos resultados obtidos após a realização deste estudo, é possível sugerir que estudos visando a modulação da via do NFATc1 por meio de terapias moleculares poderão constituir formas terapêuticas alternativas para as lesões de células gigantes dos maxilares.

7-CONCLUSÕES

- 1- Alguns casos de LCCGs e LPCGs apresentaram padrão monoclonal.
- 2- As LPCGs não possuem mutações em nenhum dos exons do gene que codifica a proteína SH3BP2.
- 3- As LCCGs, LPCGs e o querubismo apresentam transcrição aumentada de NFATc1 associada a uma expressão diminuída de TNF α .
- 4- A proteína NFATc1 está localizada principalmente no núcleo das células gigantes multinucleadas da LPCG, LCCG e querubismo.

8-REFERÊNCIAS

ALEXANDER P. Do cancers arise from a single transformed cell or is monoclonality of tumours a late event in carcinogenesis ? **Br J Cancer**, v.51, p.453-457,1985.

ALLEN R.C. et al. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. **Am J Hum Genet**, v.51, n.6,p.1229-1239, 1992.

ASAGIRI M.; TAKAYANAGI H. The molecular understanding osteoclast differentiation. **Bone**, v.40, p,251-264, 2007.

BANDRÉS, E. et al. Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. **Molecular Cancer**, v.5, n.5, p.1-10, 2006.

BELL S.M. et al. 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**, v.44, n.2, p.163-70, 1997.

BODNER L. et al. Growth potential of peripheral giant cell granuloma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.83, n.5, p.548-551, 1997.

BOOM R. et al. Rapid and simple method for purification of nucleic acids. **J Clin Microbiol**, v.28, n.3, p.495–503, 1990.

CARINCI F. et al. Genetic Profiling of Central Giant Cell Granuloma of the Jaws. **J Craniofac Surg**, v.16, n.3, p.399-407, 2005.

CARLOS R.; SEDANO H.O: Intralesional corticosteroids as an alternative treatment for central giant cell granuloma. **Oral Surg Oral Med Oral Radiol Endod**, v.93, n.2, p.161-166, 2002.

CARVALHO V.M. et al. Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell and cherubism. **Oral Dis**, v.15, n.1, p.106-110, 2009.

CARVALHO V.M. et al. A novel mutation of SH3BP2 gene in an aggressive case of Cheubism. **Oral Oncology**, v.44, n.2, p.153-155, 2008.

CHEN G.L.; PRCHAL J.T. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. **Blood**, v.110, n.5, p.411-419, 2007.

CHUONG R. et al. Central giant cell lesions of the jaws: a clinicopathologic study. **J Oral Maxillofac Surg**, v.44, n.9, p.708-713, 1986.

DECKERT M. The adaptor protein 3BP2 in leukocyte signaling. **Med Sci**, v.22, n.12, p.1081-1086, 1998.

de LANGE J.; VAN DEN AKKER H.P.; 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**, v.104, n.5, p.603-15, 2007a.

de LANGE J. et al. 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**, v.103, n.3, p.378-381, 2007b.

de LANGE J. et al. DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.45, n.6, p.499-500, 2007c.

de SOUZA P.E. et al. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. **J Oral Pathol Med**, v.28, n.2, p.54-58, 1999.

FARRIER S.L. et al. A 10-year review of the occurrence and treatment of central giant cell granulomas, in a district General Hospital. **J Oral Pathol Med**, v.35, n.6, p.332-337, 2006.

FEARON E.R.; HAMILTON S.R.; VOLGENSTEIN B. Clonal analysis of human colorectal tumors. **Science**, v.238, n.4824, p.93-197, 1987.

FOUCALT I. et al. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. **Blood**; v.105, n.3, p.1106-1113, 2005.

FOUCALT I. et al. The Chaperone Protein 14-3-3 Interacts with 3BP2/SH3BP2 and Regulates Its Adapter Function. **J Biol Chem**, v.278, n.9, p.7146-7153, 2003.

GARCIA S.B. et al. Field cancerization, clonality and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. **J Pathol**, v.187, n.1, p.61-81, 1999.

GOMES C.C. et al. Clonal nature of odontogenic tumours. **J Oral Pathol Med**, v.38, n.4, p.397-400, 2009

GONG L.; ZHANG W.; SU Q. Clonal status of fibrous dysplasia. **Pathology**, v.40, n.4, p.392-395, 2008.

HORNER K. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinico- radiological study. **Clin Radiol**, v.40, n.6, p.622-626, 1989.

HYCKEL P. et al. Cherubism - new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. **J Craniomaxillofac Surg**, v.33, n.1, p.61-68, 2005.

IDOWU B.D. et al. Mutations in SH3BP2, the cherubism gene, were not detected in central or peripheral giant cell tumours of the jaw. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.46, n.3, p.229-230, 2008.

IMAI Y. et al. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p 16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. **Cleft Palate Craniofac J**, v.40, p.632-638, 2003.

ITONAGA I. et al. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar in giant cell granuloma of the jaw. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.4, p.224-231, 2003.

JAFFE H.L. Giant cell reparative granuloma, traumatic bone cyst and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of jaw bones. **Oral Surg**, v.6, p.159-175, 1953.

JEVREMOVIC D. et al. Regulation of NK cell-mediated cytotoxicity by the adaptor protein 3BP2. **J. Immunol**, v.166, n.12, p.7219-7228, 2001.

KATSIKERIS N.; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU E.; ANGELOPOULOS A.P. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.17, n.2, p.94-99, 1988.

KAUGARS G.E.; NIAMTU J 3RD.; SVIRSKY J.A. Cherubism: diagnosis, treatment, and comparison with central giant cell granulomas and giant cell tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.73, n.3, p.369-374, 1992.

KIM K. et al. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). **Mol Endocrinol**, v.22, n.1, p.176-185, 2008.

KITAURA H. et al. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. **J Clin Invest**, v.115, n.12, p.3418-3427, 2005.

KNUDSON A.G Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. **Cancer Res**, v. 45, n.4, p.1437-1443, 1985.

LEEDHAM S.; WRIGHT N. Human tumour clonality assessment-flawed but necessary. **J Pathol**, v.215, n.4, p.351-354, 2008.

LIETMAN S.A. et al. Identification of a novel mutation of SH3BP2 in ceherubism and demonstration that SH3BP2 mutations lead to increased NFAT activation. **Hum Mutat**, v.27, n.7, p.717-718, 2006.

LIETMAN S.A. et al. SH3BP2 is rarely mutated in exon 9 in giant cell lesion outside cherubism. **Clin Orthop Relat Res**, v. 459, p.22-27, 2007.

LIETMAN S.A. et al. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.371, n.4, p.644-648, 2008.

LIU B.; YU S.F.; LI T.J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.6, p.367-375, 2003.

LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T. Analysis of Relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ Method. **Methods**, v.25, n.4, p.402-408, 2001.

MARTIN G.R. et al. X-chromosome inactivation during differentiation of female teratocarcinoma stem cells in vitro. **Nature**, v.271, n.5643, p.329-333, 1978.

MOTAMEDI M.H.K. et al. Peripheral and central giant cell granulomas of the jaws: A demographic study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.103, n.6, p.39-43, 2007.

NOVACK D.; FACCIO R. Jawing about TNF: New hope for cherubism. **Cell**, v.128, n.1, p.15-17, 2007.

NOWELL P.C. The clonal evolution of tumor cell populations. **Science**, v.194, n.4260, p.23-28, 1976.

REN R. et al. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. **Science**, v.259, n.5098, p.1157-1161, 1993.

RIGGS A.D. X-inactivation, differentiation, and DNA methylation. **Cytogenet Cell Genet**, v.14, n.1, p.9-25, 1975.

ROGINSKY V.V. et al. Familial cherubism: The experience of the Moscow Central Institute for Stomatology and Maxillo-Facial Surgery. **Int J. Oral Maxillofac Surg**, v. 38, n. 3, p. 218-223, 2009.

SCHMITTGEN, T.; LIVAK, K.J. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_t method. **Nature protocols**, v.3, n.6, p.1101-1108, 2008.

SCHWARTZ H.S.; ESKEW J.D.; BUTLER M.G. Clonality studies in giant cell tumor of bone. **J Orthop Res**, v.20, n.2, p.387-330, 2002.

SECKER-WALKER L.M. The meaning of a clone. **Cancer Genet Cytogenet**, v.16, n.2, p.187-188, 1985.

TAKAYANAGI H. Mechanistic insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. **J Mol Med**, v.83, n.3, p.170–179, 2005.

TAKAYANAGI H. The Role of NFAT in Osteoclast Formation. **Ann N Y Acad Sci**, v.1116, p.227-237, 2007.

UEKI Y. et al. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. **Cell**, v.128, n.1, p.71-83, 2007.

UEKI Y. et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. **Nat Genet**, v.28, n.2, p.125-126, 2001.

VOGRINCIC G.S.; O'CONNELL J.X.; GILKS C.B. Giant Cell Tumor of Tendon Sheath Is a Polyclonal Cellular Proliferation. **Hum Pathol**, v.28, n.7, p.815-819, 1997.

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**, v.90, n.6, p.765-772, 2000.

YAVROPOULOU M.P.; YOVOS J.G. Osteoclastogenesis- Current Knowledge and future perspectives. **J Musculoskelet Neuronal Interact**, v.8, n.3, p.204-216, 2008

WAINSCOAT J.S.; FEY M.F. Assessment of clonality in human tumors: a review. **Cancer Res**, v.50, n.5, p.1355-1360, 1990.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG

	Universidade Federal de Minas Gerais Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP
---	--

Parecer nº. ETIC 365/07

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 14 de setembro de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo do gene SH3BP2 nas lesões central e periférica de células gigantes"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia
Coordenadora do COEP-UFMG

ANEXO B – Artigo sobre clonalidade

Clonality analysis of giant cell lesions of the jaws

Fabrício Rezende Amaral ¹, Carolina Cavaliéri Gomes ¹, Carla Silveira Oliveira ¹, Paulo Eduardo Alencar de Souza ², Ricardo Santiago Gomez ^{1, *}.

¹ Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

² School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Ricardo S. Gomez, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

e-mail address: rsgomez@ufmg.br

Key-words: clonality; clonal nature; giant cell lesion; giant cell granuloma; HUMARA

Abstract

Despite the importance of clonality to understand the pathogenesis and progression of tumors, it has not been investigated yet in giant cell lesions of the jaws. The aim of this study was to analyze the clonality of peripheral giant cell lesions (PGCL) and central giant cell lesions (CGCL) of the jaws. Six samples of PGCL and five samples of CGCL were analyzed in this study using the polymorphic human androgen receptor locus (HUMARA) assay. Three out of the five samples of the CGCL and three out of six samples of PGCL exhibited a monoclonal pattern. Our findings demonstrate that some giant cell lesions of the jaws are clonal, which indicate that these lesions may have a common genetic mechanism of development. Further studies are necessary to better elucidate the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of such lesions.

Introduction

Central giant cell lesion (CGCL) is an intra-osseous lesion of unknown etiology⁴ that occurs mainly in the mandible of patients ranging from 10 to 25 years⁸. Radiographic findings are diverse, ranging from small unilocular lesions to large multilocular lesions with displacement of teeth, root resorption, and cortical perforation¹³. Peripheral giant cell lesion (PGCL) is a reactive lesion usually related to local irritating factors in gingiva¹⁵. Histologically, PGCL and CGCL are characterized by the presence of multinucleated osteoclast-like giant cells in a background of oval to spindle-shaped mononuclear cells^{14,19}.

The study of clonal origin of tumors can help to elucidate the pathogenesis and progression of the diseases. A clonal population of cells is by definition cells arising from mitotic division from a single somatic cell²⁵. The cells constituting a single clone are not

necessarily genetically identical, because clonal evolution may occur within such populations of cells²². For detection of clonal populations that do not have known genetic markers, detection of clonality by phenotypic assays is necessary⁶.

The most frequently used phenotypic clonality technique is based on the X-chromosome inactivation principle. In females, during early embryonic development, there is inactivation of one X and it is passed to the progeny of the cell in a stable manner^{21,27}. Females heterozygous for polymorphic X-chromosome inactivation are therefore mosaics regarding X-chromosome activity^{12,20}. There is evidence that X-chromosome inactivation is related to differential methylation of cytosine in the DNA of X-chromosome genes²³. Determination of maternal and paternal X chromosome activation status is useful in the diagnostic analysis of nonrandom X inactivation patterns and it has been of interest in studies of clonality of neoplastic cells in females⁹.

The Human Androgen Receptor (HUMARA) gene polymorphism assay is the most used method to distinguish the active and inactive X chromosome. The HUMARA gene presents an in-frame CAG trimeric repeat encoding 11-31 glycine residues in the first exon. This repeat is highly polymorphic, with a heterozygosity of 90%. The HUMARA assay is based on this high heterozygosity. It consists in the use of a methylation-sensitive enzyme followed by polymerase chain reaction amplification. If the sites of restriction are unmethylated, digestion will occur between the flanking oligonucleotides and the following amplification will not be possible. On the contrary, if the restriction sites are methylated, no digestion will occur and the primers will produce a proper amplification of the target sequence in the PCR². In other words, as each female cell has one inactive X-chromosome, the amplification of two different size fragments in the PCR indicates cells from different clonal origin. The amplification of the target DNA

without the enzymatic digestion is essential to eliminate the females that show homozygosity, as they are not informative². The HUMARA method is more widely applicable than protein isoforms and transcription-based methods because the variable number of CAG nucleotides repeat allows most patients to be informative for the assay².

Although there are few studies that investigated the clonal nature of the giant cell tumor of the bone^{24,26}, as far as we are concerned, there is no data regarding clonality of giant cell lesions of the jaws. Therefore, the objective of this study is to investigate the clonal nature of PGCL and CGCL of the jaws using the polymorphic human androgen receptor locus (HUMARA) assay.

Material and Methods

Tissue and DNA extraction

A total of six samples of PGCL and five samples of CGCL were included in this study. All the subjects were female. The project was approved by the local ethics committee and an informed consent was obtained from each patient. The CGCL was considered aggressive when the lesion was larger than 4cm in size and the cortical bone was damaged or expanded and teeth displaced⁷. In each case, a portion of the lesion was resected, immediately snap frozen and stored at -80°C. For diagnosis confirmation, a portion of the tissue was fixed in 10% buffered formalin and paraffin embedded. The DNA extraction from the fresh tissue was carried out as previously described³ after microdissection.

Digestion

1 µg of DNA was digested by 5.0 units of *HhaI* (New England Biolabs, Ipswich, MA, USA). The digestion conditions were: 37°C for 1 hour followed by 65°C for 20 minutes for the enzyme inactivation. In each time, the same amount of DNA of all samples was incubated with the enzyme digestion buffer and without the enzyme. In each reaction, a positive control was included to assure that the reaction occurred properly.

Polymerase Chain Reaction

For each sample 100 ng of DNA template digested with the enzyme and 100ng incubated without the enzyme were used separately in a PCR reaction. PCR was performed using primers previously described². The 25µl of PCR mixture included 2.5µl of each DNTP (100µM), 2.5µl of 10x PCR buffer (Invitrogen, São Paulo, Brazil), 0.8µl of 50mM MgCl₂ (Invitrogen), 10 pmol of each primer (XXIDT, Coralville, IA, USA), and 0.5 µl of Taq platinum (Invitrogen). Briefly, PCR conditions included an initial denaturing step at 95°C for 8 min, followed by 34 amplification cycles of 95°C for 40 s, 58°C for 45s and 72°C for 45 s. Final extension consisted of 72°C for 10 min.

PCR amplification was analyzed in an 8% polyacrylamide gel. Two individuals analyzed the results separately. The relative density of the two alleles in the digested samples was compared visually with those of the non-digested samples, as previously described¹⁷. Monoclonal cases were considered as those in which one of the alleles showed a complete loss or a significantly diminished density compared with its density in the non-digested counterpart. On the other hand, when the relative density of both alleles did not change significantly, the lesion was considered polyclonal.

Results

The gel electrophoresis showing amplification of the human androgen receptor gene (HUMARA) with and without *HhaI* digestion is shown in figure 1. Most of the giant cell lesions investigated presented a monoclonal pattern (six out of 11 cases). Three out of six PGCL and three out of five CGCL exhibited a monoclonal pattern (Table 1). No association was observed between clonality and aggressiveness of the lesion.

Discussion

It is widely known that most tumors have a monoclonal composition consistent with the somatic mutation theory of carcinogenesis, which postulates that a tumor results from the progeny of a single cell having acquired one or more somatic mutations¹⁶. Studies involving the clonal nature of lesions are very important, because clonality and mutation studies may help to create phylogenetic trees and gatekeeper mutations can be identified¹⁸.

Despite all the evidence of a clonal nature of most tumors, tumorigenesis is considered a dynamic spectrum of progression in genetic abnormalities and growth advantages. An important aspect to be considered in clonal mutation is at what stage in the life-history of the tumor it is examined¹⁰. It may evolve from an early polyclonal reactive stage into a monoclonal expansion. A tumor may be originated from several cells, the progeny of one of these cells eventually out-grow all the others^{1,22}. Another caveat relevant in clonal analysis is the size of clonal field in normal tissues. A bigger clonal field in normal tissue has more implications in claiming that a process arriving at this tissue is clonal¹⁰.

In the present study we found that six out of 11 samples of PGCL and CGCL were monoclonal, indicating that some giant cell lesions originate from one clone of altered cells. This data may initially suggest that these lesions have a neoplastic nature. However, the definition of a benign neoplasia is a more complex issue. Although reactive lesions are usually polyclonal and neoplastic lesions are monoclonal, there are examples of monoclonal reactive or developmental lesions. Activating mutations in the *GNAS1* gene in a clone of osteoblastic cells, after clonal expansion, lead to the development of fibrous dysplasia.²⁸ On this particular case, despite of the non-neoplastic behavior, a monoclonal pattern is observed¹¹. Therefore, clonality should be regarded as one but not the unique parameter for differentiation of a reactive lesion from a neoplastic process. The monoclonal pattern observed in CGCL indicates that these lesions may have a common genetic mechanism of development, which suggests that single forms of treatment may be effective. A recent study conducted by our research group showed that SH3BP2 gene pathway can be the underlying genetic alteration associated with CGCL pathogenesis.⁵

Some samples of PGCL and CGCL showed a polyclonal pattern. This finding could be due non-tumoral cells contamination which may cause false impression of polyclonality. Also, a polyclonal early stage of the disease cannot be ruled out.

In conclusion, our findings demonstrate that some giant cell lesions of the jaws are clonal. Further studies are necessary to better elucidate the molecular mechanisms involved in the pathogenesis of such 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. Dr. RS Gomez is research fellow of CNPq.

References

1. Alexander P. Do cancers arise from a single transformed cell or is monoclonality of tumours a late event in carcinogenesis? *Br J Cancer* 1985; 51: 453-457.
2. Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW, Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet* 1992; 51: 1229-1239.
3. 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.
4. Carinci F, Piattelli A, Martinelli M, Palmieri A, Rubini C, Fioroni M, Scapoli L, Laino G, Caputi S, Becchetti A, Pezzetti F. Genetic Profiling of Central Giant Cell Granuloma of the Jaws. *J Craniofac Surg* 2005; 16: 399-407.
5. Carvalho VM, Perdigão PF, Amaral FR, Souza PE, De Marco L, Gomez RS. Novel mutations in the SH3BP2 gene associated with sporadic central giant cell and cherubism. *Oral Dis* 2009; 15: 106-110.
6. Chen GL, Prchal JT. X-linked clonality testing: interpretation and limitations. *Blood* 2007; 110: 411-419.
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: 708-713.
8. 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* 2007; 104: 603-615.

9. de SOUZA PE, PAIM JF, CARVALHAIS JN. 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.
10. Fearon ER, Hamilton SR, Volgenstein B. Clonal analysis of human colorectal tumors. Science 1987; 238: 193-197.
11. Garcia SB, Park HS, Novelli M, Wright NA. Field cancerization, clonality and epithelial stem cells: the spread of mutated clones in epithelial sheets. J Pathol 1999; 187: 61-81.
12. Gong L, Zhang W, Su Q. Clonal status of fibrous dysplasia. Pathology 2008; 40: 392-395.
13. Holliday R. Ageing: X-chromosome reactivation. Nature 1987; 327: 661-662.
14. Horner K. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinico-radiological study. Clin Radiol 1989; 40: 622-626.
15. Itonaga I, Hussein I, Kudo O, Sabokbar A, Watt-Smith S, Ferguson D, Athanasou NA. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar in giant cell granuloma of the jaw. J oral Pathol Med 2003; 32: 224-231.
16. Katsikeris N, Kakarantza-Angelopoulou E, Angelopoulos. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. Int J Oral Maxillofac Surg 1988; 17: 94-99.
17. Knudson AG Jr. Hereditary cancer, oncogenes, and antioncogenes. Cancer Res 1985; 45: 1437-1443.
18. Lee PS, Sabbath-Solitare M, Redondo TC, Ongcapin EH. Molecular evidence that the stromal and epithelial cells in pleomorphic adenomas of salivary gland

arise from the same origin: clonal analysis using human androgen receptor gene (HUMARA) assay. Hum Pathol 2000; 31: 498-503.

19. Leedham S, Wright N. Human tumour clonality assessment-flawed but necessary. J Pathol 2008; 215: 351-354.

20. 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: 367-375.

21. Lyon, MF. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). Nature 1961; 190: 372-373.

22. Martin GR, Epstein CJ, Travis B, Tucker G, Yatziv S, Martin DW Jr, Clift S, Cohen S. X-chromosome inactivation during differentiation of female teratocarcinoma stem cells in vitro. Nature 1978; 271: 329-333.

23. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. Science 1976; 194: 23-28.

24. Riggs AD. X-inactivation, differentiation, and DNA methylation. Cytogenet Cell Genet 1975; 14: 9-25.

25. Schwartz HS, Eskew JD, Butler MG. Clonality studies in giant cell tumor of bone. J Orthop Res 2002; 20: 387-330.

26. Secker-Walker LM. The meaning of a clone. Cancer Genet Cytogenet 1985; 16: 187-188.

27. Vogrincic GS, O'Connell JX, Gilks CB. Giant Cell Tumor of Tendon Sheath Is a Polyclonal Cellular Proliferation. Hum Pathol 1997; 28: 815-819.

28.Wainscoat JS, Fey MF. Assessment of clonality in human tumors: a review.

Cancer Res 1990: 50: 1355-1360.

29.Weinstein LS, Shenker A, Gejman PV, Merino MJ, Friedman E, Spiegel AM.

Activating mutations of the stimulatory G protein in the McCune-Albright syndrome. N Engl J Med 1991: 325: 1688 – 1695.

Table 1- Clinical data and results

Diagnosis	Age	Location	Agressivness	Clonality
PGCL				
1	08	Maxilla	-	Monoclonal
2	22	Maxilla	-	Monoclonal
3	15	Mandible	-	Polyclonal
4	50	Maxilla	-	Monoclonal
5	24	Mandible	-	Polyclonal
6	52	Maxilla	-	Polyclonal
CGCL				
1	12	Mandible	No	Monoclonal
2	41	Mandible	No	Monoclonal
3	26	Mandible	Yes	Polyclonal
4	25	Mandible	Yes	Polyclonal
5	23	Mandible	Yes	Monoclonal

PGCL= peripheral giant cell lesion; CGCL= central giant cell lesion

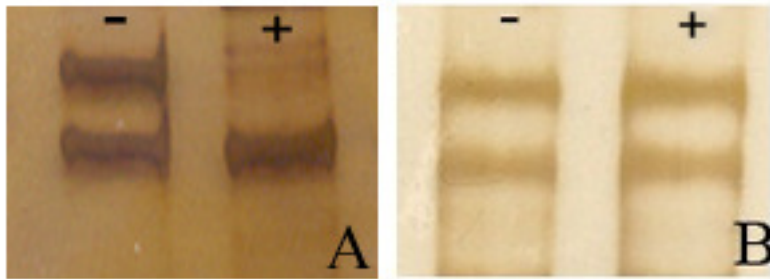


Figure 1- Gel electrophoresis showing amplification of the human androgen receptor gene (HUMARA). A: Amplification without (-) and with (+) the *HhaI* digestion. It can be observed a significant loss of the short allele, representing a monoclonal pattern. B: Amplification without (-) and with (+) the *HhaI* digestion. It can be observed amplification of two alleles representing a polyclonal pattern.

ANEXO C – Artigo aceito no Journal of Oral Pathology and Medicine

28-Sep-2009

Dear Prof. Ricardo Gomez,

It is a pleasure to accept your manuscript entitled "NFATc1 and TNF α expression in giant cell lesions of the jaws" in its current form for publication in the Journal of Oral Pathology and Medicine.

Thank you for your fine contribution. We look forward to your continued contributions to the Journal.

The manuscript now becomes the copyright of the Journal. In accordance with accepted practice, the research findings reported in this paper must not appear in another publication before its publication in this Journal.

As part of the Journal's continued commitment to its authors, the publisher wish to keep you informed about what will happen next and, as the attached paper contains information regarding journal publication and services for authors, you may wish to save it for future reference.

We would like to draw your attention to the fact that articles exceeding 6 printed pages will be charged to the author at a rate of US\$163 per page. When you receive the printed proofs you will then have the opportunity to reduce the length of the text if the extra page charge poses a problem.

Sincerely,

Prof. Erik Dabelsteen

Editor-in-Chief, Journal of Oral Pathology and Medicine.

NFATc1 and TNF α expression in giant cell lesions of the jaws

Fabício Rezende Amaral¹; João Artur Ricieri Brito¹; Paôlla Freitas Perdigão¹; Vinícius Magalhães Carvalho¹; Paulo Eduardo Alencar de Souza²; Marcus Vinícius Gomez³; Luiz De Marco³; Ricardo Santiago Gomez^{1*}

¹ Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais

² School of Dentistry, Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³ Department of Pharmacology, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.

*Corresponding author: Dr. Ricardo S. Gomez, Laboratório de Biologia Molecular, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Avenida Antônio Carlos 6627, CEP 31.270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil. Tel: 55 31 3409 2477

e-mail address: rsgomez@ufmg.br

Keywords: giant cell lesion, NFATc1, TNF- α , osteoclastogenesis, SH3BP2

ABSTRACT

BACKGROUND: Activation mutations of *SH3BP2* gene have been demonstrated in cherubism and central giant cell lesion (CGCL). In the present study we first attempted to investigate the *SH3BP2* gene in peripheral giant cell lesion (PGCL). The effect of *SH3BP2* gene mutations on the transcription of the downstream genes nuclear factor of activated T-cells (NFATc1) and the cytokine tumor necrosis factor- α (TNF- α) was also investigated together with the immunolocalization of NFATc1 protein in a set of cases of PGCL, CGCL and cherubism with and without *SH3BP2* mutation.

METHOD: Fresh samples of five PGCL, five CGCL, and one cherubism cases were included in this study. One of the samples of CGCL presented a somatic heterozygous mutation c.1442A>T in exon 11. The cherubism case showed a heterozygotic substitution c.320C>T in both blood and lesion. These mutations were previously published. All coding and flanking regions of the *SH3BP2* gene were sequenced in the cases of PGCL. The real-time PCR was performed to analyze the transcription of *NFATc1* and *TNF- α* genes. The immunohistochemical analysis of the NFATc1 protein was also performed.

RESULTS: No *SH3BP2* gene mutation was found in PGCL. The real time PCR showed increased expression of NFATc1 and decreased transcription of TNF- α in all the samples. The immunohistochemical analysis of the NFATc1 protein showed a predominant nuclear staining in the multinucleated giant cells.

CONCLUSION: The development of giant cells lesions of the jaws and cherubism are possibly mediated by overexpression of NFAT in the nucleus of the multinucleated cells.

Introduction

Peripheral giant cell lesion (PGCL) is a reactive lesion usually related to local irritating factors in gingiva (1). Central giant cell lesion (CGCL) is an intra-osseous lesion of unknown etiology (2). It occurs mainly in the mandible and the age of most patients ranges from 10 to 25 years (3). Radiographic findings are diverse, ranging from small unilocular lesions to large multilocular lesions with displacement of teeth, root resorption, and cortical perforation (4). Histologically, PGCL and CGCL are characterized by the presence of multinucleated osteoclast-like giant cells in a background of oval to spindle-shaped mononuclear cells (5, 6).

Cherubism is an autosomal-dominant genetic disease that affects the jaws (7). The disease is characterized by bilateral expansion of the maxilla and/or mandible, usually detected in early childhood, and shows progressive growth until puberty (8). Despite the presence of perivascular cuffing, the histological features are indistinguishable from those of CGCL (9).

The gene mutated in cherubism has been mapped to 4p16.3 (10). This gene encodes an adaptor protein with an N-terminal pleckstrin homology, a SH3 binding domain and a C-terminal SH2 domain (11). Missense mutations were demonstrated in the *SH3BP2* gene mainly clustered in exon 9 that encodes a proline-rich region of the protein (12, 13). Although previous studies have not shown mutations in exon 9 of the *SH3BP2* gene in CGCL and PGCL (14,15,16), our research group recently found a somatic mutation in a case of CGCL after sequencing all coding regions of the gene (17). SH3BP2 activates the isoform c1 of the NFAT, a master transcription factor that induces osteoclastogenesis (18, 19). Cherubism mutation also activates mouse *SH3BP2*

resulting in enhanced production of the cytokine TNF- α by myeloid cells, leading to bone loss and inflammation (20, 21). As we recently found a mutation of the *SH3BP2* gene in a case of CGCL, in the present study we first attempted to investigate this gene in PGCL. Despite of the importance of NFATc1 and TNF- α in the *SH3BP2* pathway, the effect of *SH3BP2* mutation on the transcription of these genes have not been studied until now. Therefore, we also investigated the transcription of these downstream genes together with the immunolocalization of the NFATc1 protein in a set of cases of PGCL, CGCL and cherubism with and without *SH3BP2* mutation.

Material and methods

Human Tissue

Fresh samples of five PGCL, five CGCL, and one cherubism cases were included in this study. The *SH3BP2* gene sequencing of the CGCL samples and cherubism were described elsewhere (17). One of the samples of CGCL presented a somatic heterozygous mutation c.1442A>T in exon 11, leading to an exchange of amino acid Glutamine to Leucine in the C-terminal SH2 domain. The cherubism case showed a heterozygotic substitution of cytosine to thymine c.320C>T in both blood and lesion. This mutation leads to an exchange of the amino acid Threonine to Methionine in the N-terminal pleckstrin domain and was previously published (17).

All samples were collected at the time of surgery. A section of the lesion was immediately snap frozen and stored at -80°C. The other part was subjected to histopathological diagnostic procedures. Peripheral blood (4 ml) of three healthy subjects was used as control. The blood was collected in a tube with anticoagulant

(EDTA) and stored at -70°C until processing. The present study was approved by the local Ethics Committee and a signed informed consent was obtained from all patients as well as healthy volunteers.

DNA sequencing

Genomic DNA analysis was performed in four out of the five cases of PGCL. All coding and flanking regions of the *SH3BP2* gene were investigated using previously described PCR primers and reaction conditions (22, 23). Briefly, PCR reactions were performed in a final volume of 25 µl containing 200 ng of template DNA, 200 µmol/l dNTPs, 10 pmol/L 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 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 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 Big Dye terminator kit in a DNA ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). All the 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*.

RNA extraction, reverse transcription and Real-Time PCR quantification

Total RNA was extracted using Trizol Reagent (Invitrogen Life Technologies), according to the manufacturer's protocol. The RNA was prepared from 25 mg of human frozen samples and treated with DNase (Invitrogen Life Technologies). For reverse transcription, Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen Life Technologies) was used and the single strand cDNA was employed for PCR.

Real-time PCR was performed using an Applied Biosystems Step One (Applied Biosystems) (24). The 20 μ l PCR included 2 μ l RT product, 10 μ l TaqMan Universal PCR master mix, 1 μ l of primers and probe mix of the Taq-Man NFATc1 and TNF α Assay protocol (PE Applied Biosystems, Hs 00174128_m1 and Hs00542678_m1) and 7 μ l H₂O. The reactions were incubated in a 48-well optical plate at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15s and 60° for 1 min. All reactions were run in triplicate. The threshold cycle (Ct) is defined as the fractional cycle number at which the fluorescence passes the fixed threshold.

Relative quantification of cDNA expression was calculated with the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Applied Biosystems User Bulletin N°2 (P/N 4303859)). The data were presented as log₁₀ of relative quantity (RQ) of target cDNA. Transcripts of beta-actin were quantified and used as endogenous control. All samples were normalized on the basis of its beta-actin content. As calibrator, a pool of blood samples was used.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded tissue sections were incubated with NFATc1 antiserum (diluted 1:50, Clone 7A6, Santa Cruz® Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA).

Immunohistochemical stain was performed using the high sensitive polymer-based system (EnVision, Dako[®] Corporation, Carpinteria, CA, USA) with diaminobenzidine substrate solution as chromogen (Sigma, St Louis, MO, USA). The sections were counterstained with hematoxylin.

Results

DNA sequencing

No mutation was observed after sequencing all 13 exons of the *SH3BP2* gene in PGCL cases. Three cases presented a polymorphism c.300T>C in exon 4 without leading aminoacid change.

Real time PCR

The total RNA input ranged from 6,25 ng to 100 ng. The result showed that the method could detect the NFATc1 and TNF- α as few as 50 ng or 100 ng of total RNA (Fig. 1 and 2). As the amount of cDNA was decreased, the amplification started later, giving higher CT (threshold cycle) for NFATc1 (Fig. 1) as well as for TNF- α (Fig. 2). It was used the dilution of 100 ng for all experiment to obtain a good balance between cDNA economy and an assay of good quality. For the NFATc1, the slope value was -3, 28 and R^2 was 0,985. The TNF- α experiments showed a slope value of -3, 28 and R^2 of 0,957. The endogenous control (β -actin) showed similar values (slope= -3, 20 and R^2 = 0,981).

All the cases of PGCL, CGCL and cherubism presented a high expression of NFATc1 when compared to calibrator sample (Fig. 3 and Fig. 4). On the other hand

TNF- α expression was reduced in most of the samples when compared to calibrator sample (Fig. 3 and Fig. 4).

Immunohistochemistry

All the lesions showed a predominant nuclear positive staining in the multinucleated giant cells (Fig. 5).

Discussion

The PGCL, CGCL and cherubism share similar histological features and multinucleated giant cells found in these lesions present ultrastructural characteristics of osteoclasts (5, 6). Osteoclasts are cells derived from bone marrow and require activation of extracellular receptors during its differentiation (25). The main binders in this activation are RANK-L (receptor activator of NF- κ B ligant) and M-CSF (macrophage colony stimulating factor) (26). M-CSF is important for the proliferation and survival of the osteoclast precursors (27). RANK-L stimulates SH3BP2 which regulates the formation of a complex containing other proteins as Src family Kinase (SFK), SYK, PLC γ 2 and VAV (28). This complex promotes increased levels of intracellular calcium which is important for NFATc1 upregulation and translocation into the nucleus. (21,19). NFATc1 is a master of transcription in terminal differentiation of osteoclasts (29,19). SH3BP2 also increases the levels of TNF- α through the activation of MAPK-ERK pathways and leads to both bone loss and inflammation (20, 21).

Cherubism usually shows missence mutations in the *SH3BP2* gene mainly clustered in exon 9 that encodes a proline-rich region of the protein (12, 13). Our research group recently found a somatic mutation in a case of CGCL after sequencing

all coding regions of the gene (17). In the present study none of the PGCL cases showed alteration of the *SH3BP2* gene.

In the current study all the giant cell lesions studied (PGCL, CGLC and cherubism) presented increased transcription of NFATc1 compared to mononuclear circulating blood cells. On the other hand, TNF- α transcription was downregulated. Despite the fact that SH3BP2 has the potential effect of activating both NFATc1 and TNF- α , we demonstrate that only the former is upregulated in the giant cell lesions of the jaws.

Upregulation of NFATc1 in bone marrow cells occurs during osteoclast differentiation. This differentiation can be divided into three stages. First, after RANKL stimulation, NFATc1 is induced. Second, NFATc1 binds its own promoter and this cause autoamplification. Finally a number of osteoclast specific genes such as *cathepsin K*, *TRAP*, *calcitonin receptor*, *$\beta 3$ integrin* and *OSCAR* are activated by a complex containing NFATc1 (26, 29). Overexpression of NFATc1 also increases osteoclasts fusion (30). In the present study we observed positive staining for NFATc1 protein in the nucleus of the multinucleated giant cells. The increased transcription of NFATc1 together with the presence of the protein mainly in the nucleus of the multinucleated cells suggests that NFATc1 may be relevant for the formation of the osteoclastic cells in giant cell lesions. Although further studies are necessary to verify the impact of NFAT inhibition on the progression of giant cell lesions, the possibility of an epiphenomenon cannot be excluded. The modulation of this pathway can be a potential target on future molecular therapy.

Among the samples included in the present investigation, one CGCL presented a heterozygous mutation in exon 11, leading to an exchange of amino acid Glutamine to

Leucine in the C-terminal SH2 domain. The cherubism case presented a heterozygotic substitution in exon 4. This mutation leads to an exchange of the amino acid Threonine to Methionine in the N- terminal pleckstrin domain. In both cases we found increased transcription of NFATc1 together with downregulation of TNF. However, we also observed the same results in the lesions with the wild type *SH3BP2* gene, which suggests that other genetic or epigenetic alterations of different genes involved on this pathway could have the same effect of *SH3BP2* mutation. The hypothesis that these mutations do not play any role in generating the giant cell phenotype also needs be considered. In conclusion, the development of giant cells lesions of the jaws and cherubism are possibly mediated by overexpression of NFAT in the nucleus of the multinucleated cells.

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. Dr. MV Gomez, L De Marco and RS Gomez are research fellows of CNPq. We thank Daniele Ramalho da Silva for technical assistance.

References

1. 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* 1998 ; 17:94-9.
2. Carinci F, Piattelli A, Martinelli M, et al. Genetic Profiling of Central Giant Cell Granuloma of the Jaws. *J Craniofac Surg* 2005; 16:399-407.
3. 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* 2007; 104:603-15.
4. Horner K. Central giant cell granuloma of the jaws: a clinico- radiological study. *Clin Radiol* 1989; 40:622-6.
5. Itonaga I, Hussein I, Kudo O, et al. Cellular mechanisms of osteoclast formation and lacunar in giant cell granuloma of the jaw. *J Oral Pathol Med* 2003; 32:224-31.
6. 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; 32:367-75.
7. 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; 90:765-72.
8. Hyckel P, Berndt A, Schleier P, et al. Cherubism - new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. *J Craniomaxillofac Surg* 2005; 33:61-8.

9. Kaugars GE, Niamtu J 3rd, Svirsky JA. Cherubism: diagnosis, treatment, and comparison with central giant cell granulomas and giant cell tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992; 73:369-74.
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. Ren R, Mayer BJ, Cichetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science* 1993; 259:1157-61.
12. Ueki Y, Tiziani V, Santanna C, et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet* 2001; 28:125-6.
13. 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* 2007; 103:378-81.
14. 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; 46:229-30.
15. de Lange J, van Maarle MC, van den Akker HP, Redeker EJW. DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2007; 45:499-500.
16. Lietman SA, Prescott NL, Hicks DG, Westra WH, Levine MA. SH3BP2 is rarely mutated in exon 9 in giant cell lesion outside cherubism. *Clin Orthop Relat Res* 2007; 459:22-7.

17. Carvalho VM, Perdigão PF, Amaral FR, Souza PE, De Marco L, Gomez RS. Novel mutations in the *SH3BP2* gene associated with sporadic central giant cell and cherubism. *Oral Dis* 2009; 15:106-10.
18. 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: 717-8.
19. Lietman SA, Yin L, Levine MA. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 371: 644-8.
20. Novack D, Faccio R. Jawing about TNF: New hope for cherubism. *Cell* 2007; 128:15-7.
21. Ueki Y, Lin CI, Senoo M, et al. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell* 2007; 128:71-83.
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. Imai Y, Kanno K, Moriya T, et al. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p 16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Craniofac J* 2003; 40:632-38.
24. Hounoki H, Sugiyama E, Mohamed SG, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits TNF-alpha-mediated osteoclast differentiation in human peripheral monocytes in part via suppression of monocyte chemoattractant protein-1 expression. *Bone* 2008; 42:765-74.

25. Takayanagi H. Mechanism insight into osteoclast differentiation in osteoimmunology. *J Mol Med* 2005; 83: 170–9.
26. Asagiri M, Takayanagi H. The molecular understanding osteoclast differentiation. *Bone* 2007; 40:251-64.
27. Kitaura H, Zhou P, Kim HJ, Novack DV, Ross FP, Teitelbaum SL. M-CSF mediates TNF-induced inflammatory osteolysis. *J Clin Invest* 2005; 115: 3418-27.
28. Foucalt I, Le Bras S, Charvet C, Moon C, Altman A, Deckert M. The adaptor protein 3BP2 associates with VAV guanine nucleotide exchange factors to regulate NFAT activation by the B-cell antigen receptor. *Blood* 2005; 105:1106-13.
29. Takayanagi H. The Role of NFAT in Osteoclast Formation. *Ann N Y Acad Sci* 2007; 1116:227-37.
30. Kim K, Lee SH, Ha Kim J, Choi Y, Kim N. NFATc1 induces osteoclast fusion via up-regulation of Atp6v0d2 and the dendritic cell-specific transmembrane protein (DC-STAMP). *Mol Endocrinol* 2008; 22:176-85.

Figures Legends

Fig. 1: Total cDNA sensitivity and dynamic range of NFATc1 gene assay. A: Amplification plot of total RNA from blood sample at five orders of magnitude. The total RNA input ranged from 6,25 ng to 100 ng in per RT-PCR reaction; B: Correlation of total RNA input with the threshold of cycle (Ct) values for NFATc1 gene assays.

Fig. 2: Total cDNA sensitivity and dynamic range of TNF- α gene assay. A: Amplification plot of total RNA from blood sample at five orders of magnitude. The total RNA input ranged from 6,25 ng to 100 ng in per RT-PCR reaction; B: Correlation of total RNA input with the threshold of cycle (Ct) values for TNF- α gene assays.

Fig 3: Real-time PCR analysis of NFATc1 and TNF- α in peripheral giant cell lesion (1-5). The figure shows a high expression of NFATc1 together with low transcription of TNF- α in most of the samples.

Fig. 4: Real-time PCR analysis of NFATc1 and TNF- α in central giant cell lesion. The figure shows a high expression of NFATc1 and low transcription of TNF- α in all samples (case # 1-5). The cherubism sample presented the same pattern (case # 6).

Fig. 5: Immunohistochemical staining for NFATc1 protein. Positive nuclear staining observed mainly in the multinucleated cells (original magnification x 400).

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](#)