

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Leticia Martins Guimarães

**ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DOS GRANULOMAS
ESPORÁDICOS DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES, DO QUERUBISMO
E DE SEUS MIMETIZADORES HISTOLÓGICOS**

Belo Horizonte

2024

Letícia Martins Guimarães

**ESTUDO DO PERFIL DE METILAÇÃO DO DNA DOS GRANULOMAS
ESPORÁDICOS DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES, DO QUERUBISMO
E DE SEUS MIMETIZADORES HISTOLÓGICOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Patologia.

Linha de pesquisa: Patologia Oncológica

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes
Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte

2024

043

Guimarães, Leticia Martins.

Estudo do perfil de metilação do DNA dos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares, do querubismo e de seus mimetizadores histológicos [manuscrito] / Leticia Martins Guimarães. – 2024.

85 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes. Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia Molecular. 2. Epigenômica. 3. Metilação de DNA. 4. Genética. 5. Granuloma de Células Gigantes. 6. Querubismo. 7. Condrioblastoma. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Gomez, Ricardo Santiago. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 487 DE LETÍCIA MARTINS GUIMARÃES

Realizou-se, às 14 horas do dia 29 de julho de 2024, no formato híbrido, Bloco G, 4º andar, Sala 93, Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Tese, intitulada *"Estudo do Perfil de Metilação do DNA dos Granulomas Esporádicos de Células Gigantes dos Maxilares, do Querubismo e de Seus Mimetizadores Histológicos"*, apresentada por *Letícia Martins Guimarães*, número de registro 2020715150, graduada no curso de Odontologia, e como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: *Prof. Dr. Felipe D'Almeida Costa*, A. C. Camargo Cancer Center; *Prof. Dr. Fabrício Passador-Santos*, Faculdade São Leopoldo Mandic Campinas; *Prof. Dr. Geraldo Brasileiro Filho*, Faculdade de Medicina/UFMG; *Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz*, ICB/UFMG; *Profa. Dra. Carolina Cavalieri Gomes*, ICB/UFMG – ORIENTADORA.

A Comissão considerou a Tese:

APROVADA

REPROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavalieri Gomes**, Professora do **Magistério Superior**, em 30/07/2024, às 14:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício Passador Santos**, Usuário Externo, em 31/07/2024, às 13:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz**, Professora do **Magistério Superior**, em 31/07/2024, às 15:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Brasileiro Filho**, Professor do **Magistério Superior**, em 01/08/2024, às 09:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe D'Almeida Costa**, Usuário Externo, em 05/08/2024, às 13:37, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).

A autenticidade deste documento pode ser conferida no site



https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 3411380 e o código CRC 72949790.

Aos meus pais Marcos e Rosário por serem meu porto seguro, fontes de inspiração e exemplos de coragem rumo à docência.

AGRADECIMENTOS

Deixo os meus sinceros agradecimentos

A Deus, por ter guiado os meus passos, ter sido conforto, proteção e refúgio.

Aos meus pais Marcos e Rosário pelo amor e apoio incondicionais a cada plano traçado e a cada passo dado e por celebrarem com entusiasmo cada vitória alcançada.

A minha irmã Leísa pelo carinho diário e por ser inspiração de otimismo, leveza e confiança.

A minha sobrinha Manuela pelo amor puro e sincero, por ser luz, alegria e motivação.

Aos meus tios e padrinhos Paulo e Cássia por serem lar, carinho, acolhimento e proteção.

As minhas queridas avós Eliza (*in memoriam*) e Creusa pelas orações, por serem aconchego e exemplos de dedicação e fé.

Aos demais familiares por serem amigos, serem abrigo, serem torcida e proporcionarem diversão.

A minha orientadora Carolina Gomes pelo companheirismo desde o início dessa jornada, por nunca medir esforços para me ver crescer e progredir e pelo incentivo valioso a cada passo dado.

Ao meu coorientador Ricardo Gomez por compartilhar tamanho conhecimento e por ser inspiração profissional.

Ao professor Andreas von Deimling do Departamento de Neuropatologia, do Instituto de Patologia do Hospital Universitário de Heidelberg, em Heidelberg, na Alemanha, por ter aceitado a parceria na construção deste projeto de pesquisa e por ter sido crucial para as etapas experimentais do mesmo.

A professora Nada Jabado pela oportunidade de trabalho em seu laboratório na McGill University no Canadá durante o doutorado sanduíche e por ter possibilitado esta que foi uma experiência enriquecedora e inigualável a nível profissional e pessoal.

A Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa pela qual fui assistida ao longo do curso no Brasil e ao programa CAPES PrInt (Processo: 88887.682969/2022-00) por ter possibilitado e custeado o período de doutorado sanduíche na McGill University, no Canadá.

Aos professores Wagner Henriques de Castro e Júlio César Tanos de Lacerda por gentilmente disponibilizarem imagens clínicas para ilustração da tese.

Ao Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG) pelo serviço de digitalização das lâminas histológicas utilizadas para ilustração da tese.

Aos colegas de laboratório do Brasil e do Canadá pela amizade, parceria e por trazerem leveza a alegria ao dia-a-dia.

A banca por aceitar o convite e se disponibilizar a contribuir na construção deste trabalho de tese.

Aos amigos de infância, do ensino médio, da graduação e da pós-graduação pelo apoio, paciência e amizade.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) por ter sido casa e base da minha qualificação profissional.

Por fim, agradeço a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e também o Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

“Somewhere, something incredible is waiting to be known”

Carl Sagan

RESUMO

Os granulomas de células gigantes dos ossos maxilares mais comumente ocorrem como lesões esporádicas únicas, podendo ser centrais ou periféricas. Eles são caracterizados por mutações somáticas nos genes *KRAS*, *FGFR1* ou *TRPV4*, sendo as últimas exclusivas da lesão central. Menos comumente, os granulomas de células gigantes podem ser múltiplos e estar associados ao querubismo, doença óssea de herança autossômica dominante. O diagnóstico diferencial entre eles baseado apenas na microscopia pode ser desafiador. Essas lesões dos ossos maxilares compartilham características histopatológicas com outras lesões ricas em células gigantes, como o fibroma não-ossificante, o cisto ósseo aneurismático, o tumor de células gigantes dos ossos longos e o condroblastoma. A análise do perfil de metilação do DNA é útil para o diagnóstico de outros tumores, incluindo tumores cerebrais pediátricos e sarcomas. No entanto, as bases epigenéticas dos tumores ricas em células gigantes permanecem incertas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o perfil de metilação do DNA de granulomas de células gigantes dos maxilares e das lesões do querubismo para testar se os padrões de metilação do DNA poderiam auxiliar na distinção entre essas entidades. Além disso, os seus perfis de metilação do DNA foram comparados aos dos seus mimetizadores histológicos ricos em células gigantes para investigar se as semelhanças microscópicas se estenderiam ao nível epigenético. A análise da metilação do DNA foi realizada para os granulomas esporádicos de células gigantes centrais (n=10) e periféricos (n=10), querubismo (n=6), fibroma não-ossificante (n=10), cisto ósseo aneurismático (n=16), tumor de células gigantes dos ossos longos (n=9) e condroblastoma (n=10) utilizando a plataforma Infinium Human Methylation EPIC BeadChip. Adicionalmente, a partir dos dados de metilação do DNA, análise de variação do número de cópias de segmentos cromossômicos foi realizada. Os granulomas centrais e periféricos e o querubismo compartilharam padrão de metilação do DNA semelhante, com os granulomas periféricos e o querubismo tendendo a uma discreta distinção, enquanto os granulomas centrais se sobrepuseram a ambos os grupos. Os valores de metilação global e associados a *enhancer* mostraram um padrão de distribuição similar entre os grupos, com o querubismo mostrando o valor mediano da média dos valores β de metilação mais baixo e o granuloma periférico de células gigantes apresentando o valor mais alto. Por outro lado, o padrão de distribuição da metilação nas regiões promotoras mostrou-se diferente, com o querubismo apresentando o valor mediano mais alto quando comparando aos granulomas esporádicos de células gigantes. Nenhuma das amostras incluídas no estudo exibiu um padrão consistente em relação a ganhos ou perdas de braços ou segmentos cromossômicos. Conclui-se que o perfil de metilação do DNA não é capaz de distinguir claramente os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e as lesões do querubismo. Por outro lado, a análise é capaz de discriminar os granulomas esporádicos dos seus mimetizadores histológicos.

Palavras-chave: Epigenética. Metilação do DNA. Metiloma. Genética. Patologia molecular. Células gigantes. Granuloma de células gigantes. Querubismo. Tumor de células gigantes dos ossos longos. Condroblastoma.

ABSTRACT

DNA methylation profiling of sporadic giant cell granulomas of the jaws, cherubism, and their histological mimics

Giant cell granulomas of the jaws often occur sporadically as single central or peripheral lesions. They are characterized by *KRAS*, *FGFR1*, or *TRPV4* somatic mutations, being the latter exclusive of the central lesions. Less commonly, they may be multiple and associated with cherubism, an autosomal dominant bone disease. The diagnosis based on microscopy alone can be challenging. These jaw lesions share histopathological features with other giant cell-rich lesions: non-ossifying fibroma of bone, aneurysmal bone cyst, giant cell tumor of bone, and chondroblastoma. The epigenetic basis of these giant cell-rich tumors is unclear and recently DNA methylation profile has been shown to be clinically useful for the diagnosis of other tumor types, including pediatric brain tumors as well as sarcomas. Therefore, we aimed at assessing the DNA methylation profile of central and peripheral sporadic giant cell granulomas of the jaws and cherubism to test if DNA methylation patterns can help distinguish these entities. Additionally, we further compared their DNA methylation profile with those of their giant cell-rich mimics to investigate if the microscopic similarities extend to the epigenetic level. DNA methylation analysis was performed for central (n = 10) and peripheral (n = 10) giant cell granulomas, cherubism (n = 6), non-ossifying fibroma (n = 10), aneurysmal bone cyst (n = 16), giant cell tumor of bone (n = 9), and chondroblastoma (n = 10) using the Infinium Human Methylation EPIC BeadChip. Furthermore, based on the DNA methylation data, copy number analysis was conducted. Central and peripheral sporadic giant cell granulomas and cherubism share a related DNA methylation pattern, with those of peripheral granulomas and cherubism appearing slightly distinct while central granuloma shows overlap with both of the former. The global and enhancer-associated DNA methylation values showed a similar distribution pattern among the groups, with cherubism showing the lowest median value of the mean methylation β -values and peripheral giant cell granuloma showing the highest value. In contrast, promoter regions showed a different methylation distribution pattern, with cherubism showing the highest median value compared to sporadic giant cell granulomas. None of the samples included in the study exhibited a consistent pattern regarding gains or losses of chromosomal arms or segments. In conclusion, DNA methylation profiling is currently not capable of clearly distinguishing sporadic and cherubism-associated giant cell granulomas of the jaws. Conversely, it could discriminate sporadic giant cell granulomas of the jaws from their giant cell-rich mimics.

Keywords: Epigenetics. DNA methylation. Methylome. Genetics. Molecular pathology. Giant cells. Giant cell granulomas. Cherubism. Giant cell tumor of bone. Chondroblastoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Granuloma central de células gigantes dos maxilares.....	21
Figura 2 - Granuloma periférico de células gigantes dos maxilares.....	21
Figura 3 - Aspectos clínico-radiográficos do querubismo.....	26
Figura 4 - Características histopatológicas do querubismo.....	26
Figura 5 - Mecanismos epigenéticos de metilação do DNA e modificação de histonas.....	36
Figura 6 - Análises não-supervisionadas do perfil de metilação do DNA do granuloma central de células gigantes dos maxilares, granuloma periférico de células gigantes dos maxilares, querubismo e seus mimetizadores histológicos.....	49
Figura 7 - Método de redução de dimensionalidade <i>t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding</i> (t-SNE).....	50
Figura 8 - Comparação dos níveis de metilação do DNA global e em regiões funcionais entre amostras de querubismo e granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares.....	51
Figura 9 - <i>Volcano plots</i> mostrando sítios CpG diferencialmente metilados entre granuloma central de células gigantes dos maxilares (GCCG) versus querubismo, granuloma periférico de células gigantes dos maxilares (GPCG) versus querubismo e GCCG versus GPCG.....	52
Figura 10 - Alterações genéticas dos tumores ricos em células gigantes agrupados com base em seus padrões de metilação de DNA.....	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Mutações genéticas descritas nas lesões ricas em células gigantes incluídas no estudo.....	34
Tabela 2 - Dados clínicos e moleculares dos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos e do querubismo.....	46
Tabela 3 - Informações clínicas dos tumores ricos em células gigantes incluídos para comparação.....	47

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

C.C.G.	Carolina Cavaliéri Gomes
CD68	Cluster of differentiation 68
<i>CDH11</i>	cadherin 11
<i>CNBP</i>	CCHC-type zinc finger nucleic acid binding protein
CNVs	Copy-number variations
<i>COL1A1</i>	collagen type I alpha 1 chain
<i>CTNNB1</i>	catenin beta 1
DMPs	Differentially methylated positions
DNA	Deoxyribonucleic acid
DNMTs	DNA metiltransferases
<i>Dnmt3a</i>	DNA methyltransferase 3 alpha
<i>EIF1</i>	eukaryotic translation initiation factor 1
ER α	Estrogen receptor alpha
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FDR	False discovery rate
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
<i>FGFR1</i>	fibroblast growth factor receptor 1
FISH	fluorescence in situ hybridization
<i>FOSL2</i>	FOS like 2, AP-1 transcription factor subunit
gDNA	genomic deoxyribonucleic acid
GO	Gene Ontology
GCCG	Granuloma central de células gigantes
GPCG	Granuloma periférico de células gigantes
<i>H3-3A</i>	H3.3 histone A
<i>H3-3B</i>	H3.3 histone B
H&E	Hematoxilina e eosina
<i>KRAS</i>	KRAS proto-oncogene, GTPase
MAD	Median absolute deviation
MAPK/ERK	mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases
MBD	Methyl-CpG-binding domain proteins
MeCP2	Methyl-CpG-binding protein 2
<i>NF1</i>	Neurofibromin 1

NFATc1	Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1
NGS	next generation sequencing
<i>OGFRL1</i>	opioid growth factor receptor like 1
<i>OMD</i>	Osteomodulin
OMS	Organização Mundial de Saúde
<i>PAFAH1B1</i>	platelet activating factor acetylhydrolase 1b regulatory subunit 1
QC	Quality control
R.S.G.	Ricardo Santiago Gomez
RANKL	Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand
RANK	Receptor activator of nuclear factor-Kb
RNA	Ribonucleic acid
<i>RUNX2</i>	RUNX family transcription factor 2
<i>SEC31A</i>	SEC31 homolog A, COPII coat complex component
<i>SH3BP2</i>	SH3 domain binding protein 2
<i>SPARC</i>	secreted protein acidic and cysteine rich
SRC	Src family kinases
<i>STAT3</i>	signal transducer and activator of transcription 3
SYK	Tyrosine-protein kinase SYK
TET	Methylcytosine dioxygenase proteins
<i>THRAP3</i>	hyroid hormone receptor associated protein 3
<i>TNKS</i>	tankyrase
TRAP	Tartrate-resistant acid phosphatase
<i>TRAP150</i>	símbolo anterior do gene <i>THRAP3</i>
<i>TRPV4</i>	transient receptor potential cation channel subfamily V member 4
t-SNE	t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding
UMAP	Uniform manifold approximation and projection
<i>USP6</i>	ubiquitin specific peptidase 6
<i>USP9X</i>	ubiquitin specific peptidase 9 X-linked
VAV	Vav family proteins
WGBS	Whole-genome bisulphite sequencing
<i>ZNF9</i>	símbolo anterior no gene <i>CNBP</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 Granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares	20
2.2 Querubismo	24
2.3 Mimetizadores histológicos dos granulomas de células gigantes dos maxilares e querubismo utilizadas para comparação no presente estudo	29
2.3.1 <i>Fibroma não-ossificante</i>	29
2.3.2 <i>Cisto ósseo aneurismático</i>	30
2.3.3 <i>Tumor de células gigantes dos ossos longos</i>	31
2.3.4 <i>Condroblastoma</i>	33
2.4 Epigenética e metilação do DNA	34
3 OBJETIVOS	41
4 METODOLOGIA	42
4.1 Aspectos éticos	42
4.2 Seleção e inclusão das amostras	42
4.3 Extração do DNA e conversão pelo bissulfito.....	43
4.4 Análise do perfil de metilação do DNA	44
4.4.1 <i>Análise não supervisionada</i>	44
4.4.2 <i>Metilação diferencial de sítios CpG e análise de enriquecimento do Gene Ontology (GO)</i>	45
5 RESULTADOS	46
5.1 Caracterização da amostra	46
5.2 Perfil de metilação do DNA	48
5.3 Metilação diferencial de sítios CpG e análise de enriquecimento do <i>Gene Ontology (GO)</i>	50
5.4 Análise de variações do número de cópias.....	52
6 DISCUSSÃO	53
7 CONCLUSÃO	59
REFERÊNCIAS	60
APÊNDICE A – Artigo científico publicado no periódico <i>The Journal of Pathology Clinical Research</i>	70
APÊNDICE B – Atividades adicionais desenvolvidas durante o doutorado	71

APÊNDICE C – Artigo científico publicado no periódico <i>Modern Pathology</i> com dados obtidos durante o período de doutorado sanduíche	83
---	----

1 INTRODUÇÃO

Os granulomas de células gigantes dos maxilares frequentemente ocorrem como lesões esporádicas localizadas, que podem ser centrais ou periféricas (SCHREUDER *et al.*, 2021). Menos frequentemente, eles afetam os ossos maxilares como lesões centrais multifocais em associação com o hiperparatireoidismo ou no contexto de diferentes síndromes, como o querubismo (OMIM #118400) (SCHREUDER *et al.*, 2021). Os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares podem apresentar comportamento clínico indolente, embora algumas vezes demonstrem um curso clínico agressivo e recorram após tratamento cirúrgico conservador (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a). O fenótipo do querubismo tende a se manifestar nos primeiros anos de vida e a regredir com o passar da puberdade. Entretanto, a doença caracteriza-se por expressividade variável, penetrância incompleta e ausência de correlação clara entre o genótipo e o fenótipo (CHRCANOVIC *et al.*, 2021).

Histopatologicamente, tanto os granulomas esporádicos únicos como os múltiplos associados a condições sistêmicas são caracterizadas por tecido conjuntivo celularizado, com proliferação de células mononucleares ovoides e fusiformes e quantidade variável de células gigantes multinucleadas do tipo osteoclasto (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a). Áreas de hemorragia e pigmentos de hemossiderina são também observados (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a). Outros tumores ricos em células gigantes do tipo osteoclasto que afetam ossos extra-gnáticos constituem mimetizadores histológicos dos granulomas de células gigantes dos maxilares. Dentre eles estão o fibroma não-ossificante, o cisto ósseo aneurismático, o tumor de células gigantes dos ossos longos e o condroblastoma (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; BAUMHOER *et al.*, 2019).

Ao longo das últimas décadas, a utilização de técnicas moleculares consideradas padrão ouro e os avanços nas tecnologias de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*) possibilitaram melhor entendimento das bases genéticas dos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares, do querubismo, e também dos seus mimetizadores histológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2004a; BEHJATI *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2020). Os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares são caracterizados por mutações somáticas com ganho de função e mutuamente exclusivas nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* em 72% dos casos (GOMES *et al.*, 2018), enquanto mutações no gene *SH3BP2* são encontradas em 80-90% dos casos de querubismo (UEKI *et al.*, 2001; CHRCANOVIC *et al.*, 2021). No que diz respeito aos outros mimetizadores histológicos, o fibroma não-ossificante apresenta, em 78% dos casos, o mesmo espectro de mutações *KRAS* e *FGFR1* descritas nos

granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares (BAUMHOER *et al.*, 2019), demonstrando que as semelhanças microscópicas se estendem às características genéticas das duas lesões. Por outro lado, os tumores de células gigantes dos ossos longos são caracterizados por mutações no gene *H3-3A* em mais de 90% dos casos, as quais estão ausentes nos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares (BEHJATI *et al.*, 2013; GOMES *et al.*, 2014). Além disso, o condroblastoma é marcado por mutações no gene *H3-3B* (BEHJATI *et al.*, 2013) e o cisto ósseo aneurismático por rearranjos gênicos envolvendo o gene *USP6* (OLIVEIRA *et al.*, 2004a).

Embora as bases genéticas desses tumores ricos em células gigantes do tipo osteoclasto tenham sido amplamente exploradas, os mecanismos epigenéticos relacionados à patogênese dos mesmos ainda são incertos. A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que apresenta importante papel no desenvolvimento normal de mamíferos e em doenças, incluindo o câncer (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). A metilação do DNA consiste na transferência de um grupo metil (CH₃) para o quinto carbono de citosinas e é um processo catalisado por enzimas chamadas DNA metiltransferases (DNMTs) (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019).

Nos últimos anos, a utilização da análise do padrão de metilação do DNA com finalidade diagnóstica tem sido bem estabelecida para tumores do sistema nervoso central (CAPPER *et al.*, 2018). Além disso, abordagens de aprendizado de máquina baseadas em dados de metilação de DNA têm sido exploradas como ferramentas para classificação de sarcomas (KOELSCHE *et al.*, 2021; LYSKJAER *et al.*, 2021). A partir dos dados de metilação do DNA obtidos com a utilização de *microarrays* é possível ainda extrair dados genômicos de variações no número de cópias (CNVs, do inglês *Copy-number variations*) (DAENEKAS *et al.*, 2024). Em termos translacionais, o estudo das bases epigenéticas dos tumores é promissor, pois a metilação do DNA é um processo reversível e que pode ser modificado farmacologicamente (BAYLIN; JONES, 2016).

Com base no acima exposto, o presente estudo tem como objetivo investigar o perfil de metilação do DNA dos granulomas esporádicos centrais e periféricos de células gigantes e do querubismo, a fim de elucidar se essas lesões são semelhantes em nível epigenético e se agrupam ou se possuem padrões de metilação do DNA distintos. Objetiva-se também investigar o perfil de metilação do DNA de outros tumores ricos em células gigantes, incluindo o fibroma não-ossificante, o cisto ósseo aneurismático, o tumor de células gigantes dos ossos longos e o condroblastoma, a fim de comparar e elucidar se eles compartilham similaridades epigenéticas com os granulomas de células gigantes dos maxilares. Secundariamente, a partir dos dados de

metilação do DNA, objetiva-se investigar CNVs de segmentos cromossômicos para todas as amostras acima mencionadas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares

Granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares podem ocorrer como lesões centrais ou periféricas (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a; JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023b). As lesões periféricas podem também ocorrer em associação a implantes dentários (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2019).

Os granulomas centrais de células gigantes são lesões ósseas destrutivas que, apesar de benignas, podem apresentar comportamento agressivo e altas taxas de recidiva (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a). As lesões centrais ocorrem principalmente em mandíbula e acometem mais comumente indivíduos do sexo feminino entre a segunda e terceira décadas de vida (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a). As características imaginológicas das lesões centrais são variadas, podendo variar de lesão radiolúcida bem definida indolente a lesão radiolúcida multilocular, com expansão de cortical, por vezes perfuração de cortical, reabsorção radicular e/ou deslocamento de dentes (SCHREUDER *et al.*, 2021). Dessas características, deslocamento de dente e reabsorção radicular, bem como o tipo de tratamento realizado (curetagem), foram associadas a maior risco de recorrência (CHRCANOVIC *et al.*, 2019). Um caso de granuloma central de células gigantes é apresentado na Figura 1.

Os granulomas periféricos de células gigantes ocorrem em gengiva ou mucosa alveolar, afetando principalmente a mandíbula (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b). Há discreta predileção pelo sexo feminino e os indivíduos acometidos são um pouco mais velhos do que aqueles com os granulomas centrais (pico de prevalência na quinta década de vida, seguido pela quarta década) (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b). Na Figura 2 observa-se um caso de granuloma periférico de células gigantes. As lesões periféricas tendem a ser assintomáticas, mas erosão do osso subjacente pode ocorrer em 1/3 dos casos e parece estar relacionado à recorrência das lesões (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b).

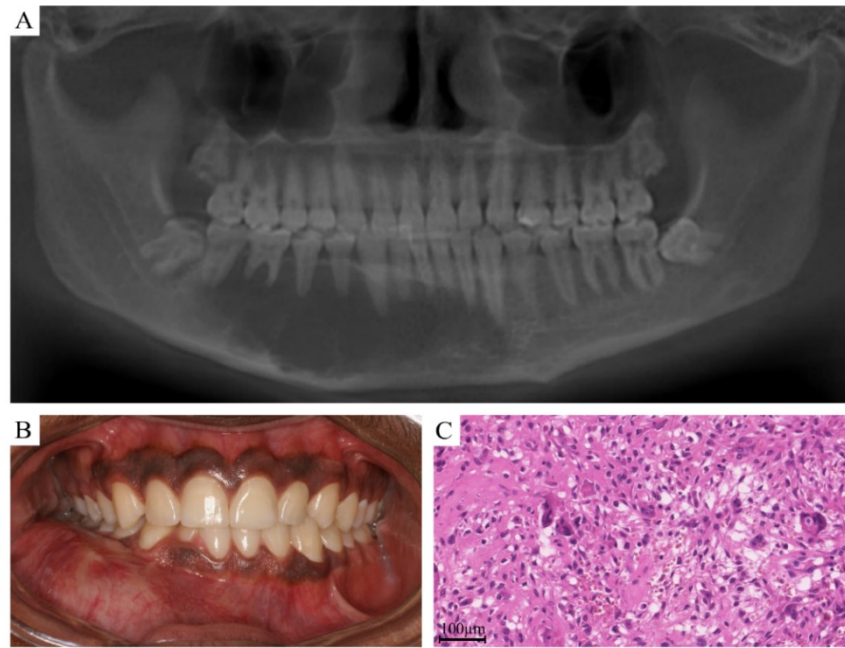


Figura 1 - Granuloma central de células gigantes dos maxilares. **(A)** Reconstrução panorâmica da tomografia computadorizada em que se observa lesão hipodensa e multilocular em corpo de mandíbula do lado direito, estendendo-se da região mental até o segundo molar. **(B)** Ao exame intra-oral, observa-se aumento de volume em mandíbula do lado direito levando ao apagamento do fundo de vestibulo. **(C)** Microscopicamente, observa-se células gigantes multinucleadas em meio a células mononucleares ovoides e fusiformes dispostas em um estroma fibrovascular (H&E, aumento original 40x).

Fonte: Cortesias dos professores Ricardo Santiago Gomez e Wagner Henriques de Castro

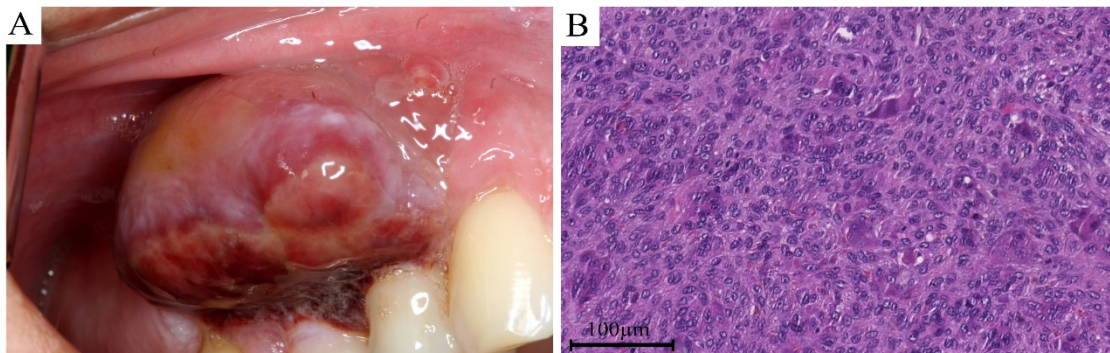


Figura 2 - Granuloma periférico de células gigantes dos maxilares. **(A)** Lesão de aspecto tumoral e coloração marrom-avermelhada em gengiva e mucosa alveolar de região posterior de maxila do lado direito. Observa-se áreas de sangramento e de superfície ulcerada. **(B)** Microscopicamente, observa-se células mononucleares de formatos arredondado, ovoide ou fusiforme entremeadas a células gigantes multinucleadas em um estroma fibrovascular (H&E, aumento original 40x).

Fonte: Cortesias dos professores Ricardo Santiago Gomez e Wagner Henriques de Castro

Em estudo prévio do nosso grupo de pesquisa, foi realizado sequenciamento completo do exoma (Whole-exome sequencing, WES) e RNA-sequencing (RNA-seq), revelando que os granulomas de células gigantes dos maxilares se agrupam em pelo menos quatro grupos molecularmente distintos (GOMES *et al.*, 2018). As assinaturas moleculares incluem grupos

com mutação em *KRAS* ou *FGFR1* ou *TRPV4* e um quarto grupo seria constituído por lesões de genótipo selvagem (*wild-type*) para estes três genes (GOMES *et al.*, 2018) (TABELA 1). No estudo supracitado, mutações somáticas, heterozigotas e com ganho de função em *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* foram detectadas em 72% (42/58) dos granulomas de células gigantes dos maxilares, sendo as mutações no *TRPV4* exclusivas da variante central (GOMES *et al.*, 2018). As mutações *KRAS* foram as mais frequentes, encontradas em 41% (24/58) dos casos. Mais especificamente, as mutações *hotspot* em *KRAS* englobavam as p.G12D/A, p.G13D, p.A146V, p.A146P, além de alelos menos comumente afetados, p.V14L, p.L19F, ou p.G10E (GOMES *et al.*, 2018). Mutações no gene *FGFR1* (p.C381R ou p.N330I) foram encontradas em 14% (8/58) dos casos (GOMES *et al.*, 2018). O gene *TRPV4* apresentou mutação (p.M713V ou p.M713I) em 22% (13/58) das lesões, exclusivamente nas lesões centrais (GOMES *et al.*, 2018).

O *KRAS* é um membro da família de proto-oncogenes RAS. Ele codifica a proteína KRAS, uma GTPase, que possui a função de transmitir sinais extracelulares para cascatas de transdução de sinais intracelulares (HAIGIS, 2017). O gene *TRPV4* codifica o canal polimodal e permeável ao cálcio TRPV4, o qual faz parte de uma família de canais receptores de potencial transitório, os quais são expressos em diferentes tecidos do organismo, exercendo importantes funções fisiológicas (NILIUS; VOETS, 2013). O gene *FGFR1* codifica o receptor transmembrana do tipo tirosina-quinase FGFR1, ao qual se ligam fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) que desencadeiam cascata de eventos intracelulares, ativando vias de sinalização proliferativa (BABINA; TURNER, 2017). Mutações em *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* convergem para ativação da via de sinalização *mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases* (MAPK/ERK) (GOMES *et al.*, 2018).

Histologicamente, o granuloma de células gigantes dos maxilares, seja central ou periférico, é caracterizado por uma população heterogênea de células mononucleares ovoides e fusiformes, entremeadas por quantidade variável de células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a; JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023b) (FIGURAS 1C e 2B). Essas células encontram-se em um *background* fibrovascular, com áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a; JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023b). Estudos *in vitro* com células da lesão e análises por imuno-histoquímica e hibridização *in situ* demonstraram que células mononucleares “estromais” de formato fusiforme expressam RANKL (*Receptor activator of nuclear factor- κ B ligand*), importante molécula de sinalização para a diferenciação osteoclástica (ITONAGA *et al.*, 2003; LIU; YU; LI, 2003). Além disso, células mononucleares ovoides e as células gigantes expressam o receptor de

RANKL, RANK (*Receptor activator of nuclear factor- κ B*) (LIU; YU; LI, 2003). Tais achados demonstraram a importância da sinalização RANKL/RANK na patogênese da lesão, uma vez que as células gigantes semelhantes a osteoclastos se formam a partir de seus precursores da linhagem monocítica/macrofágica circulantes sob influência da produção de RANKL (ITONAGA *et al.*, 2003).

As células gigantes presentes no granuloma de células gigantes dos maxilares são de natureza reativa e apresentam um perfil apoptótico, enquanto grupos de células mononucleares parecem corresponder ao componente proliferativo da lesão (SOUZA; MESQUITA; GOMEZ, 2000; AMARAL *et al.*, 2011). Recentemente, demonstrou-se que as mutações características dos granulomas de células gigantes (especificamente *KRAS* e *TRPV4*) são restritas à população de células mononucleares (MIGUITA *et al.*, 2022). Embora células da linhagem monocítica/macrofágica e células de origem mesenquimal façam parte desta população, análises em cultura de células e por citometria de fluxo demonstraram que a fração de células que carrega a mutação, sobrevive e prolifera em cultura corresponde às células de origem mesenquimal (MIGUITA *et al.*, 2022). Esses achados sugerem que as células mesenquimais sejam o componente central proliferativo do granuloma de células gigantes dos maxilares, enquanto as células de origem monocítica e as células gigantes semelhantes a osteoclastos representem o componente reativo da lesão (MIGUITA *et al.*, 2022).

Na última edição do livro da classificação dos tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial de Saúde (OMS) foram incluídos critérios essenciais e desejáveis para o diagnóstico dessas lesões (OMS, 2023). Para os granulomas centrais os critérios essenciais são: localização em ossos maxilares, clusters de células gigantes osteoclásticas, presença de hemorragia e estroma composto por células fusiformes (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a). O critério desejável é que a lesão tenha arquitetura lobular (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023a). Em relação aos granulomas periféricos, é essencial localização em gengiva ou crista alveolar, estroma celular mononuclear, clusters de osteoclastos, hemorragia e que não tenham origem de granuloma central de células gigantes subjacente (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023b). Como critério desejável para os granulomas periféricos incluiu-se a exclusão do hiperparatireoidismo (JORDAN; GOMES; GOMEZ, 2023b).

Apesar de o tratamento padrão das lesões centrais ser curetagem cirúrgica da lesão, devido ao comportamento agressivo de parte delas, a utilização de drogas como corticosteroides intralesionais, calcitonina, interferon, e bisfosfonatos já foi descrita, além do uso de inibidores de RANKL (denosumab) (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a; VANDERNIET *et al.*, 2022). Os granulomas centrais de células gigantes agressivos apresentam menor taxa de

resposta à terapia conservadora com drogas do que as não-agressivas (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a). Para os granulomas periféricos, excisão cirúrgica da lesão seguida de curetagem ou osteotomia do osso subjacente foi sugerida como o tratamento mais adequado, com efeitos positivos na redução de recorrência (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a).

Apesar de os granulomas de células gigantes dos maxilares ocorrerem mais frequentemente como lesões esporádicas únicas, granulomas múltiplos estão geralmente associados a condições síndromicas ou endócrinas sistêmicas (GOMES *et al.*, 2020; SCHREUDER *et al.*, 2021). Dentre as síndromes que apresentam granulomas de células gigantes dos maxilares como componentes destaca-se o querubismo (OMIM #118400), as RASopatias [síndrome de Noonan (OMIM #163950), neurofibromatose tipo 1 (OMIM#162200), e síndrome cardiofaciocutânea (OMIM#115150)], síndrome de Jaffe–Campanacci, síndrome oculoectodérmica (OMIM #600268), síndrome de Schimmelpenning (OMIM #163200), e displasia osteoglofônica (OMIM #166250) (GOMES *et al.*, 2020). Recentemente, um caso de neurofibromatose tipo I e querubismo concomitantes foi descrito, com confirmação genética de ambas as síndromes realizada por WES e validada por Sanger (SARANTOU *et al.*, 2024). No hiperparatireoidismo, tumores marrons podem afetar os ossos maxilares (LAJOLO *et al.*, 2020; GUIMARÃES *et al.*, 2022). O tumor marrom é histologicamente semelhante aos granulomas de células gigantes dos ossos maxilares e mutações patogênicas no gene *KRAS* foram descritas em 54% (7/13) desses tumores (GUIMARÃES *et al.*, 2020).

2.2 Querubismo

O querubismo é uma doença genética autossômica dominante caracterizada por aumento de volume simétrico dos maxilares em decorrência de múltiplas lesões intra-ósseas. Esta condição foi primeiramente descrita por Jones (1933) e atualmente há aproximadamente 500 casos bem documentados da doença na literatura científica (CHRCANOVIC *et al.*, 2021). O querubismo é uma doença rara que se manifesta principalmente na infância e as lesões tendem a regredir após a puberdade (PAPADAKI *et al.*, 2012; GOMEZ; FLANAGAN, 2023).

Análises imaginológicas geralmente revelam lesões expansivas, radiolúcidas/hipodensas, multiloculares, bem definidas e que podem ou não afetar a cortical óssea. Agenesia dentária, malformação de dentes, deslocamento e reabsorção de raízes, além de complicações oftalmológicas, também podem ser observadas (PAPADAKI *et al.*, 2012; GOMEZ; FLANAGAN, 2023). Histopatologicamente, as lesões caracterizam-se por tecido conjuntivo celularizado com proliferação de células mononucleares ovoides e fusiformes e

quantidade variável de células gigantes multinucleadas. Eosinofilia perivascular também é por vezes observada (MENG; YU; YU, 2005; GOMEZ; FLANAGAN, 2023). Os aspectos clínico, radiográfico e microscópico do querubismo podem ser observados nas Figuras 3 e 4. Os critérios essenciais para diagnóstico descritos pela OMS incluem acometimento da região posterior dos maxilares, lesões simétricas bilaterais e presença de lesões de células gigantes à análise microscópica (GOMEZ; FLANAGAN, 2023). O critério desejável é a detecção de mutação germinativa no gene *SH3BP2* (GOMEZ; FLANAGAN, 2023).

Em relação ao tratamento da doença, como as lesões do querubismo tendem a regredir após a puberdade, a conduta ideal é o acompanhamento do paciente. Entretanto, em razão da variação fenotípica do querubismo, casos mais agressivos podem levar a comprometimentos funcionais e estéticos, em decorrência de severa deformidade facial, comprometimento da fala, da mastigação e da deglutição, além de problemas respiratórios e oftalmológicos. Nestes casos, intervenções cirúrgicas e medicamentosas podem ser necessárias (CHRCANOVIC *et al.*, 2021).

Em 80-90% dos indivíduos afetados pela doença é possível identificar mutação no gene *SH3BP2* (TABELA 1), sendo que na grande maioria deles a mutação ocorre no éxon 9, com exceção de uma mutação no éxon 4 e uma deleção no éxon 3 previamente publicadas (UEKI *et al.*, 2001; CHRCANOVIC *et al.*, 2021). A doença é caracterizada por penetrância incompleta, uma vez que nem todos os indivíduos que possuem a mutação expressam o fenótipo da doença e expressividade variável por apresentar diferentes graus de agressividade entre os indivíduos que expressam o fenótipo (LIETMAN *et al.*, 2006). A manifestação clínica pode variar desde lesões mandibulares simétricas assintomáticas até lesões que afetam toda a mandíbula e maxila, podendo ainda atingir o processo coronoide e o côndilo mandibular, e levar a complicações funcionais e estéticas. Curiosamente, indivíduos portadores da mesma mutação no gene *SH3BP2* podem expressar o fenótipo da doença em diferentes graus de agressividade e, portanto, não há correlações genótipo-fenótipo claras na doença (CHRCANOVIC *et al.*, 2021; LIETMAN *et al.*, 2006).

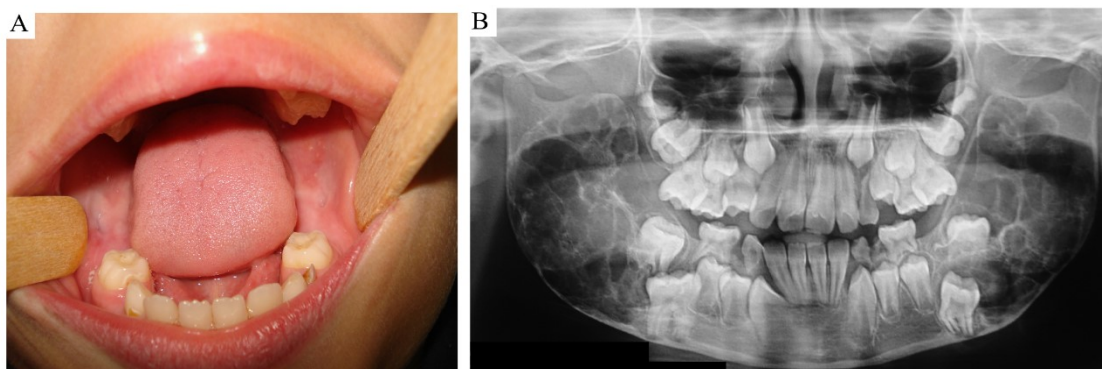


Figura 3 - Aspectos clínico-radiográficos do querubismo. **(A)** Ao exame intra-oral, observa-se aumento de volume bilateral em mandíbula posterior, com expansão óssea na região de ramo mandibular e com coloração semelhante à da mucosa normal. **(B)** Na radiografia panorâmica, observa-se lesões radiolúcidas multiloculares múltiplas em ramo de mandíbula dos lados direito e esquerdo, com acometimento dos processos coronoides, deslocamento dentário e afinamento da cortical óssea.

Fonte: Cortesia do professor Júlio César Tanos de Lacerda

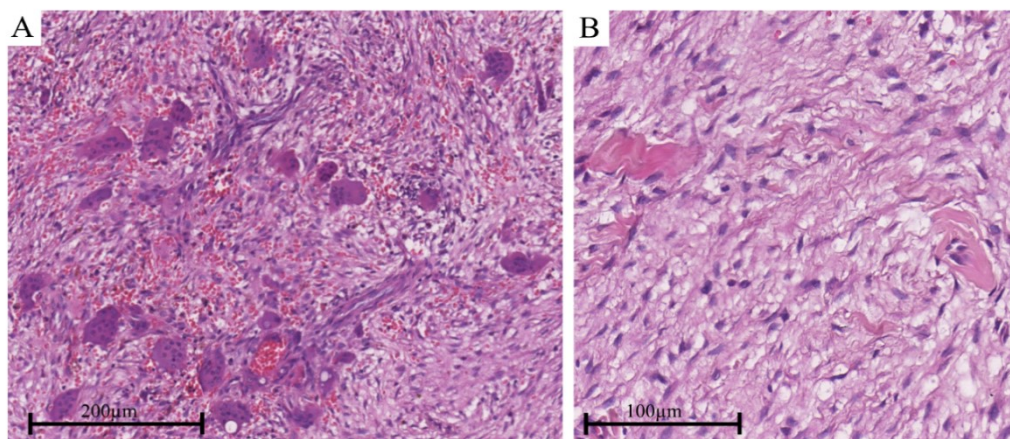


Figura 4 - Características histopatológicas do querubismo. **(A)** Histologicamente, observa-se numerosas células gigantes dispostas aleatoriamente entre células mononucleares ovoides e fusiformes e um estroma fibrovascular com áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina (H&E, aumento original 20x). **(B)** Destaque para áreas com depósitos eosinofílicos perivasculars (H&E, aumento original 40x).

O gene *SH3BP2* está localizado no cromossomo 4p16.3 e codifica a proteína adaptadora SH3BP2 (*Src Homology- 3 Binding Protein- 2*) (MANGION *et al.*, 1999; TIZIANI *et al.*, 1999; UEKI *et al.*, 2001). Embora a sua função exata ainda seja desconhecida, estudos *in vitro* e *in vivo* mostraram que a proteína SH3BP2 interage e forma complexos com outras proteínas citoplasmáticas (BERENDSEN; OLSEN, 2011; REICHENBERGER *et al.*, 2012). Assim, ela age no controle da sinalização intracelular em vias como SRC, VAV, SYK e ERK, principalmente em células do sistema imune e em osteoclastos (BERENDSEN; OLSEN, 2011; REICHENBERGER *et al.*, 2012). Nas lesões do querubismo, a positividade de numerosas células mononucleares para RANKL e das células gigantes multinucleadas para CD68, TRAP e NFATc1 sugerem a natureza osteoclástica das células gigantes multinucleadas (DUARTE *et al.*, 2011; LEE *et al.*, 2008). A proteína SH3BP2 seria então mediadora da sinalização

intracelular que ocorre após a sinalização RANKL, culminando com a ativação de NFATc1 e, consequentemente, ativação da osteoclastogênese (LIETMAN; YIN; LEVINE, 2008).

As alterações genéticas que levam à doença nos demais 10-20% dos casos ainda são desconhecidas. Em um trabalho publicado recentemente, foram detectadas mutações homozigóticas com perda de função no gene *OGFRL1* em duas famílias que não apresentavam mutação no gene *SH3BP2* (KITAKA *et al.*, 2024). Dois indivíduos afetados de uma família apresentaram mutação *frameshift* no exon 1, enquanto mutação no exon 3 levando à formação de *stop códon* prematuro foi detectada em um indivíduo afetado da outra família (KITAKA *et al.*, 2024). Modelos animais contendo as mutações em *OGFRL1* não recapitularam o fenótipo do querubismo e as funções biológicas da proteína OGFRL1 ainda não são bem descritas (KITAKA *et al.*, 2024). Portanto, trata-se de resultados preliminares e estudos futuros são necessários para a validação desses achados e para o conhecimento da real frequência de mutações no gene *OGFRL1* no querubismo.

Estudos que buscam avaliar a regulação da expressão gênica no querubismo ainda são escassos (FAN *et al.*, 2012; GUETTLER *et al.*, 2011; LEVAOT *et al.*, 2011; MUKAI; FUJITA; MORITA, 2019). Alguns deles focaram na regulação da atividade proteica a nível pós-traducional e demonstraram *in vitro* e *in vivo* que as mutações *SH3BP2* causadoras do querubismo impedem o reconhecimento da proteína SH3BP2 pela proteína reguladora Tanquirase (codificada pelo gene *TNKS*), uma poli (ADP-ribose) polimerase (GUETTLER *et al.*, 2011; LEVAOT *et al.*, 2011). A ADP-ribosilação da proteína SH3BP2 pela Tanquirase é essencial para que ocorra a ubiquitinação de SH3BP2 pela E3-ubiquitin ligase RNF146, e tal mecanismo culmina com a degradação da SH3BP2 no proteassoma (GUETTLER *et al.*, 2011; LEVAOT *et al.*, 2011). Notavelmente, a degradação de proteínas mediada por E3-ubiquitin ligases está também associada à patogênese de outras doenças humanas causadas por alterações ósseas e imunológicas, incluindo condições em que crianças apresentam face dismórfica (ASANO *et al.*, 2023).

As mutações causadoras do querubismo afetam quatro resíduos da proteína SH3BP2 (415, 418, 419 e 420) em uma sequência de seis aminoácidos (RSPPDG) localizados entre o domínio SH2 e o sítio de ligação SH3 (CHRCANOVIC *et al.*, 2021; UEKI *et al.*, 2001). Tais resíduos fazem parte da região peptídica onde ocorre o reconhecimento da SH3BP2 pela Tanquirase e as alterações culminam com a não degradação da SH3BP2. Assim, o acúmulo da SH3BP2 alterada no citoplasma leva a maior ativação de vias de sinalização das quais ela participa culminando com aumento da osteoclastogênese e da produção de TNF- α por células inflamatórias (GUETTLER *et al.*, 2011; LEVAOT *et al.*, 2011). Além disso, a utilização de

inibidores de Tanquirase na presença da proteína SH3BP2 inalterada induziram a osteoclastogênese e levaram à perda óssea *in vivo* (MUKAI; FUJITA; MORITA, 2019). Ainda no contexto de doenças inflamatórias com destruição óssea, estudos *in vivo* com modelos animais de artrite reumatoide mostraram que deficiência da proteína SH3BP2 reduz indução de artrite e erosão óssea (MUKAI *et al.* 2015), enquanto aumento nos níveis de SH3BP2 leva a aumento da perda óssea e osteoclastogênese (MUKAI *et al.*, 2014). Analisados em conjunto, estes dados sugerem que estudos futuros que explorem inibição da SH3BP2 em precursores de osteoclastos, podem beneficiar não apenas pacientes com querubismo, mas também indivíduos com outras doenças ósseas inflamatórias, incluindo artrite reumatoide.

Estudos *in vitro* com células derivadas da medula óssea de modelos animais de querubismo mostraram que tais células apresentam defeitos na osteogênese e também formação espontânea de osteoclastos (LIU *et al.*, 2018). Uma análise mais aprofundada avaliou separadamente alterações na expressão gênica global das células hematopoiéticas e mesenquimais da medula óssea por RNA-seq (SHARMA *et al.*, 2020). As células hematopoiéticas apresentaram *upregulation* de genes relacionados a diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea, enquanto as células mesenquimais mostraram *downregulation* de genes relacionados à osteogênese, e alterações na expressão de genes favorecendo a formação de osteoclastos e contribuindo para a fibrose. Ambas as populações celulares apresentaram alterações na expressão de genes relacionados à ocorrência de eventos inflamatórios (SHARMA *et al.*, 2020). Estes achados adicionam evidências à teoria de que processos relacionados à osteoclastogênese, repressão da osteogênese, inflamação, bem como interações entre as células hematopoiéticas e mesenquimais, exercem papel na patogênese do querubismo (SHARMA *et al.*, 2020).

A região promotora do gene *SH3BP2* humano foi caracterizada e a detecção de um sítio de ligação da proteína PARP1, outra poli (ADP-ribose) polimerase, nesta região abre caminho para novas investigações acerca da regulação da expressão gênica do *SH3BP2* em nível pré-transcricional (FAN *et al.*, 2012). Além disso, a região promotora/reguladora do gene *SH3BP2* não apresenta TATA box e possui múltiplos sítios iniciadores de transcrição. Tais sítios são permeados por sequências ricas em C/G (81%) e contém mais de 42 ilhas CpG, que por definição são alvos de regulação gênica por metilação do DNA (FAN *et al.*, 2012).

2.3 Mimetizadores histológicos dos granulomas de células gigantes dos maxilares e querubismo utilizadas para comparação no presente estudo

2.3.1 Fibroma não-ossificante

O fibroma não-ossificante é um tumor benigno autolimitante que, na grande maioria dos casos, ocorre na metáfise dos ossos longos dos membros inferiores de indivíduos jovens, com pico de incidência na segunda década de vida (WHO, 2020). Geralmente o fibroma não-ossificante é assintomático e identificado “acidentalmente” em exames de rotina (WHO, 2020). Esse tumor pode sofrer regressão e resolução espontâneas (BAUMHOER *et al.*, 2019; WHO, 2020). Múltiplos fibromas não-ossificantes podem ocorrer esporadicamente ou em associação a síndromes como neurofibromatose tipo 1, síndrome de Jaffe-Campanacci e síndrome oculoectodérmica (BAUMHOER *et al.*, 2019).

Histopatologicamente, o fibroma não-ossificante é caracterizado por células fusiformes arrançadas em padrão estoriforme, células gigantes semelhantes a osteoclastos, coleções de macrófagos espumosos e depósitos de hemossiderina (BAUMHOER *et al.*, 2019; WHO, 2020). Eventualmente pode-se observar formação de osteoide reativo, alterações císticas e focos de necrose em caso de fratura óssea (WHO, 2020).

Análises por WES e painéis de NGS revelaram mutações mutuamente exclusivas nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *NFI* (TABELA 1) em 81% (48/59) dos fibromas não-ossificantes, genes estes relacionados à via de sinalização MAPK/ERK (BAUMHOER *et al.*, 2019). Mutações *KRAS* somáticas foram detectadas em 64.4% (38/59) dos casos, sendo as mutações *hotspot* p.G12A/D/V e p.G13D responsáveis por 62% das mutações *KRAS*. Outras variantes encontradas em *KRAS* foram p.K117N (20%), p.A146P/T/V (10%), p.Q61R/L (5%) e p.A11Q (2.5%) (BAUMHOER *et al.*, 2019). Utilizando hibridização *in situ*, os autores demonstraram que nesta lesão as mutações também estão em células mononucleares da lesão e são ausentes nas células gigantes semelhantes a osteoclastos (BAUMHOER *et al.*, 2019). Mutações somáticas no gene *FGFR1* foram detectadas em 14% (8/59) dos tumores, sendo p.N330I em 7 casos e p.C381R em 1 caso (BAUMHOER *et al.*, 2019). Os autores do estudo supracitado sugeriram que a ativação da via MAPK/ERK nesse tumor seja transiente ou não seja suficiente para promover o seu crescimento ao longo do tempo, o que explicaria a sua regressão e resolução espontânea (BAUMHOER *et al.*, 2019).

Recentemente, foi demonstrado que diferentemente do granuloma de células gigantes dos maxilares, do tumor de células gigantes dos ossos longos, do condroblastoma e do cisto ósseo aneurismático, o fibroma não-ossificante apresenta expressão do receptor de estrógeno α

(ER α) em uma parte das células mononucleares da lesão (CLEVEN *et al.*, 2022). Esses achados corroboram a hipótese de que a regulação endócrina via estrogênio/ER α durante a puberdade esteja envolvida na regressão espontânea do fibroma não-ossificante, regressão esta que não ocorre nos tumores que apresentaram ausência da expressão de ER α (CLEVEN *et al.*, 2022).

Fibromas não-ossificantes são raramente descritos nos ossos maxilares, onde são mais frequentemente denominados defeito cortical fibroso ou defeito metafisário fibroso, afetando principalmente a região posterior de mandíbula (corpo/ramo/ângulo/côndilo) (ABDELSAYED; SHARMA; FERGUSON, 2010; CHRCANOVIC *et al.*, 2011). A patogênese molecular do defeito cortical fibroso dos ossos maxilares ainda não foi explorada e elucidada. Ao longo do presente estudo, o termo “fibroma não-ossificante” foi utilizado para se referir a fibromas não-ossificantes em localização extra-gnática.

2.3.2 Cisto ósseo aneurismático

O cisto ósseo aneurismático é uma neoplasia benigna osteolítica, caracterizada pela presença de espaços císticos multiloculados preenchidos por sangue (WHO, 2020). Esse tumor acomete principalmente indivíduos na primeira e segunda décadas de vida (WHO, 2020) e, geralmente, apresentam-se como lesões radiolúcidas que levam à expansão da cortical óssea (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014). Qualquer osso pode ser afetado, mas a maioria dos casos afeta a metáfise dos ossos longos e as vértebras (WHO, 2020). Raramente, cistos ósseos aneurismáticos também podem ocorrer nos ossos maxilares, com predileção pela mandíbula (MOTAMEDI *et al.*, 2008).

Microscopicamente, o cisto ósseo aneurismático é geralmente bem circunscrito e apresenta espaços císticos repletos de hemácias e separados por septos de tecido conjuntivo fibroso celularizado (WHO, 2020). Os septos fibrosos são compostos por células mononucleares fusiformes em meio a células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos, as quais podem por vezes projetar para os espaços císticos, hemorragia e depósitos de hemossiderina (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; WHO, 2020). Por vezes, observa-se depósito osteoide basofílico reativo, denominado *blue bone*, circundado por osteoblastos (WHO, 2020). Há também o subtipo sólido do cisto ósseo aneurismático, com as mesmas características microscópicas, mas com crescimento sólido proeminente e formações císticas mínimas (WHO, 2020).

Áreas semelhantes a cistos ósseos aneurismáticos podem ocorrer em associação a outros tumores ósseos benignos e malignos que passaram por alteração cística hemorrágica, dentre eles tumor de células gigantes dos ossos longos, osteoblastoma, condroblastoma, lesões fibro-

ósseas e alguns sarcomas (WHO, 2020). Tal fato levou à criação no passado do termo “cisto ósseo aneurismático secundário” para descrever estes casos, entretanto, o termo não é considerado adequado atualmente (LEE; HUANG, 2020; WHO, 2020).

O cisto ósseo aneurismático é caracterizado por rearranjos cromossômicos heterogêneos afetando o locus 17p13, os quais tem como consequência a formação de genes de fusão envolvendo o gene *USP6* em aproximadamente 70% (42/60) dos casos (OLIVEIRA *et al.*, 2004a; OLIVEIRA *et al.*, 2004b) (TABELA 1). A translocação mais comum é t(16;17)(q22;p13), levando ao recorrente gene de fusão *CDH11::USP6* em aproximadamente 30% dos casos de cisto ósseo aneurismático (OLIVEIRA *et al.*, 2004a; OLIVEIRA *et al.*, 2004b). Tal fusão leva à justaposição das regiões codificadoras do gene *USP6* à região promotora do gene *CDH11* (OLIVEIRA *et al.*, 2004a; OLIVEIRA *et al.*, 2004b). Os rearranjos do gene *USP6* foram restritos às células fusiformes dos cistos ósseos aneurismáticos, estando ausentes nas células gigantes multinucleadas (OLIVEIRA *et al.*, 2004b). Além disso, os rearranjos de *USP6* não foram detectados em outros tumores contendo áreas semelhantes a cistos ósseos aneurismáticos (OLIVEIRA *et al.*, 2004b).

Posteriormente, análises citogenéticas em combinação com hibridização *in situ* por fluorescência (do inglês *fluorescence in situ hybridization*, FISH) revelaram outros parceiros de fusão 5' decorrentes de variados rearranjos cromossômicos em um caso cada, tais como *THRAP3* (previamente nomeado *TRAP150*), *CNBP* (previamente nomeado *ZNF9*), *OMD* e *COL1A1* (OLIVEIRA *et al.*, 2005). Numerosos genes parceiros de fusão do *USP6* foram também recentemente descritos em estudos baseados em NGS, como *PAFAH1B1*, *RUNX2*, *SPARC*, *CTNNB1*, *SEC31A*, *EIF1*, *FOSL2*, *STAT3* e *USP9X* (GUSEVA *et al.*, 2017; WARREN; XU; LI, 2017; ŠEKORANJA *et al.*, 2018; BLACKBURN *et al.*, 2019). Na formação dos genes de fusão, as regiões codificantes do oncogene *USP6* são justapostas à região promotora de cada um dos genes de fusão parceiros, levando à superexpressão de *USP6* (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

2.3.3 Tumor de células gigantes dos ossos longos

O tumor de células gigantes dos ossos longos é uma neoplasia osteolítica de comportamento agressivo e alto índice de recorrência (WHO, 2020). Há um pequeno subconjunto de casos (<10%) que apresenta comportamento maligno e raramente pode ocorrer metástase nos pulmões (WHO, 2020). Os tumores de células gigantes dos ossos longos tipicamente afetam as extremidades dos ossos longos, como fêmur, tíbia, rádio e úmero (WHO,

2020). Indivíduos entre as terceira e quinta décadas de vida são mais comumente afetados e há discreta predileção pelo sexo feminino (WHO, 2020).

A análise microscópica do tumor de células gigantes dos ossos longos revela lesão altamente celular, com numerosas células gigantes semelhantes a osteoclastos em meio a uma população heterogênea de células mononucleares, hemorragia, depósitos de hemossiderina e eventuais macrófagos espumosos e áreas de necrose (WHO, 2020). As células mononucleares apresentam morfologia variada, incluindo células arredondadas, ovaladas e fusiformes, estando as últimas em associação a uma matriz fibrosa (WHO, 2020). Estudos sugerem que a população heterogênea de células mononucleares seja composta por células “estromais” de origem mesenquimal (células progenitoras semelhantes a fibroblastos, a miofibroblastos e a osteoblastos) e precursores de osteoclastos (JOYNER *et al.*, 1992; BEHJATI *et al.*, 2013; KHAZAEI *et al.*, 2020). Áreas semelhantes a cisto ósseo aneurismático podem estar presentes (WHO, 2020). Alguns tumores de células gigantes dos ossos longos podem exibir células mononucleares dispersas com pleomorfismo nuclear e núcleo hipercromático, mas por serem escassas e dispersas não são sugestivas de malignidade (WHO, 2020). Caso sejam observadas figuras de mitose atípicas, deve-se suspeitar de um tumor de células gigantes maligno (WHO, 2020). Essas características podem dificultar o diagnóstico histopatológico preciso da lesão.

Em 2013, um estudo pioneiro revelou que 92% (49/53) dos casos de tumor de células gigantes dos ossos longos apresentam mutação no gene *H3-3A* (BEHJATI *et al.*, 2013) (TABELA 1). Posteriormente, os mesmos autores confirmaram a alta frequência das mutações *H3-3A* nesses tumores, detectadas em 96% (85/89) dos casos (PRESNEAU *et al.*, 2015). A mutação p.G34W é a mais frequente, descrita em 98% (131/134) dos casos com mutação *H3-3A* (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015). Outras variantes menos frequentes afetando a glicina 34 foram também descritas, como p.G34L, p.G34R, p.G34M e p.G34V (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015; CLEVEN *et al.*, 2015; OGURA *et al.*, 2017). Os autores demonstraram que as mutações estão presentes apenas em uma parcela das células mononucleares “estromais” e ausentes nas células gigantes semelhantes a osteoclasto e seus precursores, sugerindo serem as primeiras o componente neoplásico da lesão (BEHJATI *et al.*, 2013).

Um estudo recente sugeriu que mutação na glicina 34 (especialmente p.G34W) desencadeia redução da metilação da lisina 36 (H3.3K36me3), com conseqüente alteração da metilação repressiva da lisina 27 (H3K27me3), levando à redistribuição de outros marcadores de cromatina e transcrição gênica alterada (KHAZAEI *et al.*, 2020). Essas alterações dificultariam a diferenciação das células progenitoras mesenquimais neoplásicas presentes no

tumor de células gigantes dos ossos longos, com importante papel na patogênese do tumor (KHAZAEI *et al.*, 2020). Em resumo, à partir dos resultados, os autores sugeriram que a mutação *H3-3A* p.G34W leva à formação do tumor por sustentar um estado transformado em algumas células “estromais” neoplásicas (progenitores semelhantes a osteoblastos), que promovem o crescimento neoplásico e o recrutamento e ativação de precursores de osteoclastos e células gigantes semelhantes a osteoclastos (KHAZAEI *et al.*, 2020).

2.3.4 Chondroblastoma

O chondroblastoma é um tumor composto principalmente por células condroblásticas e matriz cartilaginosa eosinofílica (WHO, 2020). Apesar de localmente destrutivo e passível de recorrência, é considerado um tumor benigno e que raramente metastatiza (WHO, 2020). O tumor acomete principalmente a região epifisária (subcondral) dos ossos longos, em especial do fêmur (WHO, 2020). Raramente chondroblastomas podem ser encontrados nos ossos da região craniofacial, com o osso temporal sendo o mais afetado (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; WHO, 2020). Há relatos deste tumor em articulação temporomandibular (BUI *et al.*, 2009). Chondroblastomas acometem principalmente indivíduos jovens entre a segunda e início da terceira décadas de vida, predominantemente indivíduos do sexo masculino (WHO, 2020).

Microscopicamente, o chondroblastoma é bifásico, apresentando áreas com células condroblásticas e matriz cartilaginosa e áreas ricas em células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos entremeadas a células mononucleares (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; WHO, 2020). Calcificação pericelular lembrando aspecto de renda ou arame é uma característica reconhecida do tumor, que pode auxiliar no diagnóstico (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; WHO, 2020). Áreas semelhantes a cisto ósseo aneurismático podem ser observadas (WHO, 2020).

Os mesmos estudos mencionados anteriormente conduzido por Behjati e colaboradores (2013) e Presneau e colaboradores (2015) revelaram que 95% (80/84) dos casos de chondroblastoma apresentam a mutação p.K36M, sendo a grande maioria no gene *H3-3B*, correspondendo a 87,5% (70/80) dos casos com a mutação (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015) (TABELA 1). O demais 12,5% (10/80) apresentavam a mutação no gene *H3-3A* (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015). Os genes *H3-3A* e *H3-3B* possuem sequências de DNA diferentes nos éxons e íntrons, mas codificam a proteína H3.3 com sequências de aminoácidos idênticas (SZENKER; RAY-GALLET; ALMOUZNI, 2011). De forma semelhante ao tumor de células gigantes dos ossos longos, as mutações foram restritas à

população celular “estromal” dos condroblastomas, não sendo detectadas nas células gigantes semelhantes a osteoclastos ou seus precursores (BEHJATI *et al.*, 2013).

Posteriormente, foi demonstrado que a mutação p.K36M desencadeia uma redução global da metilação da lisina 36 na histona H3.3 em condroblastomas humanos e em condrocitos com a mutação (FANG *et al.*, 2016). A redução ocorre devido à inibição de proteínas metiltransferases específicas pela proteína H3.3 alterada em decorrência da mutação (FANG *et al.*, 2016). Portanto, a reprogramação do cenário de metilação da H3K36 causada pela mutação p.K36M pode contribuir para a tumorigênese, em parte por alterar a expressão de genes associados a processos neoplásicos (FANG *et al.*, 2016).

A Tabela 1 sumariza as principais características genéticas já descritas na literatura para cada uma das entidades patológicas analisadas no presente estudo, incluindo as lesões dos maxilares e os mimetizadores histológicos.

Tabela 1- Mutações genéticas descritas nas lesões ricas em células gigantes incluídas no estudo

Lesão rica em células gigantes	Genes mutados	Referências
Granuloma central de células gigantes	<i>KRAS, FGFR1, TRPV4</i>	GOMES <i>et al.</i> , 2018
Granuloma periférico de células gigantes	<i>KRAS, FGFR1</i>	GOMES <i>et al.</i> , 2018
Querubismo	<i>SH3BP2, OGFRL1*</i>	UEKI <i>et al.</i> , 2001; KITAKA <i>et al.</i> , 2024
Fibroma não-ossificante	<i>KRAS, FGFR1, NF1**</i>	BAUMHOER <i>et al.</i> , 2019
Cisto ósseo aneurismático	Rearranjos do <i>USP6</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> , 2004a
Tumor de células gigantes dos ossos longos	<i>H3-3A</i>	BEHJATI <i>et al.</i> , 2013
Condroblastoma	<i>H3-3B</i>	BEHJATI <i>et al.</i> , 2013

*Mutações *OGFRL1* foram descritas recentemente no querubismo (KITAKA *et al.*, 2024), sendo resultados preliminares que necessitam de validação em estudos futuros.

**Mutações *NF1* foram detectadas em fibroma não-ossificante de dois indivíduos diagnosticados com neurofibromatose tipo I (BAUMHOER *et al.*, 2019).

2.4 Epigenética e metilação do DNA

A epigenética abrange modificações hereditárias que ocorrem na atividade e função dos genes e, conseqüentemente, no estabelecimento do fenótipo, mas que não se originam de alterações na sequência do DNA propriamente dita (MOORE; LE; FAN, 2013). De forma geral, os mecanismos epigenéticos são responsáveis pela diversificação da expressão gênica entre diferentes células e tecidos de um organismo (MOORE; LE; FAN, 2013). Os principais e mais estudados mecanismos epigenéticos são metilação do DNA, modificações das histonas e ação

de RNAs não-codificantes (NEBBIOSO *et al.*, 2018). A metilação do DNA e a modificação de histonas, mecanismos mais amplamente discutidos no presente estudo, estão ilustrados na Figura 5. Estes são importantes mecanismos na embriogênese, diferenciação celular e expressão gênica, e a perda do controle epigenético apropriado resulta no desenvolvimento de condições patológicas, que vão desde síndromes de malformação a diversos tipos de câncer (IZUMI, 2016; NEBBIOSO *et al.*, 2018).

A metilação do DNA é um mecanismo epigenético que envolve modificação química direta no DNA, consistindo na transferência de um grupo metil da S-adenosilmetionina para o carbono número 5 de citosinas, formando 5-metilcitosinas (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Isso ocorre na grande maioria das vezes em citosinas que precedem nucleotídeos de guanina, nos conhecidos como sítios CpG (MOORE; LE; FAN, 2013). O processo de metilação do DNA é catalisado por uma família de enzimas chamadas DNMTs, que são consideradas os *writers* da metilação do DNA (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019) (FIGURA 5). As DNMT3A e DNMT3B são conhecidas como *de novo* DNMTs, por serem capazes de incorporar novos padrões de metilação em regiões do DNA previamente não-metiladas (MOORE; LE; FAN, 2013). Por outro lado, a DNMT1 age durante a replicação do DNA, copiando para a fita de DNA recém-sintetizada o padrão de metilação do DNA já existente na fita molde (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Por este motivo, a DNMT1 é considerada uma enzima de manutenção do padrão de metilação do DNA durante a replicação (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Há ainda a DNMT3L, que não possui o domínio catalítico, mas interage e estimula a atividade das metiltransferases DNMT3A e DNMT3B, especialmente na linhagem germinativa (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019).

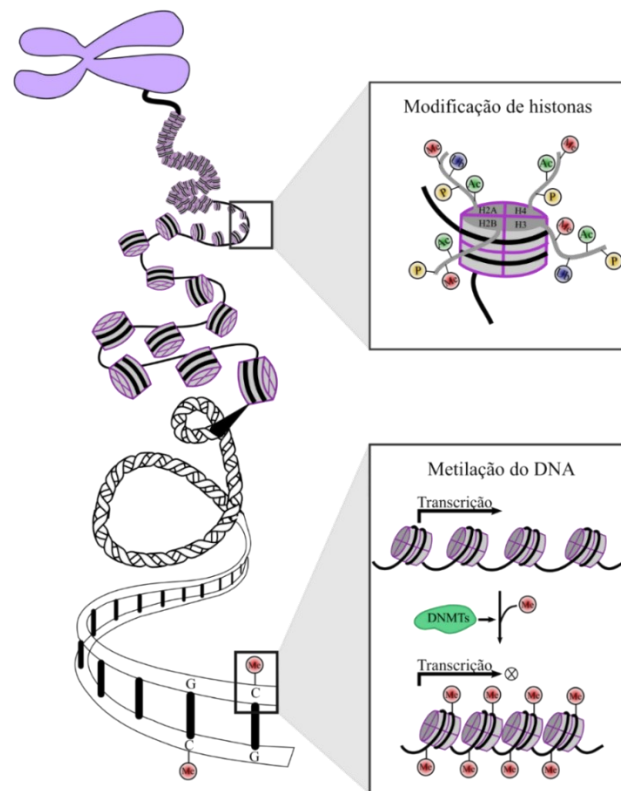


Figura 5 - Mecanismos epigenéticos de metilação do DNA e modificação de histonas. Mecanismos epigenéticos modificam a expressão de genes sem que haja modificações na sequência do DNA propriamente dita. As proteínas histonas, ao redor das quais a molécula de DNA se enovela, possuem caudas que são passíveis de modificações químicas, como acetilação, metilação, fosforilação, ubiquitinação, dentre outras. Tais modificações das histonas, a depender do resíduo afetado e do seu padrão de deposição, são importantes para o estabelecimento do estado ativado (eucromatina) ou reprimido (heterocromatina) da cromatina e, conseqüentemente, da expressão gênica. Na metilação do DNA, a incorporação de um grupo metil nas citosinas presentes nos sítios CpG por ação das DNA metiltransferases (DNMTs), de forma geral, desencadeia processos que culminam com a compactação da cromatina, dificultando o acesso dos fatores de transcrição e causando repressão da transcrição gênica.

Fonte: Produção do próprio autor

Assim como existem os *writers* da metilação do DNA, ou seja, enzimas que catalisam a adição do grupo metil nas citocinas, existem também proteínas nomeadas como *readers* e *erasers* da metilação do DNA (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Os *readers* reconhecem a metilação e se ligam ao grupo metil, desencadeando processos que influenciam a expressão gênica, enquanto os *erasers* modificam e removem o grupo metil (MOORE; LE; FAN, 2013). A desmetilação ativa do DNA envolve principalmente *erasers* como as enzimas TET (uma família de metilcitosina dioxigenases) que levam a modificações químicas da 5-metilcitosina, gerando 5-hidroximetilcitosina e culminando com a desmetilação do DNA (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Dentre os *readers*, destacam-se as proteínas MBD, por exemplo a MeCP2, as quais contêm um domínio de ligação metil-CpG (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). A MeCP2 age

reconhecendo a metilação e recrutando histona desacetilases e histona metiltransferases para manter o estado repressivo da cromatina (MOORE; LE; FAN, 2013).

Em média, cerca de 70-80% dos sítios CpG ao longo do genoma dos tecidos somáticos dos mamíferos são metilados (LI; ZHANG, 2014). Entretanto, ilhas CpG, que são regiões com ~1 kb de extensão ricas em CpG, muitas vezes associadas a promotores de genes, são frequentemente não-metiladas (LI; ZHANG, 2014). Fisiologicamente, a metilação do DNA desempenha papéis importantes na repressão da transcrição (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Este controle da expressão gênica se dá por recrutamento de proteínas envolvidas na repressão gênica, formação de heterocromatina e inibição da ligação dos fatores de transcrição aos seus alvos no DNA (MOORE; LE; FAN, 2013; GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Portanto, embora as ilhas CpG sejam raramente metiladas, a sua metilação pode resultar em silenciamento da expressão gênica (MOORE; LE; FAN, 2013).

A metilação do DNA é crucial para o desenvolvimento embrionário de mamíferos (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Alterações severas do desenvolvimento e letalidade embrionária precoce ocorrem em ratos com deficiência nos mecanismos de metilação do DNA (LI; BESTOR; JAENISCH, 1992). Funções importantes da metilação do DNA incluem, além da regulação da expressão gênica tecido-específica, a inativação do cromossomo X, *imprinting* genômico, repressão de genes específicos da linhagem germinativa, silenciamento de retrotransposons e também papéis contraintuitivos na ativação de alguns genes e na associação com corpos de genes transcritos ativamente (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Além disso, a desregulação da metilação do DNA atua no estabelecimento do fenótipo de diferentes tipos de câncer, em ação conjunta com alterações genéticas (BAYLIN; JONES, 2016).

Existe cross-talk entre a metilação do DNA e a modificação em histonas (MOORE; LE; FAN, 2013). Nos eucariotos, a molécula do DNA genômico encontra-se enovelada a pequenas proteínas básicas chamadas histonas (SZENKER; RAY-GALLET; ALMOUZNI, 2011). Um octâmero de histonas (composto por duas unidades de cada uma das histonas H2A, H2B, H3 e H4) envolvido por aproximadamente 150 pares de base do DNA forma a unidade básica da cromatina, o nucleossomo (SZENKER; RAY-GALLET; ALMOUZNI, 2011) (FIGURA 5). As histonas podem sofrer modificações químicas em resíduos específicos das suas caudas N-terminais, incluindo principalmente acetilação e metilação, mas também ubiquitinação, fosforilação, sumoilação e ADP-ribosilação, as quais influenciam a conformação da cromatina e a expressão gênica (PORTELA; ESTELLER, 2010; MOORE; LE; FAN, 2013) (FIGURA 5). De forma geral, a acetilação das histonas favorece um estado de eucromatina e, portanto, de transcrição ativa (KIMURA, 2013). Já a metilação das histonas, favorece um estado de ativação

ou repressão da transcrição dependendo do resíduo específico metilado e do padrão da metilação, ou seja, se houve mono-metilação (me1), bi-metilação (me2) ou tri-metilação (me3) do resíduo (KIMURA, 2013; JAMBHEKAR; DHALL, SHI, 2019).

As DNTMs interagem diretamente com as enzimas modificadoras de histonas, como histona desacetilases e histona metiltransferases, para manter um estado repressivo da cromatina (MOORE; LE; FAN, 2013). Por exemplo, DNMT1 e DNMT3B podem se ligar a histona desacetilases, estimulando a desacetilação das histonas e, portanto, tornando a cromatina mais condensada e restringindo o acesso dos fatores de transcrição (ROBERTSON; WOLFFE, 2000; MOORE; LE; FAN, 2013). Além disso, proteínas com domínio de ligação ao metil, como MeCP2 também podem recrutar histona desacetilases ou histona metiltransferases (MOORE; LE; FAN, 2013). As modificações em histonas também podem influenciar os padrões de metilação (MOORE; LE; FAN, 2013). Diferentes padrões de metilação das histonas, ativadores ou inibidores da transcrição, podem impedir ou estimular a ligação e atuação das DNMTs (MOORE; LE; FAN, 2013). Existem ainda algumas evidências de que níveis elevados de acetilação de histonas possam desencadear desmetilação do DNA (revisado por MOORE; LE; FAN, 2013). Portanto, metilação do DNA e modificação em histonas agem em conjunto para regular a transcrição e expressão gênicas.

Os avanços nas técnicas de análise da metilação do DNA que ocorreram nas últimas décadas permitiram a expansão do conhecimento acerca dos princípios básicos e do papel fisiológico e patológico da metilação do DNA (LI; TOLLEFSBOL, 2021). As técnicas existentes variam desde a análise da metilação das citosinas em locus específico até a análise do metiloma, possibilitado a investigação do estado de metilação global dos sítios CpG em todo o genoma com boa profundidade e resolução de um par de bases (LI; TOLLEFSBOL, 2021). Os avanços dos *microarrays* para análise de metilação do DNA têm oferecido uma alternativa vantajosa, considerada *user-friendly*, com bom custo-benefício e laboriosidade razoável, para o mapeamento da metilação do DNA em escala genômica (LI; TOLLEFSBOL, 2021). As plataformas Illumina DNA BeadChip utilizam desta tecnologia de *microarrays* e vem sofrendo avanços ao longo dos anos com o objetivo de abranger cada vez mais sítios CpG ao longo do genoma (LI; TOLLEFSBOL, 2021). A primeira tecnologia foi o *The GoldenGate assay*, capaz de interrogar aproximadamente 1.536 sítios CpG, passando pelos sistemas *Illumina Infinium HumanMethylation27 BeadChip* e *Infinium HumanMethylation450 BeadChip*, que abrangem aproximadamente 27.000 e 450.000 sítios CpG, e chegando à quarta geração, *Infinium MethylationEPIC BeadChip*, a qual interroga aproximadamente 850.000 sítios CpG ao longo do genoma (MORAN; ARRIBAS; ESTELLER, 2016; LI; TOLLEFSBOL, 2021).

Recentemente, a Illumina lançou a versão atualizada do sistema EPIC, o *Infinium MethylationEPIC v2.0 BeadChip*, que amplia ainda mais a cobertura, permitindo a análise de mais de 935.000 sítios CpG no genoma (KAUR *et al.*, 2023).

Os mais de 850.000 sítios CpGs cobertos pela Plataforma *Illumina Methylation EPIC BeadChip* incluem mais de 90% dos sítios CpGs interrogados pela *Infinium HumanMethylation450 BeadChip* mais aproximadamente 400.000 CpGs extras, melhorando consideravelmente a cobertura de regiões funcionais regulatórias do genoma como *enhancers* e promotores (PIDSLEY *et al.*, 2016). As sondas EPIC estão principalmente localizadas nos promotores (54%), seguidas pelos corpos dos genes (30%) e então pelas regiões intergênicas (16%) (PIDSLEY *et al.*, 2016). Além de representar um avanço considerável das técnicas de análise de metilação do DNA, a plataforma *Illumina Methylation EPIC BeadChip* demonstra alta correlação com dados de *Whole-genome bisulphite sequencing* (WGBS), técnica atualmente considerada o padrão ouro para mensuração da metilação do DNA (PIDSLEY *et al.*, 2016). Portanto, *EPIC BeadChip* foi um avanço e aquisição importante, uma vez que o método WGBS é de alto custo e exige altos níveis de expertise técnica para gerar e processar dados (PIDSLEY *et al.*, 2016), fazendo com que, apesar de ser o padrão ouro, o WGBS nem sempre seja o método mais viável.

Para a análise da metilação do DNA por meio do sistema *Illumina Methylation EPIC BeadChip*, preconiza-se a conversão do DNA por bissulfito. Nesta etapa, as citosinas metiladas permanecem inalteradas enquanto as citosinas não-metiladas são convertidas em uracilas (que seguindo as etapas de amplificação subsequentes tornam-se timinas). O sistema *EPIC* conta com dois tipos diferentes de *design* de sondas presentes no chip para a detecção do estado de metilação dos sítios CpG (PIDSLEY *et al.*, 2016). As sondas do tipo I possuem sequências distintas para cada CpG, sendo uma sequência para CpGs metilados e outra para CpGs não-metilados. Já as sondas do tipo II utilizam uma única sequência para cada CpG (PIDSLEY *et al.*, 2016). As sequências das sondas do tipo I são desenhadas para hibridizar ao DNA convertido por bissulfito do locus metilado e não-metilado. Na sonda em que a hibridização acontece, ocorre extensão de uma base, com a incorporação de um nucleotídeo terminador de cadeia e marcado com fluorescência, fornecendo informação do estado de metilação daquele locus. A segunda sonda não hibridiza adequadamente, ocorrendo inibição da extensão. Já as sondas do tipo II são desenhadas para hibridizar ao DNA convertido por bissulfito até a base imediatamente anterior ao locus de metilação. A hibridização do fragmento permite a extensão de uma única base, sendo que o tipo de nucleotídeo incorporado (adenina complementar a timina ou guanina complementar a citosina) indicará o estado de metilação do sítio CpG

(PIDSLEY *et al.*, 2016). Os sinais de intensidade de fluorescência gerados nas sondas presentes no chip são utilizados para as análises bioinformáticas subsequentes.

A tecnologia *Illumina Methylation EPIC BeadChip* tem então sido utilizada em estudos recentes que têm explorado a análise do padrão de metilação do DNA com objetivos voltados para diagnóstico e pesquisa (CAPPER *et al.*, 2018; KOELSCHE *et al.*, 2021; LYSKJAER *et al.*, 2021; JURMEISTER *et al.*, 2022a; JURMEISTER *et al.*, 2022b). A análise da metilação global do DNA com finalidade diagnóstica já é bem estabelecida para tumores do sistema nervoso central, incluindo tumores pediátricos (CAPPER *et al.*, 2018), e tem se mostrado eficaz na classificação de sarcomas ósseos e de tecidos moles (KOELSCHE *et al.*, 2021; LYSKJAER *et al.*, 2021). Recentemente, foi também publicado o classificador de tumores nasossinusais, com foco em carcinomas indiferenciados da região (JURMEISTER *et al.*, 2022b). Além disso, a investigação dos padrões globais de metilação do DNA tem sido explorada para pesquisa em diferentes contextos, incluindo lesões neoplásicas e não-neoplásicas, colaborando para o entendimento da patogênese dessas lesões (DOS REIS *et al.*, 2017; BERTERO *et al.*, 2021; JABARI *et al.*, 2022; JURMEISTER *et al.*, 2022a). A partir dos dados obtidos do microarray de metilação do DNA *Illumina Methylation EPIC BeadChip* é também possível extrair dados genômicos de CNVs de segmentos cromossômicos, sem a necessidade de realizar um ensaio genômico adicional (DAENEKAS *et al.*, 2024). Para inferir CNVs a partir do microarray de metilação do DNA, algoritmos específicos utilizam a soma dos valores de intensidade dos sinais não metilados e metilados como indicativo do estado do número de cópias de um dado locus, seguido por uma série de etapas de normalização e processamento (DAENEKAS *et al.*, 2024). Esta abordagem tem sido amplamente explorada no contexto dos tumores do sistema nervoso central, de forma que os dados de CNVs são apresentados no relatório gerado pelo próprio classificador de tumores, onde os CNVs inferidos podem impactar na classificação dos tumores e em decisões clínicas (DAENEKAS *et al.*, 2024). Por fim, o estudo deste mecanismo epigenético é promissor em termos translacionais, uma vez que os mecanismos de metilação do DNA podem ser modificados farmacologicamente (JONES *et al.*, 2019).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar padrões de metilação do DNA no granuloma esporádico de células gigantes dos maxilares e no querubismo, comparando-os aos seus mimetizadores histológicos.

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Investigar padrões de metilação do DNA em amostras de granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos;

3.2.2 Investigar padrões de metilação do DNA em amostras de querubismo;

3.2.3 Comparar os padrões de metilação do DNA das amostras de granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e do querubismo com os padrões de seus seguintes mimetizadores histológicos: fibroma não-ossificante, cisto ósseo aneurismático, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma;

3.2.4 Avaliar a distribuição da metilação global e de sítios CpG em regiões funcionais (*enhancers* e promotores) em amostras de granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos e querubismo;

3.2.5 Realizar análise de metilação diferencial para avaliar sítios CpG e genes diferencialmente metilados entre os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos e o querubismo.

3.2.6 Interrogar ganhos ou perdas de braços ou segmentos cromossômicos por meio de análise de CNVs em amostras de granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos, querubismo, fibroma não-ossificante, cisto ósseo aneurismático, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 44227021.4.0000.5149; Parecer: 4.742.379).

4.2 Seleção e inclusão das amostras

Para o estudo, amostras de granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares (centrais e periféricos) e de lesões do querubismo fixadas em formol e incluídas em parafina (FFPE, do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*) foram obtidas do serviço de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFMG. Alguns dos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares haviam sido previamente analisados quanto à ocorrência de mutações genéticas (GOMES *et al.*, 2018). A revisão morfológica dos casos por meio de lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) e a correlação com os dados clínico-radiográficos foram realizados por patologistas orais experientes (R.S.G e C.C.G.) para confirmação do diagnóstico. Os dados clínicos e imaginológicos foram recuperados dos prontuários dos pacientes. Além da identificação de células mononucleares e de células gigantes semelhantes a osteoclastos em um *background* fibrovascular e hemorrágico em lâminas histológicas coradas por H&E, a presença de lesões osteolíticas múltiplas nas radiografias, aumento de volume simétrico dos ossos maxilares desde a infância, história familiar da doença e níveis normais de paratormônio foram considerados para o diagnóstico de querubismo (WHO, 2023).

Da amostra de conveniência inicial constituída por 30 casos de granulomas de células gigantes dos maxilares (central=10, periférico=10, e querubismo=10), 4 amostras de querubismo não puderam ser analisadas devido a DNA genômico (gDNA) insuficiente ou por não terem alcançado bons parâmetros na etapa de controle de qualidade (QC, do inglês *quality control*). Assim, 26 amostras de 26 pacientes foram incluídas na análise final. Portanto, o cohort final consistiu em 10 granulomas centrais de células gigantes dos maxilares, 10 granulomas periféricos de células gigantes dos maxilares e 6 lesões de querubismo.

Dados do perfil de metilação do DNA de 45 amostras de tumores ricos em células gigantes que são mimetizadores histológicos dos granulomas de células gigantes dos maxilares foram incluídos para comparação: fibroma não-ossificante (n=10), cisto ósseo aneurismático (n=16), tumor de células gigantes dos ossos longos (n=9) e condroblastoma (n=10). O diagnóstico de todas as amostras incluídas neste estudo foi alcançado seguindo critérios

estabelecidos pela OMS (WHO, 2020; WHO, 2023). Para incluir amostras processadas no mesmo local e seguindo o mesmo protocolo, o perfil de metilação das amostras de fibroma não-ossificante e cisto ósseo aneurismático foi avaliado pela primeira vez no presente estudo. O perfil de metilação das amostras de tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma havia sido previamente analisado em trabalho do grupo de coautores do presente estudo (KOELSCHE *et al.*, 2021).

Em relação a essas lesões ricas em células gigantes incluídas para comparação, o cisto ósseo aneurismático é uma lesão rara, com incidência anual estimada de 0,15 casos por milhão de pessoas (LEITHNER *et al.*, 1999), 1,5% dos quais ocorre nos ossos maxilares (WHO, 2023). Devido a essa raridade, um único caso de cisto ósseo aneurismático mandibular foi incluído na análise. Aproximadamente dois terços dos condroblastomas envolvem a região epifisária dos ossos longos, sendo excepcional a ocorrência nos ossos craniofaciais (WHO, 2020). Além disso, os autores não tiveram acesso a nenhum caso nos ossos maxilares que pudesse ser inequivocamente classificado como fibroma não-ossificante ou tumor de células gigantes. Destaca-se que esses tumores não estão incluídos na Classificação da OMS de Tumores da Cabeça e Pescoço (WHO, 2023).

Portanto, as amostras para comparação incluíram fibroma não-ossificante, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma afetando o esqueleto apendicular, tanto membros superiores quanto inferiores, e predominantemente ossos longos. Tanto o esqueleto apendicular quanto o axial foram afetados pelas amostras de cisto ósseo aneurismático incluídas. Apesar de o tumor marrom do hiperparatireoidismo compartilhar características microscópicas com os tumores acima mencionados, essa lesão não foi incluída na análise por ser facilmente diferenciada clinicamente por meio de exames bioquímicos.

4.3 Extração do DNA e conversão pelo bissulfito

Regiões representativas de cada amostra foram identificadas na lâmina corada em H&E e fragmentos de 1,5mm foram obtidos utilizando-se um punch no local correspondente no bloco FFPE. Somente amostras com pelo menos 70% de tecido tumoral foram incluídas. O gDNA foi extraído das amostras FFPE utilizando o sistema automatizado Maxwell e kits correspondentes (Promega, Fitchburg, Massachusetts, USA) e seguindo as recomendações do fabricante. A quantificação do gDNA isolado foi realizada com o kit Qubit dsDNA BR Assay Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA). Aproximadamente 200ng de gDNA de cada amostra foram utilizados para a conversão do DNA pelo bissulfito, etapa que foi realizada com o kit EZ DNA Methylation-Gold™ Kit (Zymo Research, Irvine, CA, USA) e seguindo as recomendações do

fabricante. Nesta etapa, as citosinas não-metiladas são convertidas em uracilas, enquanto as citosinas metiladas permanecem inalteradas.

4.4 Análise do perfil de metilação do DNA

O estudo da metilação do DNA foi realizado utilizando a plataforma Infinium Human Methylation EPIC (850K) BeadChip (Illumina, San Diego, CA, USA), para obter o perfil de metilação do DNA de aproximadamente 850.000 sítios de metilação ao longo do genoma, seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Esta plataforma conta com mais de 850.000 sondas e permite avaliar com profundidade a metilação das citosinas ao longo do genoma humano. Subsequentemente, os BeadChips foram escaneados e os dados foram capturados pelo sistema iScan platform (Illumina, San Diego, CA, USA).

A análise computacional subsequente foi conduzida por meio da linguagem R (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2023). CNVs foram investigadas por meio da utilização do pacote *conumee Bioconductor* (HOVESTADT; ZAPATKA, 2015). As intensidades dos sinais brutos foram obtidas de arquivos IDAT utilizando o pacote *minfi Bioconductor* version 1.24.0. O procedimento para processamento de dados e *downstream output* após a obtenção de dados brutos dos painéis de metilação foi conduzido como descrito previamente (CAPPER *et al.*, 2018). Os valores de metilação (estimado como β) obtidos variaram de 0 (não-metilado) a 1 (metilado). Os gráficos com os resultados da análise de CNVs foram gerados usando um *in-house* script R (DSTICHEL, 2020).

4.4.1 Análise não supervisionada

Seguindo a etapa de controle de qualidade, os dados da metilação do DNA foram analisados por redução de dimensionalidade não linear não supervisionada *Uniform manifold approximation and projection* (UMAP). Os seguintes parâmetros foram utilizados: número de CpGs = 20.000; *nearest neighbours* = 15; distância mínima entre os pontos = 0.25; *spread of the clusters* = 2; *output dimensions* = 2.

O agrupamento hierárquico não supervisionado foi realizado usando os valores β das 20.000 sondas que apresentam o maior desvio mediano absoluto (do inglês *Median absolute deviation*, MAD). As amostras foram agrupadas hierarquicamente usando a distância euclidiana e o método de ligação de Ward. Foi gerado um heatmap que apresenta os níveis de metilação variando do estado não-metilado (cor azul) ao estado metilado (cor vermelha).

4.4.2 Metilação diferencial de sítios CpG e análise de enriquecimento do Gene Ontology (GO)

A estimativa das DMPs (do inglês *differentially methylated positions*) foi realizada utilizando as funções do pacote R *limma* (RITCHIE *et al.*, 2015). Os testes foram realizados nos valores *M* das 10.000 posições CpG principais ranqueadas por variabilidade. CpGs relevantes foram definidas quando o valor de *p* ajustado foi menor que 0,01 e o *logfold-change* superior a 2. A correção para testes múltiplos foi realizada utilizando o método de Benjamini Hochberg.

Box plots e *Volcano plots* foram visualizados por meio do pacote R *ggplot2* (WICKHAM, 2016). O *manifest* Illumina Infinium HumanMethylationEPIC foi utilizado para anotar CpGs em sítios de promotores e *enhancers*. CpGs nos *Volcano plots* estão distribuídos de acordo com seus valores de *p* ajustados em $-\log_{10}$ e *logfold-change*. Os principais sítios CpGs metilados significativos são representados em vermelho, enquanto o gene associado é mostrado para as 100 principais DMPs. A avaliação e visualização dos genes diferencialmente metilados sobrepostos por meio do diagrama de Venn foram realizadas utilizando o pacote R *VennDiagram* (CHEN, 2022).

O enriquecimento do *Gene Ontology* (GO) para CpGs significativos da análise de metilação diferencial foi realizado utilizando a função *gometh* do pacote R *missMethyl* (PHIPSON; MAKSIMOVIC; OSHLACK, 2016).

5 RESULTADOS

Os resultados descritos foram redigidos sob forma de artigo científico, o qual foi publicado no periódico *The Journal of Pathology Clinical Research* (APÊNDICE A). A descrição das atividades adicionais desenvolvidas durante o período do doutorado está também disponível no Apêndice B.

5.1 Caracterização da amostra

A idade média dos indivíduos com granulomas centrais de células gigantes dos maxilares foi 20,9 (variando de 7 a 53), enquanto para os indivíduos com lesões periféricas foi 46,1 (15-74) e para o querubismo, 13,2 anos. A proporção sexo masculino/feminino foi de 2:3, 3:2 e 1:1, respectivamente. A região da mandíbula foi o local mais afetado pelos granulomas esporádicos de células gigantes, tanto centrais (6/10) quanto periféricos (8/10), e pelo querubismo (4/6). Informações clínicas de cada caso são apresentadas na Tabela 2. Também estão listados na Tabela 2 o status mutacional dos granulomas esporádicos de células gigantes previamente analisados (GOMES *et al.*, 2018).

Tabela 2 - Dados clínicos e moleculares dos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos e do querubismo

Amostra #	Sexo	Idade (anos)	Localização	Mutação
Granuloma central de células gigantes dos maxilares				
1	M	53	Maxila	<i>KRAS</i> p.L19F
2	F	15	Maxila	<i>KRAS</i> p.A146V
3	M	9	Maxila	<i>FGFR1</i> p.C381R
4	F	35	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.G12D
5	F	16	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.G10E
6	M	17	Maxila	<i>FGFR1</i> p.C381R
7	M	25	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.G12D/ <i>TRPV4</i> p.M713V
8	F	14	Mandíbula	<i>TRPV4</i> p.M713I
9	F	18	Mandíbula	<i>TRPV4</i> p.M713V
10	F	7	Mandíbula	<i>FGFR1</i> p.C381R
Granuloma periférico de células gigantes dos maxilares				
1	F	36	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.L19F
2	M	68	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.V14L
3	M	48	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.A146V
4	F	65	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.A146V
5	M	18	Mandíbula	<i>FGFR1</i> p.C381R
6	M	36	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.G12D
7	F	15	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.G12D
8	M	62	Maxila	<i>KRAS</i> p.G13D
9	F	39	Mandíbula	<i>KRAS</i> p.G12A
10	M	74	Maxila	<i>KRAS</i> p.A146V
Querubismo				
1	M	15	Mandíbula	ND

2	F	15	Maxila	ND
3	F	17	Mandíbula	ND
4	F	6	Maxila	ND
5	M	10	Mandíbula	ND
6	M	16	Mandíbula	ND

Abreviaturas: F: feminino, M: masculino; ND: dado não disponível. Os granulomas esporádicos de células gigantes foram previamente analisados quanto à presença de mutações genéticas (GOMES et al., 2018).

Microscopicamente, todos os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos e as lesões de querubismo apresentaram células gigantes multinucleadas do tipo osteoclasto entremeadas a células mononucleares ovoides e fusiformes em um *background* fibrovascular com hemorragia e depósitos de hemossiderina. Além disso, depósitos eosinofílicos perivasculares do tipo manguito foram identificados nos casos de querubismo.

Informações clínicas dos tumores ricos em células gigantes incluídos para comparação também estão apresentadas na Tabela 3.

Tabela 3 - Informações clínicas dos tumores ricos em células gigantes incluídos para comparação

Amostra #	Sexo	Idade (anos)	Localização
Fibroma não-ossificante			
1	F	9	Tíbia
2	M	14	Tíbia
3	M	13	Fêmur
4	M	8	Tíbia
5	M	13	Tíbia
6	F	20	Fêmur
7	M	12	Tíbia
8	M	16	Fêmur
9	F	10	Úmero
10	F	12	Fíbula
Cisto ósseo aneurismático			
1	F	7	Mandíbula
2	M	16	Clavícula
3	F	14	Tíbia
4	M	19	Tíbia
5	M	8	Pé
6	M	19	Pé
7	F	5	Pé
8	M	26	Fêmur
9	F	15	Fêmur
10	M	17	Fíbula
11	M	6	Pé
12	F	26	Fíbula
13	F	14	Vértebra
14	F	10	Úmero
15	M	15	Fíbula
16	M	6	Fíbula
Tumor de células gigantes dos ossos longos			
1	M	29	Rádio
2	F	27	Úmero
3	F	26	Úmero
4	F	34	Fêmur
5	M	59	Úmero
6	F	22	Tíbia

7	F	75	Fêmur
8	M	32	Rádio
9	F	27	Rádio
Condroblastoma			
1	M	14	Úmero
2	F	34	Talus
3	M	16	Fêmur
4	M	25	Escápula
5	F	16	Fêmur
6	F	22	Fêmur
7	M	17	Tíbia
8	M	15	Talus
9	M	17	Fêmur
10	M	41	Talus

Abreviaturas: F: feminino, M: masculino

5.2 Perfil de metilação do DNA

Foram gerados dados do perfil de metilação do DNA de granulomas esporádicos de células gigantes centrais (n=10) e periféricos (n=10) e querubismo (n=6). Para investigar se granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e querubismo compartilham padrões de metilação com seus mimetizadores histológicos, o perfil de metilação do DNA de tumores ricos em células gigantes (fibroma não-ossificante, cisto ósseo aneurismático, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma) foram incluídos e os dados de metilação do DNA foram analisados por UMAP e agrupamento hierárquico não supervisionado.

Utilizando o método de redução de dimensionalidade, não houve separação inequívoca entre os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares (centrais e periféricos) e o querubismo com base nos seus perfis de metilação do DNA (FIGURA 6). No entanto, tanto a análise por UMAP (FIGURA 6A) quanto por agrupamento hierárquico não supervisionado (FIGURA 6B) sugerem padrões de metilação diferentes entre os granulomas de células gigantes periféricos dos maxilares e o querubismo, enquanto os granulomas de células gigantes centrais dos maxilares se sobrepõem a ambos os grupos. Notavelmente, fibroma não-ossificante, cisto ósseo aneurismático, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma formaram quatro *clusters* distintos e individualizados (FIGURA 6). Um padrão de agrupamento similar ao revelado na análise UMAP é também observado na análise por t-distributed stochastic neighbour embedding (t-SNE) (FIGURA 7).

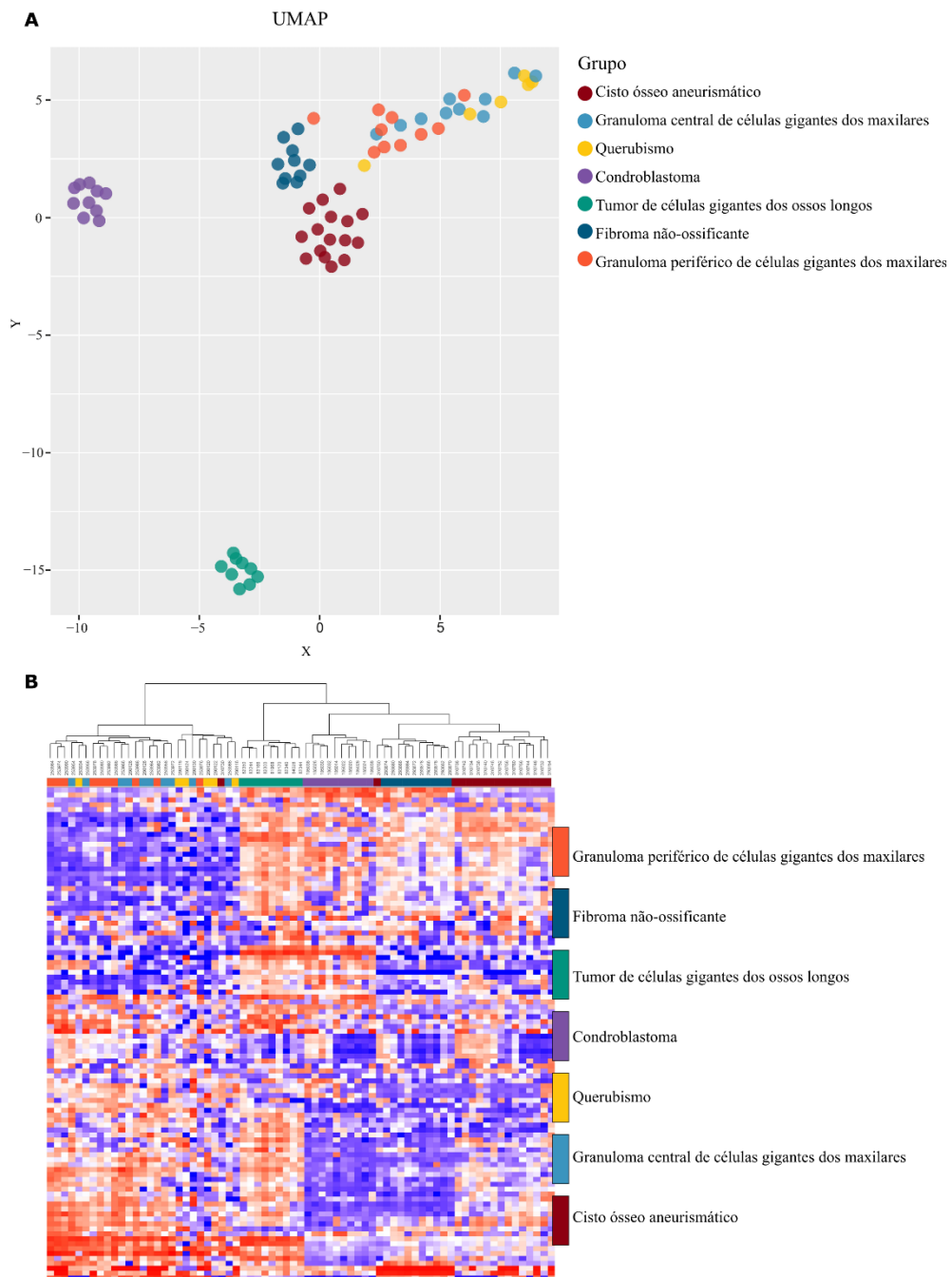


Figura 6 - Análises não-supervisionadas do perfil de metilação do DNA do granuloma central de células gigantes dos maxilares, granuloma periférico de células gigantes dos maxilares, querubismo e seus mimetizadores histológicos. **(A)** Método de redução de dimensionalidade *Uniform manifold approximation and projection* (UMAP) revelando o agrupamento entre as lesões de células gigantes dos maxilares e seus mimetizadores histológicos. O grupo clínico é indicado pela cor na legenda. **(B)** Agrupamento hierárquico não supervisionado revelando também o agrupamento das lesões em relação aos perfis de metilação do DNA. O dendograma mostra os resultados do agrupamento hierárquico não supervisionado dos níveis de metilação das 20.000 sondas que apresentaram o maior desvio mediano absoluto (MAD) entre os valores β . O grupo clínico é indicado pela cor. No heatmap, o nível de metilação do DNA (valor β) é representado com uma escala de cores que varia do estado não-metilado (cor azul) ao estado metilado (cor vermelha).

Fonte: Produção do próprio autor.

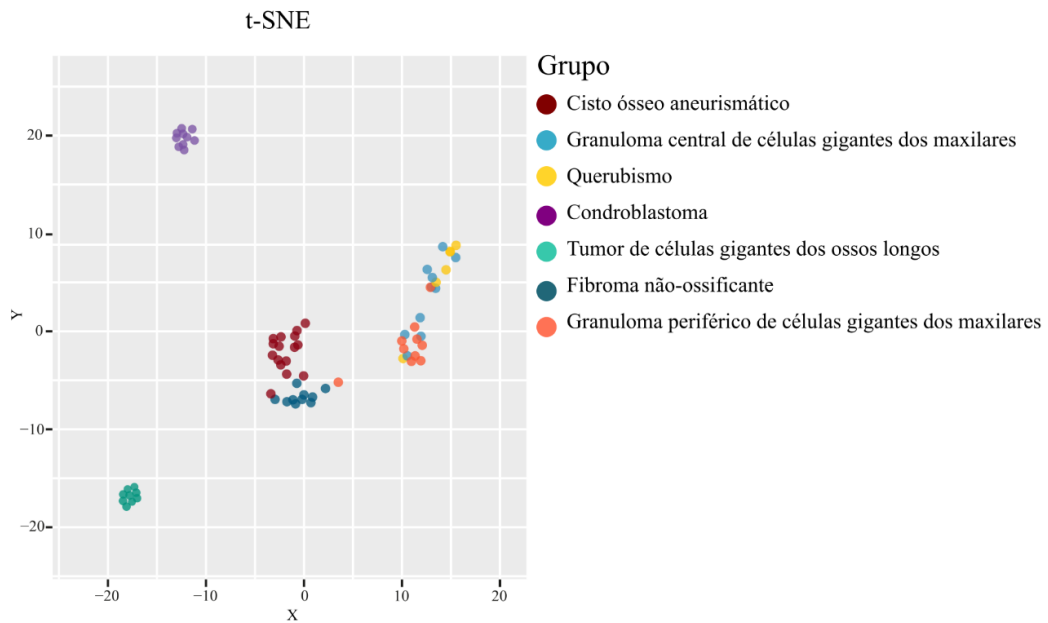


Figura 7- Método de redução de dimensionalidade t-Distributed Stochastic Neighbour Embedding (t-SNE). t-SNE mostrando padrão de agrupamento similar ao revelado pela análise UMAP, baseado no perfil de metilação do DNA. Os seguintes parâmetros foram utilizados: número de CpGs = 10.000; *perplexity value* = 10; *iterations* = 3.000; *theta* = 0; *eta* = 200.

Fonte: Produção do próprio autor.

5.3 Metilação diferencial de sítios CpG e análise de enriquecimento do *Gene Ontology* (GO)

Considerando que os granulomas esporádicos de células gigantes central e periférico e o querubismo compartilham um padrão de metilação do DNA semelhante, avaliou-se a distribuição da metilação de sítios CpG em regiões funcionais e realizou-se uma análise de metilação diferencial para avaliar DMPs entre esses grupos.

Os valores β da metilação global e de sítios CpG associados a *enhancer* mostraram um padrão de distribuição similar entre os grupos, com o querubismo mostrando o valor mediano de metilação CpG mais baixo nessas regiões e o granuloma periférico de células gigantes apresentando o valor mais alto. Por outro lado, os valores de metilação do DNA em sítios CpG de regiões promotoras mostraram padrão de distribuição diferente, com o querubismo apresentando valor mediano de metilação aumentado em promotores quando comparando aos granulomas esporádicos de células gigantes, tanto central quanto periférico (FIGURA 8A).

A análise de metilação diferencial revelou número significativo de genes diferencialmente metilados apenas quando querubismo e granuloma periférico de células gigantes foram comparados ($n = 2.394$) (FIGURA 8B). Os genes diferencialmente metilados mais significativos entre granuloma periférico de células gigantes e querubismo estão destacados em azul no *Volcano plot* (FIGURA 9). Embora vários termos GO tenham sido

observados na análise de enriquecimento, nenhum termo apresentou enriquecimento significativo com base na *false discovery rate* (FDR) (GUIMARÃES *et al.*, 2023)¹.

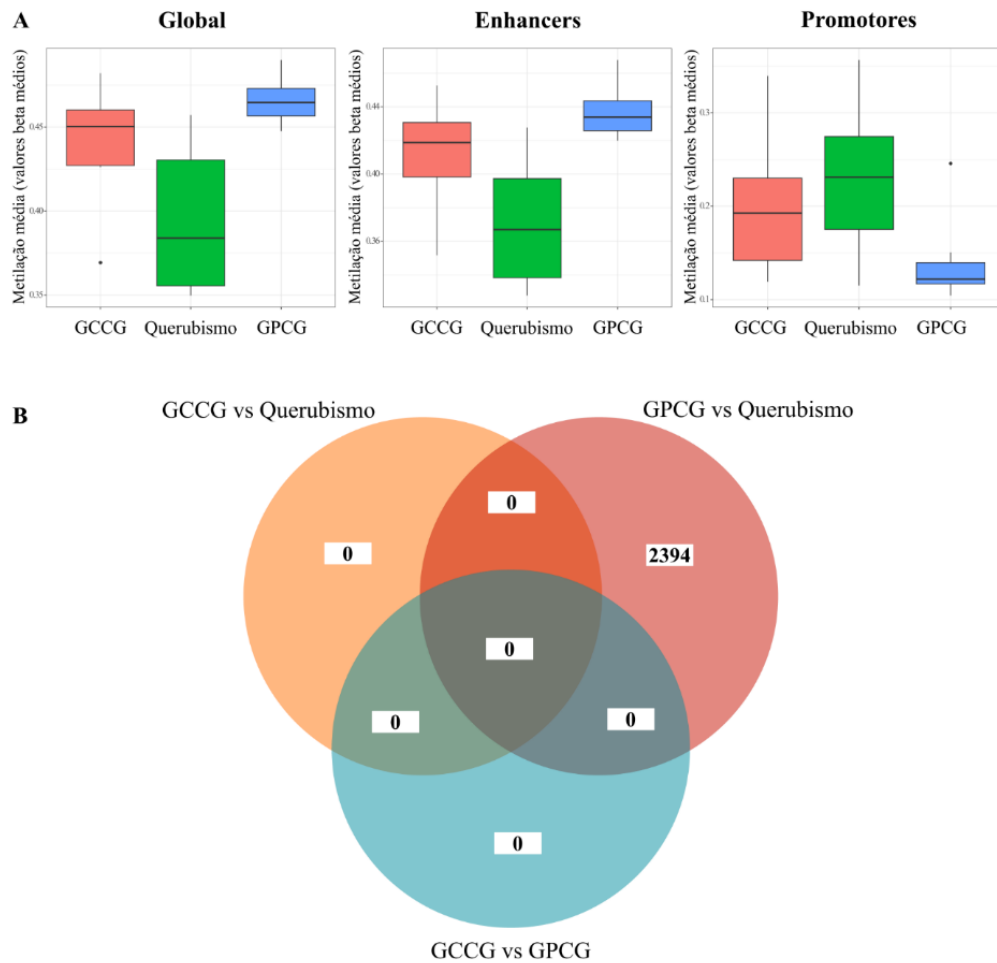


Figura 8 - Comparação dos níveis de metilação do DNA global e em regiões funcionais entre amostras de querubismo e granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares. **(A)** *Box plots* representando os níveis de metilação do DNA em lesões ricas em células gigantes dos maxilares. Níveis de metilação do DNA global e em sítios CpG associados a *enhancer* e a promotor (valores β) dos granulomas centrais de células gigantes dos maxilares (GCCG), querubismo e granulomas periféricos de células gigantes dos maxilares (GPCG). **(B)** Diagrama de Venn representando o número de genes diferencialmente metilados identificados pela análise de metilação diferencial entre GCCG, GPCG e querubismo. Genes com metilação diferencial estatisticamente significativa foram observados entre o GPCG e o querubismo.

¹ A tabela com os resultados da análise de enriquecimento GO foi publicada como material suplementar do artigo científico contendo os resultados da tese (GUIMARÃES, L. M. et al. DNA methylation profile discriminates sporadic giant cell granulomas of the jaws and cherubism from their giant cell-rich histological mimics. *J Pathol Clin Res*, Oxford, v. 9, n. 6, p. 464-474, Nov. 2023), o qual se encontra também no Apêndice A.

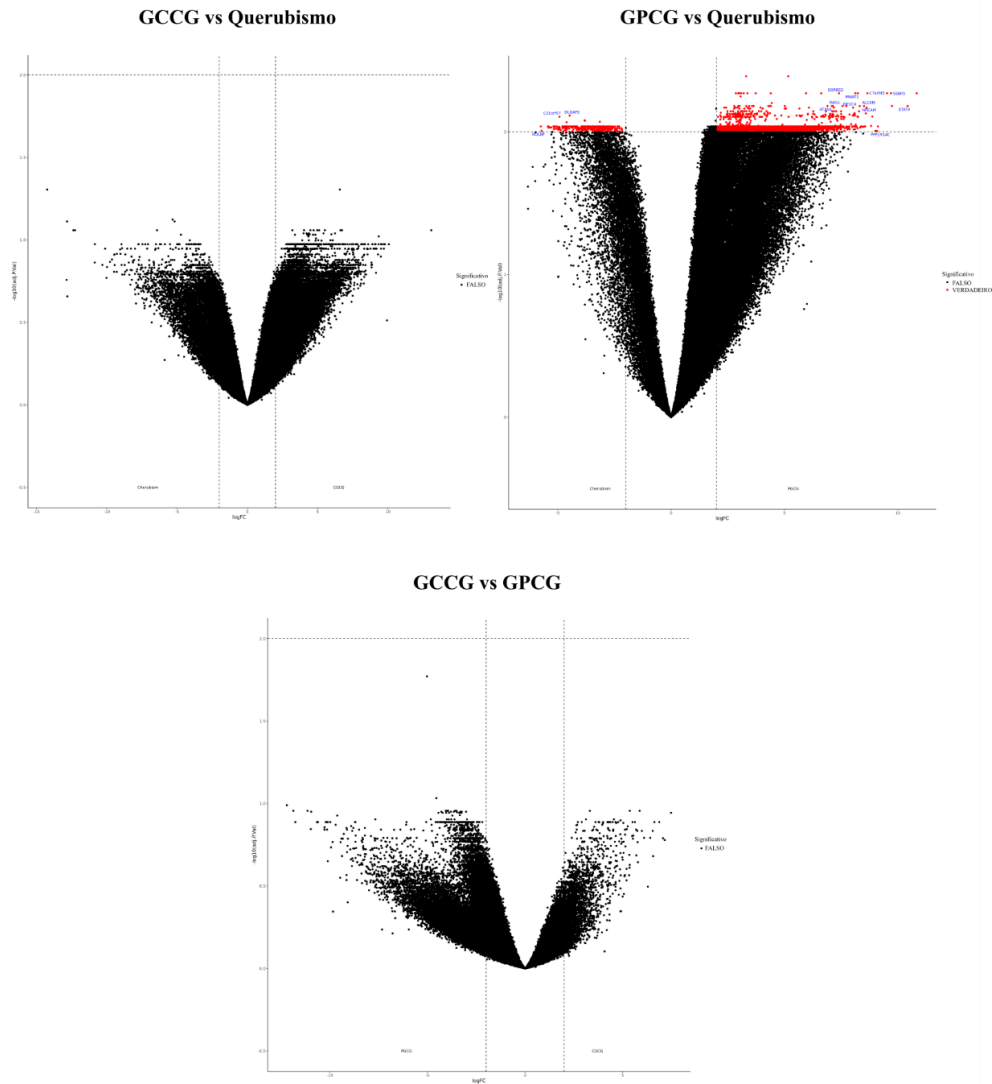


Figura 9 - Volcano plots mostrando sítios CpG diferencialmente metilados entre granuloma central de células gigantes dos maxilares (GCCG) versus querubismo, granuloma periférico de células gigantes dos maxilares (GPCG) versus querubismo e GCCG versus GPCG. Log2 fold change nos valores de metilação é plotado no eixo X e os valores ajustados de p transformados para $-\log_{10}$ dos resultados do teste correspondente estão no eixo Y. Os sítios CpG e os genes com metilação diferencial estatisticamente significativa estão destacados em vermelho e azul, respectivamente. CpGs diferencialmente metilados e genes com metilação diferencial estatisticamente significativa foram observados entre o GPCG e o querubismo.

Fonte: Produção do próprio autor

5.4 Análise de variações do número de cópias

Nenhuma das amostras incluídas no estudo (granulomas esporádicos de células gigantes, querubismo, fibroma não-ossificante, cisto ósseo-aneurismático, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma) apresentou um padrão consistente em relação a ganhos ou perdas de braços ou segmentos cromossômicos (dados não mostrados).

6 DISCUSSÃO

No presente estudo, foram explorados e comparados pela primeira vez os padrões de metilação do DNA de lesões ricas em células gigantes semelhantes a osteoclastos que afetam os ossos maxilares, tanto esporádicas como associadas a síndrome (querubismo), e seus mimetizadores histológicos. Nossos dados mostram que granulomas esporádicos de células gigantes centrais compartilham o padrão de metilação do DNA com uma fração de sua contraparte periférica e com o querubismo, enquanto o fibroma não-ossificante, o cisto ósseo aneurismático, o tumor de células gigantes dos ossos longos e o condroblastoma possuem padrões distintos dos granulomas esporádicos de células gigantes e do querubismo.

Desenvolvimentos recentes em pesquisa no campo da epigenética tem demonstrado que abordagens de aprendizado de máquina baseadas em dados de metilação do DNA são altamente confiáveis para o diagnóstico de outros tumores, como tumores do sistema nervoso central e, de maneira menos acentuada, para a classificação de tumores ósseos e de tecidos moles (CAPPER *et al.*, 2018; KOELSCHE *et al.*, 2021; LYSKJAER *et al.*, 2021). Além de auxiliar no diagnóstico, investigações epigenéticas permitiram a identificação de novas entidades de tumores do sistema nervosa central (CAPPER *et al.*, 2018; PEREZ; CAPPER, 2020). Em outro contexto neoplásico, análises de metilação do DNA foram conduzidas para investigar se o perfil epigenético poderia ser útil para diferenciar sítios de origem de melanomas em metástases (JURMEISTER *et al.*, 2022a). A análise revelou que melanomas originados de diferentes sítios (mucosos, da conjuntiva e melanomas cutâneos) compartilham um perfil global de metilação do DNA comum, mostrando que testar o perfil global de metilação do DNA não é viável para distingui-los. Entretanto, a investigação em nível dos genes demonstrou que as frequências de metilação do promotor em genes específicos relacionados ao câncer diferem entre os sítios primários de melanoma (JURMEISTER *et al.*, 2022a). Além das neoplasias, perfis de metilação do DNA também tem sido explorados para a classificação de lesões em diferentes contextos, como por exemplo em malformações cerebrais e condições reativas (lesões reativas mesoteliais) (JABARI *et al.*, 2022; BERTERO *et al.*, 2021).

A metilação do DNA participa no desenvolvimento ósseo e na diferenciação de osteoclastos (DE ANDRÉS *et al.*, 2013; NISHIKAWA *et al.*, 2015). Experimentos *in vitro* demonstraram que a metilação do DNA (especialmente via *de novo* Dnmt3a) tem um papel importante na diferenciação osteoclástica da linhagem monocítica-macrofágica induzida por RANKL (NISHIKAWA *et al.*, 2015). Diferenciação ineficiente de osteoclastos ocorreu em precursores osteoclásticos com deficiência de *Dnmt3a* e massa óssea elevada foi observada em

animais com deficiência em *Dnmt3a* osteoclasto-específica, como consequência da diminuição na quantidade de osteoclastos (NISHIKAWA *et al.*, 2015). Uma vez que a metilação do DNA é importante na diferenciação dos osteoclastos e na reabsorção óssea em condições homeostáticas, é plausível que as alterações epigenéticas tenham relevância na patogênese dos tumores ósseos, como os incluídos no presente trabalho, embora tal análise esteja além do objetivo deste estudo. Todos os tumores incluídos no presente estudo são caracterizados por quantidade variável de células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; BAUMHOER *et al.*, 2019). No entanto, até o presente momento, a grande maioria das investigações moleculares desses tumores se concentrou em alterações genéticas (FIGURA 10).

Os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares são caracterizados por mutações somáticas, heterozigóticas e com ganho de função nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*, as quais foram detectadas em 72% (42/58) dos casos (GOMES *et al.*, 2018) (FIGURA 10). Especificamente as mutações detectadas foram *KRAS* p.G12D/A, p.G13D, p.A146V/P, p.V14L, p.L19F e p.G10E; *FGFR1* p.N330I e p.C381R; e *TRPV4* p.M713V/I, sendo que mutações em *TRPV4* foram detectadas exclusivamente em granulomas centrais (GOMES *et al.*, 2018). Tais mutações são restritas às células mononucleares das lesões (MIGUITA *et al.*, 2022) e convergem para ativação da via de sinalização MAPK/ERK (GOMES *et al.*, 2018). Nenhuma outra mutação patogênica recorrente ou genes de fusão foram identificados nos 30% restantes de casos “triple wild-type” (GOMES *et al.*, 2018). De forma importante, granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais e periféricos se agruparam quando foram comparados quanto ao padrão de metilação do DNA, independentemente do *background* genético (positivo para mutação *KRAS*, *FGFR1* ou *TRPV4*), como mostrado na Tabela 2.

Apesar das similaridades microscópicas entre os granulomas esporádicos de células gigantes e o querubismo, essas lesões são geneticamente distintas. Mutações no éxon 9 do gene *SH3BP2* podem ser encontradas em 80-90% dos casos de querubismo, afetando os resíduos da proteína SH3BP2 nas posições 415, 418, 419 e 420 em uma sequência de seis aminoácidos (RSPPDG) (NM_001122681.2) (UEKI *et al.*, 2001; CHRCANOVIC *et al.*, 2021) (FIGURA 10). Embora as funções da proteína SH3BP2 não tenham sido totalmente elucidadas, foram sugeridas interações com a via MAPK/ERK (SCHREUDER *et al.*, 2021), embora ainda precisem ser testadas e confirmadas. O gene *SH3BP2* possui regiões ricas em C/G e mais de 42 ilhas CpG que são alvos da regulação gênica por metilação do DNA, o que provavelmente o torna suscetível à regulação por mecanismos epigenéticos (FAN *et al.*, 2012).

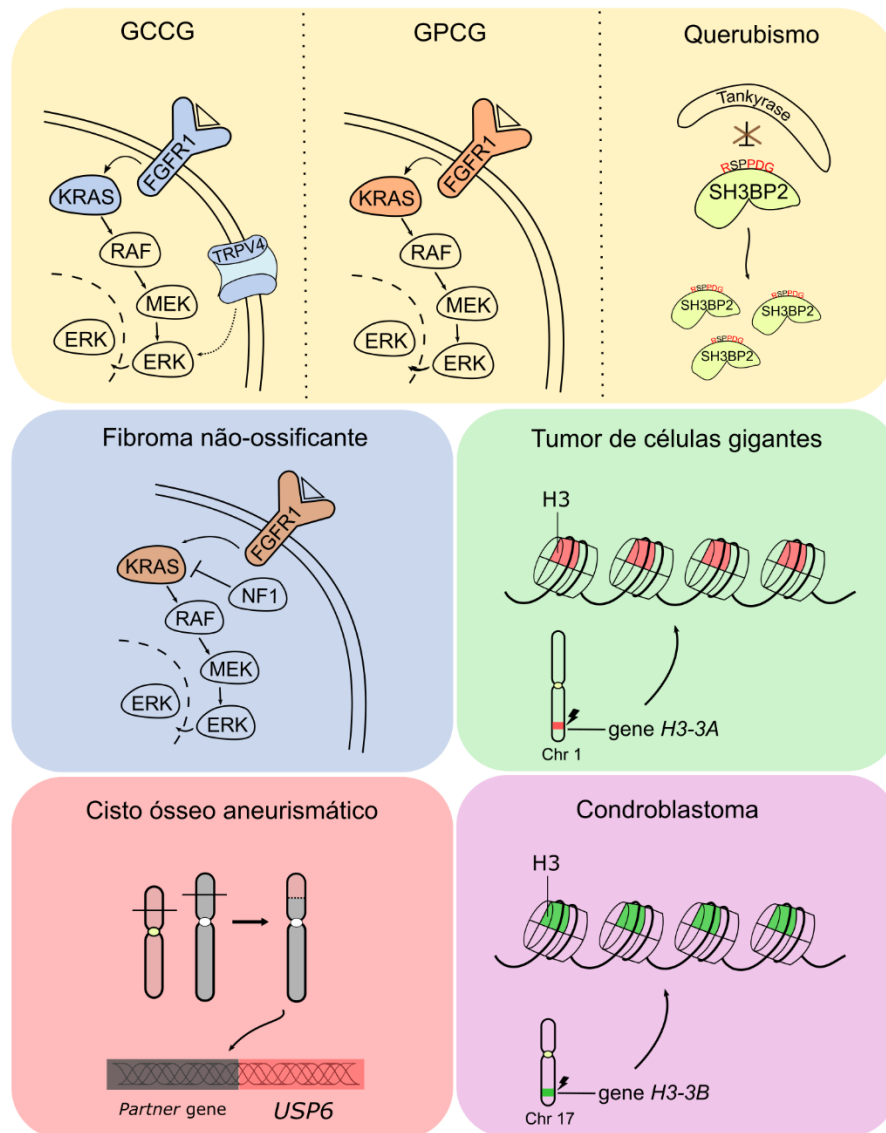


Figura 10 - Alterações genéticas dos tumores ricos em células gigantes agrupados com base em seus padrões de metilação de DNA. Granuloma central de células gigantes dos maxilares (GCCG), granuloma periférico de células gigantes dos maxilares (GPCG) e querubismo são caracterizados por mutações nos genes *KRAS/FGFR1/TRPV4*, *KRAS/FGFR1* e *SH3BP2*, respectivamente, e se agruparam na análise de metilação do DNA (fundo laranja). A perda do sítio de reconhecimento da proteína SH3BP2 pelas proteínas Tanquirases como consequência da mutação *SH3BP2* do querubismo é responsável pelo acúmulo da SH3BP2 no citoplasma e aumento da osteoclastogênese (GUETTLER *et al.*, 2011; LEVAOT *et al.*, 2011). O fibroma não-ossificante se assemelha aos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares em nível genético, uma vez que é caracterizado por mutações *KRAS* e *FGFR1*, além de mutações em *NF1* em casos associados a neurofibromatose tipo 1 (BAUMHOER *et al.*, 2019). No entanto, com a análise da metilação do DNA, o fibroma não-ossificante (fundo azul) foi separado dos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares. O cisto ósseo aneurismático, o tumor de células gigantes dos ossos longos e o condroblastoma, que são caracterizados por rearranjos do gene *USP6*, mutações nos genes *H3-3A* e no gene *H3-3B*, respectivamente, formaram três *clusters* distintos e individualizados (fundos vermelho, verde e roxo).

Fonte: Produção do próprio autor

De forma interessante, a presente análise de metilação do DNA mostrou que as amostras de querubismo se agruparam junto com os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares centrais, destacando que as similaridades estendem do nível microscópico ao epigenético, apesar das diferenças genéticas. Análises futuras com maior número de amostras seriam necessárias para confirmar a tendência do granuloma periférico de células gigantes dos maxilares em formar um *cluster* separado, com o granuloma central de células gigantes e o querubismo juntos formando outro. O querubismo apresentou os menores valores medianos de metilação global e de sítios CpG associados a *enhancer* e o valor mediano mais altos nos promotores, em comparação com ambos os granulomas de células gigantes central e periférico. A significância biológica dessa distribuição de metilação ainda precisa ser esclarecida. Tais investigações futuras podem auxiliar no entendimento da patogênese desses tumores, indicar marcadores epigenéticos e abrir caminho para abordagens terapêuticas direcionadas à metilação do DNA.

Genes diferencialmente metilados foram observados apenas entre os granulomas de células gigantes periféricos e o querubismo, em consonância com o que foi observado na análise não supervisionada. A análise de enriquecimento do GO não foi capaz de identificar processos biológicos, funções moleculares ou componentes celulares diferentemente afetados de forma significativa pela metilação de sítios CpG entre esses grupos. Estudos futuros, incluindo coortes maiores, podem ser benéficos para análises de metilação diferencial, bem como de enriquecimento do GO entre essas lesões esporádicas e síndromicas, podendo refinar ainda mais o entendimento da patogênese molecular dessas lesões.

Fibromas não-ossificantes dos ossos longos compartilham similaridades histológicas e genéticas com os granulomas de células gigantes dos maxilares (BAUMHOER *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2020), entretanto, os resultados do presente estudo demonstram que esses tumores apresentam padrões de metilação do DNA distintos. Mutações no gene *KRAS* (incluindo as *hotspots* p.G12A/D/V e p.G13D e outras variantes como p.K117N, p.A146P/T/V, p.Q61R/L e p.A11Q) foram reportadas em 64,4% dos fibromas não-ossificantes dos ossos longos (BAUMHOER *et al.*, 2019) (FIGURA 10). As mesmas mutações no gene *FGFR1* descritas nos granulomas de células gigantes dos maxilares foram detectadas em 13,6% dos fibromas não-ossificantes (BAUMHOER *et al.*, 2019) (FIGURA 10). Devido a essas características genéticas semelhantes, entre outras similaridades, foi sugerido previamente que os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e os fibromas não-ossificantes possam fazer parte do espectro de uma mesma doença (BOVÉE; HOGENDOORN, 2019; GOMES; GOMEZ, 2019; GOMES *et al.*, 2020). Notavelmente, tanto a análise UMAP quanto

o agrupamento hierárquico não supervisionado foram capazes de separá-los. Além disso, os fibromas não-ossificantes também apresentaram padrão de metilação do DNA distinto dos cistos ósseos aneurismáticos, os quais são caracterizados por rearranjos do gene *USP6* causados por translocações cromossômicas envolvendo o locus 17p13 (OLIVEIRA *et al.*, 2004a) (FIGURA 10). Sabe-se que rearranjos cromossômicos podem ser causados por ação de transposons (BALACHANDRAN *et al.*, 2022), elementos transponíveis do genoma que são silenciados pela metilação do DNA (GREENBERG; BOURC'HIS, 2019). Estudos futuros podem elucidar se a presença de rearranjos do gene *USP6* no cisto ósseo aneurismático está relacionada a alterações de metilação do DNA. Nenhum gene de fusão, incluindo aqueles envolvendo rearranjos do gene *USP6*, foram detectados nos granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018).

Os tumores de células gigantes dos ossos longos são caracterizados por mutações no gene *H3-3A* (um dos dois genes da histona H3.3), as quais foram descritas em 94% (134/142) dos casos, sendo p.G34W a mais comum, detectada em 92% (131/142) dos tumores (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015). Foi demonstrado que essas mutações estão restritas à população celular mononuclear “estromal” e ausentes nos osteoclastos e seus precursores, ressaltando esta população específica de células mononucleares como o componente neoplásico da lesão (BEHJATI *et al.*, 2013). Embora a mutação H3.3 p.G34W afete um resíduo que não sofre modificação pós-traducional direta por metilação de histona, ela indiretamente afeta a metilação de H3K36 e H3K27, levando a remodelação epigenética em todo o genoma, cross-talk com a metilação do DNA, e tumorigênese do tumor de células gigantes dos ossos longos (KHAZAEI *et al.*, 2020). Mutações em *H3-3A* e em outros genes que codificam 15 variantes da histona H3 não foram encontradas em granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares (GOMES *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2018). A análise de agrupamento não supervisionado de perfis de metilação do DNA revelou previamente que os tumores de células gigantes dos ossos longos são distintos dos tumores ósseos malignos primários com mutação p.G34 H3.3 (FITALL *et al.*, 2020). Além disso, por meio da análise de sítios diferencialmente metilados identificou-se hipermetilação da região promotora do gene *CCND1* (cyclin D1 gene) como um evento específico dos tumores de células gigantes dos ossos longos (FITALL *et al.*, 2020). Esses resultados destacam a utilidade da análise de metilação do DNA para predição de agressividade em casos de tumor de células gigantes dos ossos longos com diagnóstico desafiador e também sua utilidade promissora na identificação de marcadores epigenéticos. Em consonância com o comportamento clínico discrepante entre tumores de células gigantes dos

ossos longos e granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares, esses tumores também apresentam padrões de metilação do DNA distintos.

Os tumores de células gigantes dos ossos longos e os condroblastomas formam *clusters* distintos quanto ao padrão de metilação do DNA (FITALL *et al.*, 2020) (FIGURA 6). De forma similar ao tumor de células gigantes dos ossos longos, o condroblastoma também apresenta alterações na histona H3.3 (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015). No entanto, a mutação mais comum é a p.K36M no gene *H3-3B*, a qual foi detectada em 87,5% (70/80) dos casos, enquanto a mutação p.K36M no *H3-3A* foi encontrada em apenas 12,5% (10/80) dos casos com mutação (BEHJATI *et al.*, 2013; PRESNEAU *et al.*, 2015). Pode-se especular que, como há um cross-talk entre metilação do DNA e modificação de histonas (MOORE; LE; FAN, 2013), as mutações específicas que afetam glicina 34 ou lisina 36 na histona H3.3 podem ser a razão para a clara discriminação entre o tumor de células gigantes dos ossos longos e o condroblastoma pela análise de metilação do DNA. Além disso, o fato de mutações em genes que codificam a histona H3.3 levarem a alterações epigenéticas em todo o genoma pode também explicar a dissociação do tumor de células gigantes dos ossos longos e do condroblastoma dos outros tumores ósseos que não apresentam mutações em genes de histonas.

Uma limitação deste estudo é que granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e querubismo foram comparados a outros tumores ósseos ocorrendo em locais diferentes, incluindo o esqueleto axial ou apendicular. Essa limitação, no entanto, é inerente aos tipos de tumores investigados. Muitas descobertas de novos marcadores diagnósticos derivam de estudos que comparam a expressão de RNA ou de proteínas entre amostras de diferentes localizações. Estudos futuros incluindo amostras de tumores ocorrendo no mesmo local podem ser úteis para validação dos nossos resultados.

7 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos conclui-se que os granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e as lesões de células gigantes associadas ao querubismo compartilham perfis de metilação do DNA similares. Baseado na classificação morfológica e molecular atual, a análise de metilação do DNA não contribui para a distinção entre as entidades, embora o granuloma periférico de células gigantes e o querubismo tendam a formar subgrupos discretamente distintos. Por outro lado, a análise de metilação do DNA pode distinguir entre granulomas esporádicos de células gigantes dos maxilares e seus mimetizadores histológicos ricos em células gigantes do tipo osteoclasto, incluindo fibroma não-ossificante, cisto ósseo aneurismático, tumor de células gigantes dos ossos longos e condroblastoma.

REFERÊNCIAS

- ABDELSAYED, R. A.; SHARMA, S.; FERGUSON, H. Fibrous cortical defect (nonossifying fibroma) of the mandibular ramus: report of 2 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, St. Louis, v. 110, n. 4, p. 504-508, Oct. 2010.
- AMARAL, F. R. *et al.* Quantitative expression analysis of apoptotic/antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. **Tumour Biol**, Tokyo, v. 32, n. 5, p. 997-1003, Oct. 2011.
- ASANO, Y. *et al.* E3-ubiquitin ligases and recent progress in osteoimmunology. **Front Immunol**, Lausanne, v. 14, p. 120710, Feb. 2023.
- BABINA, I. S.; TURNER, N. C. Advances and challenges in targeting FGFR signaling in cancer. **Nat Rev Cancer**, London, v. 17, n. 5, p. 318-332, May. 2017
- BALACHANDRAN, P. *et al.* Transposable element-mediated rearrangements are prevalent in human genomes. **Nat Commun**, London, v. 13, n. 1, p. 7115, Nov. 2022.
- BAUMHOER, D. Activating mutations in the MAP-kinase pathway define non-ossifying fibroma of bone. **J Pathol**, London, v. 248, n. 1, p. 116-122, May. 2019.
- BAYLIN, S. B.; JONES, P. A. Epigenetic Determinants of Cancer. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, Woodbury, v. 8, n. 9, p. a019505, Sept. 2016.
- BEHJATI, S. *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nat Genet**, New York, v. 45, n. 12, p. 1479-1482, Dec. 2013.
- BERENDSEN, A. D.; OLSEN, B. R. Tankyrase loses its grip on SH3BP2 in cherubism. **Cell**, Cambridge, v. 147, n. 6, p. 1222-1223, Dec. 2011.
- BERTERO, L. *et al.* DNA Methylation Profiling Discriminates between Malignant Pleural Mesothelioma and Neoplastic or Reactive Histologic Mimics. **J Mol Diagn**, Bethesda, v. 23, n. 7, p. 834-846, July. 2021.
- BLACKBURN, P. R. *et al.* RNA sequencing identifies a novel USP9X-USP6 promoter swap gene fusion in a primary aneurysmal bone cyst. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 58, n. 8, p. 589-594, Aug. 2019.

BOVÉE, J. V.; HOGENDOORN, P. C. Non-ossifying fibroma: A RAS-MAPK driven benign bone neoplasm. **J Pathol**, London, v. 248, n. 2, p. 127-130, June. 2019.

BUI, P. *et al.* Chondroblastoma of the temporomandibular joint: report of a case and literature review. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 67, n. 2, p. 405-409, Feb. 2009.

CAPPER, D. *et al.* DNA methylation-based classification of central nervous system tumours. **Nature**, London, v. 555, n. 7697, p. 469-474, Mar. 2018.

CHEN, H. **Package VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots**. 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/web/packages/VennDiagram/VennDiagram.pdf>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

CHRCANOVIC, B. R.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Central giant cell lesion of the jaws: An updated analysis of 2270 cases reported in the literature. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 47, n. 8, p. 731-739, Sept. 2018a.

CHRCANOVIC, B. R.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Peripheral giant cell granuloma associated with dental implants: a systematic review. **J Stomatol Oral Maxillofac Surg**, Issy les Moulineaux Cedex, v. 120, n. 5, p. 456-461, Nov. 2019.

CHRCANOVIC, B. R.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Peripheral giant cell granuloma: An updated analysis of 2824 cases reported in the literature. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 47, n. 5, p. 454-459, May. 2018b.

CHRCANOVIC, B. R. *et al.* Cherubism: A Systematic Literature Review of Clinical and Molecular Aspects. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 50, n. 1, p. 43-53, Jan. 2021.

CHRCANOVIC, B. R. *et al.* Clinical factors associated with the recurrence of central giant cell lesions. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 48, n. 9, p. 799-802, Oct. 2019.

CHRCANOVIC, B. R. *et al.* Non-ossifying fibroma (metaphyseal fibrous defect) of the mandible. **Oral Maxillofac Surg**, Berlin, v. 15, n. 4, p. 233-237, Dec. 2011.

CLEVEN, A. H. G. *et al.* Oestrogen receptor expression distinguishes non-ossifying fibroma from other giant cell containing bone tumours. **Virchows Arch**, Berlin, v. 481, n. 4, p. 671-675, Oct. 2022.

CLEVEN, A. H. G. *et al.* Mutation Analysis of H3F3A and H3F3B as a Diagnostic Tool for Giant Cell Tumor of Bone and Chondroblastoma. **Am J Surg Pathol**, New York, v. 39, n. 1, p. 1576-1583, Nov. 2015.

DAENEKAS, B. *et al.* Conumee 2.0: enhanced copy-number variation analysis from DNA methylation arrays for humans and mice. **Bioinformatics**, Oxford, v. 40, n. 2, p. btae029, Feb. 2024.

DE ANDRÉS, M. C. *et al.* Epigenetic regulation during fetal femur development: DNA methylation matters. **PLoS One**, San Francisco, v. 8, n. 1, p. e54957, Jan. 2013.

DSTICHEL. **CNsummaryplots**. GitHub. 2020. Disponível em: <https://github.com/dstichel/CNsummaryplots>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

DOS REIS, M. B. *et al.* Prognostic Classifier Based on Genome-Wide DNA Methylation Profiling in Well-Differentiated Thyroid Tumors. **J Clin Endocrinol Metab**, Springfield, v. 102, n. 11, p. 4089-4099, Nov. 2017.

DUARTE, A. P. *et al.* Increased expression of NFATc1 in giant cell lesions of the jaws, cherubism and brown tumor of hyperparathyroidism. **Oncol Lett**, Athens, v. 2, n. 3, p. 571-573, May, 2011.

FAN, C. *et al.* Cloning and characterization of the human SH3BP2 promoter. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 425, n. 1, p. 25-32, Aug. 2012.

FANG, D. *et al.* The histone H3.3K36M mutation reprograms the epigenome of chondroblastomas. **Science**, New York, v. 352, n. 6291, p. 1344-1348, June. 2016.

FITTALL, M. W. *et al.* Drivers underpinning the malignant transformation of giant cell tumour of bone. **J Pathol**, London, v. 252, n. 4, p. 433-440, Dec. 2020.

FLANAGAN, A. M.; SPEIGHT, P. M. Giant cell lesions of the craniofacial bones. **Head Neck Pathol**, New York, v. 8, n. 4, p. 445-453, Dec. 2014.

GOMES, C. C. *et al.* Making sense of giant cell lesions of the jaws (GCLJ): lessons learned from next-generation sequencing. **J Pathol**, v. 250, n. 2, p. 126-133, Feb. 2020.

GOMES, C. C. *et al.* The highly prevalent H3F3A mutation in giant cell tumours of bone is not shared by sporadic central giant cell lesion of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, New York, v. 118, n. 5, p. 583-585, Nov. 2014.

GOMES, C. C. *et al.* TRPV4 and KRAS and FGFR1 gain-of-function mutations drive giant cell lesions of the jaw. **Nat Commun**, London, v. 9, n. 1, p. 4572, Nov. 2018.

GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. MAPK pathway-activating mutations drive giant cell lesions of the jaws and non-ossifying fibromas of bone. **J Pathol**, London, v. 248, n. 1, p. 123-124, May. 2019.

GOMEZ, R. S.; FLANAGAN, A. M. Cherubism. In: **WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and Neck Tumours**. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2023.

GREENBERG, M. V. C.; BOURC'HIS, D. The diverse roles of DNA methylation in mammalian development and disease. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v. 20, n. 10, p. 590-607, Oct. 2019.

GUETTLER, S. *et al.* Structural Basis and Sequence Rules for Substrate Recognition by Tankyrase Explain the Basis for Cherubism Disease. **Cell**, Cambridge, v. 147, n. 6, p. 1340-1354, Dec. 2011.

GUIMARÃES, L. M. *et al.* DNA methylation profile discriminates sporadic giant cell granulomas of the jaws and cherubism from their giant cell-rich histological mimics. **J Pathol Clin Res**, Oxford, v. 9, n. 6, p. 464-474, Nov. 2023.

GUIMARÃES, L. M. *et al.* KRAS mutations in brown tumor of the jaws in hyperparathyroidism. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 49, n. 8, p. 796-802, Sept. 2020.

GUIMARÃES, L. M. Manifestations of hyperparathyroidism in the jaws: Concepts, mechanisms, and clinical aspects. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, New York, v. 133, n. 5, p. 547-555, May. 2022.

GUSEVA, N. V. *et al.* Anchored multiplex PCR for targeted next-generation sequencing reveals recurrent and novel USP6 fusions and upregulation of USP6 expression in aneurysmal bone cyst. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 56, n. 4, p. 266-277, Apr. 2017.

HAIGIS, K. M. KRAS Alleles: The Devil Is in the Detail. **Trends Cancer**, Cambridge, v. 3, n. 10, p. 686-697, Oct. 2017.

HOVESTADT, V.; ZAPATKA, M. conumee: Enhanced copy-number variation analysis using Illumina DNA methylation arrays. R package version 1.9.0. 2015. Disponível em: <http://bioconductor.org/packages/conumee/>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

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

IZUMI, K. Disorders of Transcriptional Regulation: An Emerging Category of Multiple Malformation Syndromes. **Mol Syndromol**, Basel, v. 7, n. 5, p. 262-273, Oct. 2016.

JABARI, S. *et al.* DNA methylation-based classification of malformations of cortical development in the human brain. **Acta Neuropathol**, Berlin, v. 143, n. 1, p. 93-104, Jan. 2022.

JAMBHEKAR, A.; DHALL, A.; SHI, Y. Roles and regulation of histone methylation in animal development. **Nat Rev Mol Cell Biol**, London, v. 20, n. 10, p. 625-641, Oct. 2019.

JONES, P. A. *et al.* Epigenetic Therapy in Immune-Oncology. **Nat Rev Cancer**, London, v. 19, n. 3, p. 151-161, Mar. 2019.

JONES, W. A. Familial multilocular cystic disease of the jaws. **Am J Cancer**, v.17, n. 4, p. 946-950, Apr. 1933.

JORDAN, R. C.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Central giant cell granuloma. In: **WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and Neck Tumours**. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2023a.

JORDAN, R. C.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Peripheral giant cell granuloma. In: **WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and Neck Tumours**. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2023b.

JOYNER, C. J. *et al.* Phenotypic characterisation of mononuclear and multinucleated cells of giant cell tumour of bone. **Bone Miner**, Amsterdam, v. 16, n. 1, p. 37-48, Jan. 1992.

JURMEISTER, P. *et al.* Mucosal melanomas of different anatomic sites share a common global DNA methylation profile with cutaneous melanoma but show location-dependent patterns of genetic and epigenetic alterations. **J Pathol**, London, v. 256, n. 1, p. 61-70, Jan. 2022a.

JURMEISTER, P. *et al.* DNA methylation-based classification of sinonasal tumors. **Nat Commun**, London, v. 13, n. 1, p. 7148, Nov. 2022b.

KAUR, D. *et al.* Comprehensive Evaluation of The Infinium Human MethylationEPIC v2 BeadChip. **Epigenetics Commun**, London, v. 3, n. 1, p. 6, Sept. 2023.

KHAZAEI, S. *et al.* H3.3 G34W Promotes Growth and Impedes Differentiation of Osteoblast-Like Mesenchymal Progenitors in Giant Cell Tumor of Bone. **Cancer Discov**, Philadelphia, v. 10, n. 12, p. 1968-1987, Dec. 2020.

KIMURA, H. Histone modifications for human epigenome analysis. **J Hum Genet**, Tokyo, v. 58, n. 7, p. 439-445, July. 2013.

KITTAKA, M. *et al.* Loss-of-function OGFRL1 variants identified in autosomal recessive cherubism families. **JBMR Plus**, Chichester, v. 8, n. 6, p. ziae050, Apr. 2024.

KOELSCHE, C. *et al.* Sarcoma classification by DNA methylation profiling. **Nat Commun**, London, v. 12, n. 1, p. 498, Jan. 2021.

LAJOLO, C. *et al.* Brown tumors of the oral cavity: presentation of 4 new cases and a systematic literature review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, New York, v. 129, n. 6, p. 575-584.e4, June. 2020.

LEE, J-Y. *et al.* Investigation of the SH3BP2 Gene Mutation in Cherubism. **Acta Med Okayama**, Okayama, v. 62, n. 3, p. 209-212, June. 2008.

LEE, J-C; HUANG, H-Y. Soft Tissue Special Issue: Giant Cell-Rich Lesions of the Head and Neck Region. **Head Neck Pathol**, Secaucus, v. 14, n. 1, p. 97-108, Mar. 2020.

LEITHNER, A. *et al.* Aneurysmal bone cyst. A population based epidemiologic study and literature review. **Clin Orthop Relat Res**, Philadelphia, v. 363, p. 176-179, June. 1999.

LEVAOT, N. *et al.* Loss of Tankyrase-mediated Destruction of 3BP2 Is the Underlying Pathogenic Mechanism of Cherubism. **Cell**, Cambridge, v. 147, n. 6, p. 1324-1339, Dec. 2011.

LI, E.; BESTOR, T. H.; JAENISCH, R. Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. **Cell**, Cambridge, v. 69, n. 6, p. 915-926, June. 1992.

LI, E.; ZHANG, Y. DNA methylation in mammals. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, Woodbury, v. 6, n. 4, p. a019133, May. 2014.

LI, S.; TOLLEFSBOL, T. O. DNA methylation methods: Global DNA methylation and methylomic analyses. **Methods**, San Diego, v. 187, p. 28-43, Mar. 2021.

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

LIETMAN, S. A.; YIN, L.; LEVINE, M. A. SH3BP2 Is an Activator of NFAT Activity and Osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, New York, v. 371, n. 4, p. 644-648, July. 2008.

LIU, Y. *et al.* Rescue of a cherubism bone marrow stromal culture phenotype by reducing TGF β signaling. **Bone**, Elmsford, v. 111, p. 28-35, June. 2018.

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**, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 367-375, July. 2003.

LYSKJAER, I. *et al.* DNA methylation-based profiling of bone and soft tissue tumours: a validation study of the 'DKFZ Sarcoma Classifier'. **J Pathol Clin Res**, Oxford, v. 7, n. 4, p. 350-360, July. 2021.

MANGION, J. *et al.* The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v. 65, n. 1, p. 151-157, July. 1999.

MENG, X-M.; YU, S-F.; YU, G-Y. Clinicopathologic study of 24 cases of cherubism. **Int J Oral Maxillofac Surg**, Copenhagen, v. 34, n. 4, p. 350-356, June. 2005.

MIGUITA, L. *et al.* Central giant cell granulomas of the jaws stromal cells harbour mutations and have osteogenic differentiation capacity, in vivo and in vitro. **J Oral Pathol Med**, Copenhagen, v. 51, n. 2, p. 206-216, Feb. 2022.

MOORE, L. D.; LE, T.; FAN, G. DNA methylation and its basic function. **Neuropsychopharmacology**, New York, v. 38, n. 1, p. 23-38, Jan. 2013.

MORAN, S.; ARRIBAS, C.; Esteller, M. Validation of a DNA methylation microarray for 850,000 CpG sites of the human genome enriched in enhancer sequences. **Epigenomics**, London, v. 8, n. 3, p. 389-399, Mar. 2016.

MOTAMEDI, M. H. K. *et al.* Variable presentations of aneurysmal bone cysts of the jaws: 51 cases treated during a 30-year period. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v. 66, n. 10, p. 2098-2103, Oct. 2008.

MUKAI, T. *et al.* Loss of SH3 domain-binding protein 2 function suppresses bone destruction in tumor necrosis factor-driven and collagen-induced arthritis in mice. **Arthritis Rheumatol**, Malden, v. 67, n. 3, p. 656-667, Mar. 2015.

MUKAI, T. *et al.* SH3BP2 cherubism mutation potentiates TNF- α -induced osteoclastogenesis via NFATc1 and TNF- α -mediated inflammatory bone loss. **J Bone Miner Res**, New York, v. 29, n. 12, p. 2618-2635, Dec, 2014.

MUKAI, T.; FUJITA, S.; MORITA, Y. Tankyrase (PARP5) Inhibition Induces Bone Loss Through Accumulation of Its Substrate SH3BP2. **Cells**, Basel, v. 8, n. 2, p. 195, Feb. 2019.

NEBBIOSO, A. *et al.* Cancer Epigenetics: Moving Forward. **PLoS Genet**, San Francisco, v. 14, n. 6, p. e1007362, June. 2018.

NILIUS, B.; VOETS, T. The puzzle of TRPV4 channelopathies. **EMBO Rep**, Oxford, v. 14, n. 12, p. 152-163, Feb. 2013.

NISHIKAWA, K. *et al.* DNA methyltransferase 3a regulates osteoclast differentiation by coupling to an S-adenosylmethionine-producing metabolic pathway. **Nat Med**, New York, v. 21, n. 3, p. 281-287, Mar. 2015.

OGURA, K. *et al.* Highly recurrent H3F3A mutations with additional epigenetic regulator alterations in giant cell tumor of bone. **Genes Chromosomes Cancer**, New York, v. 56, n. 10, p. 711-718, Oct. 2017.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* Aneurysmal bone cyst variant translocations upregulate USP6 transcription by promoter swapping with the ZNF9, COL1A1, TRAP150, and OMD genes. **Oncogene**, Basingstoke, v. 24, n. 21, p. 3419-3426, May. 2005.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* USP6 (Tre2) fusion oncogenes in aneurysmal bone cyst. **Cancer Res**, Chicago, v. 64, n. 6, p. 1920-1923, Mar. 2004a.

OLIVEIRA, A. M. *et al.* USP6 and CDH11 oncogenes identify the neoplastic cell in primary aneurysmal bone cysts and are absent in so-called secondary aneurysmal bone cysts. **Am J Pathol**, Philadelphia, v. 165, n. 5, p. 1773-1780, Nov. 2004b.

PAPADAKI, M. E. *et al.* Cherubism: best clinical practice. **Orphanet J Rare Dis**, London, v. 7 Suppl 1, p.S6, May. 2012.

PEREZ, E.; CAPPER, D. Invited Review: DNA methylation-based classification of paediatric brain tumours. **Neuropathol Appl Neurobiol**, Oxford, v. 46, n. 1, p. 28-47, Feb. 2020.

PHIPSON, B.; MAKSIMOVIC, J.; OSHLACK, A. missMethyl: an R package for analyzing data from Illumina's HumanMethylation450 platform. **Bioinformatics**, Oxford, v. 32, n. 2, p. 286-288, Jan. 2016.

PIDSLEY, R. *et al.* Critical evaluation of the Illumina MethylationEPIC BeadChip microarray for whole-genome DNA methylation profiling. **Genome Biol**, London, v. 17, n. 1, p. 208, Oct. 2016.

PORTELA, A.; ESTELLER, M. Epigenetic modifications and human disease. **Nat Biotechnol**, New York, v. 28, n. 10, p. 1057-1068, Oct. 2010.

PRESNEAU, N. *et al.* Diagnostic value of H3F3A mutations in giant cell tumour of bone compared to osteoclast-rich mimics. **J Pathol Clin Res**, Oxford, v. 1, n. 2, p. 113-123, Mar. 2015.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. 2023. Disponível em: <http://www.R-project.org>. Acesso em: 20 de maio de 2023.

REICHENBERGER, E. J. *et al.* The Role of SH3BP2 in the Pathophysiology of Cherubism. **Orphanet J Rare Dis**, London, v. 7 Suppl 1, p. S5, May. 2012.

RITCHIE, M. E. *et al.* limma powers differential expression analyses for RNA-sequencing and microarray studies. **Nucleic Acids Res**, London, v. 43, n. 7, p. e47, Apr. 2015.

ROBERTSON, K. D.; WOLFFE, A. P. DNA methylation in health and disease. **Nat Rev Genet**, v. 1, n. 1, p. 11-19, Oct. 2000.

SARANTOU, S. *et al.* Genetically confirmed coexistence of neurofibromatosis type 1 and Cherubism in a pediatric patient. **Mol Biol Rep**, Dordrecht, v. 51, n. 1, p. 216, Jan. 2024.

SCHREUDER, W. H. *et al.* Multiple versus solitary giant cell lesions of the jaw: Similar or distinct entities? **Bone**, New York, v. 149, p. 115935, Aug. 2021.

ŠEKORANJA, D. *et al.* Primary aneurysmal bone cyst with a novel SPARC-USP6 translocation identified by next-generation sequencing. **Cancer Genet**, New York, v. 228-229, p. 12-16, Dec. 2018.

SHARMA, T. *et al.* Investigating global gene expression changes in a murine model of cherubism. **Bone**, Elmsford, v. 135, p. 115315, June. 2020.

SZENKER, E.; RAY-GALLET, D.; ALMOUZNI, G. The double face of the histone variant H3.3. **Cell Res**, Beijing, v. 21, n. 3, p. 421-434, Mar. 2011.

SOUZA, P.E.; MESQUITA, R. A.; GOMEZ, R. S. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. **Oral Dis**, Basingstoke, v. 6, n. 1, p. 35-39, Jan. 2000.

TIZIANI, V. *et al.* The gene for cherubism maps to chromosome 4p16. **Am J Hum Genet**, Baltimore, v.65, n. 1, p. 158-166, July. 1999.

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

VANDERNIET, J. A. Denosumab for central giant cell granuloma in an Australian tertiary paediatric centre. **Bone**, Elmsford, v. 159, p. 116395, June. 2022.

WARREN, M.; XU, D.; LI, X. Gene fusions PAFAH1B1-USP6 and RUNX2-USP6 in aneurysmal bone cysts identified by next generation sequencing. **Cancer Genet**, New York, v. 212-213, p. 13-18, Apr. 2017.

WHO Classification of Tumours Editorial Board. **Head and Neck Tumours**. 5th ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2023.

WHO Classification of Tumours Editorial Board. **Soft tissue and bone tumours**. 5th. ed. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2020. 607p.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. 2nd ed. Springer: Cham, 2016.

APÊNDICE A – Artigo científico publicado no periódico *The Journal of Pathology* *Clinical Research*

The Journal of Pathology: Clinical Research

J Pathol Clin Res November 2023; 9: 464–474

Published online 9 August 2023 in Wiley Online Library

(wileyonlinelibrary.com). DOI: 10.1002/cjip.2.337

ORIGINAL ARTICLE

DNA methylation profile discriminates sporadic giant cell granulomas of the jaws and cherubism from their giant cell-rich histological mimics

Letícia Martins Guimarães¹, Daniel Baumhoer², Vanghelita Andrei², Dennis Friedel^{3,4}, Christian Koelsche^{3,4,5,6}, Ricardo Santiago Gomez⁷, Andreas von Deimling^{3,4*} and Carolina Cavalieri Gomes^{1*}

¹Department of Pathology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Bone Tumor Reference Centre, Institute of Pathology, University Hospital Basel and University of Basel, Basel, Switzerland

³Department of Neuropathology, Institute of Pathology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

⁴Clinical Cooperation Unit Neuropathology, German Cancer Research Center (DKFZ), German Consortium for Translational Cancer Research (DKTK), Heidelberg, Germany

⁵Department of General Pathology, Institute of Pathology, Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany

⁶Institute of Pathology, Faculty of Medicine, LMU Munich, Munich, Germany

⁷Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

*Correspondence to: Carolina Cavalieri Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil. E-mail: gomes.carolinac@gmail.com, carolinacgomes@ufmg.br; Andreas von Deimling, Department of Neuropathology, Institute of Pathology, Ruprecht-Karls-University Heidelberg, D-69120 Heidelberg, Germany. E-mail: andreas.vondeimling@med.uni-heidelberg.de

Abstract

Sporadic giant cell granulomas (GCGs) of the jaws and cherubism-associated giant cell lesions share histopathological features and microscopic diagnosis alone can be challenging. Additionally, GCG can morphologically closely resemble other giant cell-rich lesions, including non-ossifying fibroma (NOF), aneurysmal bone cyst (ABC), giant cell tumour of bone (GCTB), and chondroblastoma. The epigenetic basis of these giant cell-rich tumours is unclear and DNA methylation profiling has been shown to be clinically useful for the diagnosis of other tumour types. Therefore, we aimed to assess the DNA methylation profile of central and peripheral sporadic GCG and cherubism to test whether DNA methylation patterns can help to distinguish them. Additionally, we compared the DNA methylation profile of these lesions with those of other giant cell-rich mimics to investigate if the microscopic similarities extend to the epigenetic level. DNA methylation analysis was performed for central ($n = 10$) and peripheral ($n = 10$) GCG, cherubism ($n = 6$), NOF ($n = 10$), ABC ($n = 16$), GCTB ($n = 9$), and chondroblastoma ($n = 10$) using the Infinium Human Methylation EPIC Chip. Central and peripheral sporadic GCG and cherubism share a related DNA methylation pattern, with those of peripheral GCG and cherubism appearing slightly distinct, while central GCG shows overlap with both of the former. NOF, ABC, GCTB, and chondroblastoma, on the other hand, have distinct methylation patterns. The global and enhancer-associated CpG DNA methylation values showed a similar distribution pattern among central and peripheral GCG and cherubism, with cherubism showing the lowest and peripheral GCG having the highest median values. By contrast, promoter regions showed a different methylation distribution pattern, with cherubism showing the highest median values. In conclusion, DNA methylation profiling is currently not capable of clearly distinguishing sporadic and cherubism-associated giant cell lesions. Conversely, it could discriminate sporadic GCG of the jaws from their giant cell-rich mimics (NOF, ABC, GCTB, and chondroblastoma).

Keywords: epigenetics; DNA methylation; copy number analysis; giant cell granulomas; cherubism; aneurysmal bone cyst; non-ossifying fibroma; giant cell tumour of bone; chondroblastoma; bone pathology

Received 5 March 2023; Revised 7 June 2023; Accepted 3 July 2023

No conflicts of interest were declared.

© 2023 The Authors. *The Journal of Pathology: Clinical Research* published by The Pathological Society of Great Britain and Ireland and John Wiley & Sons Ltd.

This is an open access article under the terms of the [Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) License, which permits use and distribution in any medium, provided the original work is properly cited, the use is non-commercial and no modifications or adaptations are made.

APÊNDICE B – Atividades adicionais desenvolvidas durante o doutorado

Estão descritas a seguir atividades que foram conduzidas durante o programa de doutorado sanduíche, realizado no laboratório da professora doutora Nada Jabado, na McGill University, em Montreal, no Canadá, no período de 12 meses entre março de 2023 e fevereiro de 2024, pelo programa CAPES-PrInt (Processo: 88887.682969/2022-00). O laboratório liderado pela professora Jabado é um laboratório de ponta, o qual conta com variedade de insumos, infraestrutura e equipamentos modernos e, principalmente, com uma equipe bem treinada e especializada em altíssimo nível. Os trabalhos do grupo da professora Nada Jabado são voltados para a caracterização genética e epigenética de tumores cerebrais e síndromes de neurodesenvolvimento, com foco principalmente em alterações relacionadas a genes codificadores de histonas e modificações pós-traducionais em histonas.

Durante o estágio sanduíche trabalhei ativamente em um projeto desenvolvido pelo grupo, o qual buscava investigar os efeitos moleculares e celulares de mutações germinativas nos genes codificadores da histona H3.3 (genes *H3-3A* e *H3-3B*) descritas em pacientes pediátricos com síndrome de neurodesenvolvimento, apresentando micro ou macrocefalia. Foram gerados três diferentes modelos para o estudo da doença: cultivo celular 2D com células geneticamente modificadas, cultivo celular 3D com geração de organoides cerebrais (mini cérebros) e modelo animal geneticamente modificado. A participação neste projeto proporcionou a oportunidade de aprender e executar uma gama de técnicas envolvidas na geração e utilização desses modelos, as quais estão brevemente descritas e contextualizadas abaixo.

1. Cultura celular 2D

1.1. Cultivo de células-tronco pluripotentes humanas

Para o cultivo celular 2D, foram utilizadas células-tronco pluripotentes induzidas humanas (do inglês *Human Induced Pluripotent Stem Cell*, hiPSC), linhagem NCRM1 derivada do cordão umbilical. As células-tronco foram mantidas em cultura para introdução das mutações de interesse usando a tecnologia CRISPR-Cas9 e posterior diferenciação em células da linhagem neural. As células geneticamente modificadas foram também utilizadas para a geração dos organoides cerebrais.

Para o cultivo das hiPSCs, as placas de Petri foram previamente tratadas com uma matriz extracelular (matrigel) diluída a 1% em meio de cultura (DMEM-F12). A polimerização desta matriz extracelular foi realizada por no mínimo 30 minutos a 37°C e a utilização da mesma

permite que as hIPSCs possam se aderir à superfície da placa. O meio de cultura utilizado para o cultivo das hIPSCs foi o *mTeSR™ Plus Basal Medium*, comercializado pela empresa STEMCELL. Este meio permite a manutenção das células no estágio indiferenciado, pois é enriquecido com FGF2 e é trocado diariamente para evitar a diferenciação celular.

Para a dissociação e passagem das hIPSCs, o reagente ReLeSR (STEMCELL) era utilizado quando as células atingiam a confluência de aproximadamente 80%. O ReLeSR é um reagente não enzimático que dissocia as hIPSCs em pequenos agregados e é capaz de selecionar e destacar da placa apenas as células-tronco pluripotentes.

1.2. Tecnologia CRISPR-Cas9 para edição do genoma das células-tronco

As mutações em histona H3.3 de interesse do projeto eram *H3-3A* p.A29T e *H3-3B* p.A29P em heterozigose, as quais foram descritas em pacientes apresentando macrocefalia e microcefalia, respectivamente (BRYANT *et al.*, 2020). Com o objetivo de estudar os efeitos dessas mutações na diferenciação da linhagem neural, essas mutações foram introduzidas nas hIPSCs por meio da tecnologia revolucionária do CRISPR-Cas9 (FIGURA S1A), a qual permite realizar modificações genéticas em escala celular ou mesmo em um organismo. Posteriormente essas células-tronco mutadas foram diferenciadas em células da linhagem neural e também em organoides cerebrais.

Para a realização do CRISPR-Cas9 no laboratório foram utilizados três componentes principais: um RNA guia de fita simples (gRNA), uma enzima nuclease (Cas9) e um DNA molde (ssODN) contendo as mutações de interesse (FIGURA S1A). O ssODN foi utilizado pelo fato de estarmos gerando um modelo Knock-in (KI).

As hIPSCs foram dissociadas por tratamento enzimático com *accutase* por 10 minutos a 37°C e 5×10^5 células foram ressuspensas em 100 µL de solução tampão (solução de eletroporação) com o complexo ribonucleoproteico (complexo RNP) formado entre o gRNA e a enzima Cas-9. O gRNA é uma sequência de RNA que reconhece especificamente a região alvo do DNA e direciona a Cas9 para a edição genômica.

A suspensão celular, com o complexo RNP, foi transferida para uma cubeta estéril que foi inserida no aparelho de eletroporação (Amaxa Nucleofector) (FIGURA S1A). Neste equipamento, as células foram então submetidas a pulsos elétricos que criam poros na membrana celular, permitindo a entrada do complexo RNP, da Cas-9 e do DNA molde para editar o genoma da célula. As células submetidas ao CRISPR Cas-9 foram então cultivadas novamente em placas de Petri para posterior seleção das células positivas para mutação.

Para a seleção dos clones positivos contendo as mutações de interesse, as células foram dissociadas novamente e cultivadas em baixa densidade, com o objetivo de proliferarem e gerarem colônias distintas na placa. O DNA de aproximadamente 100 colônias formadas para cada mutação foi colhido e amplificado por PCR convencional para investigar a presença da mutação por sequenciamento de Sanger (FIGURA S1B). A reconfirmação da presença da mutação nos clones selecionados foi realizada por meio de sequenciamento de próxima geração (NGS, do inglês *next generation sequencing*), utilizando a tecnologia Illumina MiSeq (FIGURA S1C).

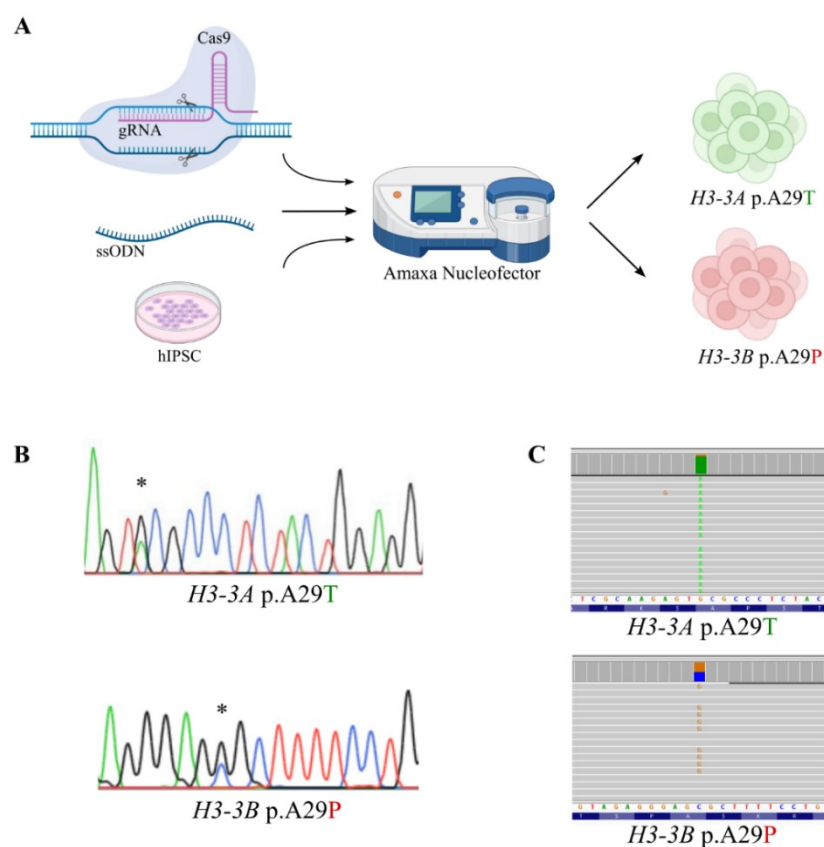


Figura S1 - Esquema da edição do genoma das células-tronco por CRISPR-Cas9 e validação dos clones gerados. **(A)** Componentes utilizados para realização da técnica CRISPR-Cas9 para obtenção das células-tronco com as mutações de interesse. **(B)** Cromatogramas gerados durante a validação dos clones positivos para as mutações *H3-3A p.A29T* e *H3-3B p.A29P* por meio do sequenciamento de Sanger. **(C)** Resultados gerados pela validação dos clones positivos para as mutações *H3-3A p.A29T* e *H3-3B p.A29P* por meio de NGS (MiSeq).

Fonte: Produção do próprio autor (produzida em parte utilizando o BioRender (BioRender.com)).

1.3. Diferenciação das células-tronco em células progenitoras de neurônios e em neurônios

Para avaliar os efeitos das mutações de interesse na diferenciação das células-tronco em linhagem neural, os clones hPSC positivos para mutação selecionados foram diferenciados em

células progenitoras de neurônios (do inglês *human neural progenitor cells*, hNPC) e, posteriormente, em neurônios. Com o objetivo de investigar o efeito das mutações na expressão gênica, nas modificações pós-traducionais na histona H3.3 e na metilação do DNA, células no estágio hNPC foram enviadas para sequenciamento de RNA (NGS, RNAseq), espectrometria de massas, sequenciamento da cromatina por imunoprecipitação (ChIP-seq) e *Whole-genome bisulphite sequencing* (WGBS).

Para a diferenciação das hIPSC em hNPC, as hIPSC foram desprendidas e dissociadas por tratamento com *accutase* e então semeadas a uma densidade de 9.000 células por poço em uma placa de 96 poços, cujos fundos são arredondados e tratados especificamente para evitar a aderência celular. As células foram cultivadas em 150 µL de meio específico para células-tronco com baixa concentração de FGF. As células se agregam e formam corpos embrionários.

Após aproximadamente 3 dias, metade do volume do meio foi substituído gentilmente pelo mesmo meio fresco com adição de 5µM de SB-431542 (inibidor da via TGFβ), 3µM de CHIR e 2µM de Dorsomorfina (inibidor da via BMP) por mais dois dias, para direcionamento das células-tronco para a linhagem neuroectodérmica. Para gerar células progenitoras, os esferoides corticais foram transferidos para placas previamente tratadas com matrigel para aderirem e formarem rosetas neurais com meio de indução neural. O meio de indução foi trocado a cada dois dias até a obtenção de rosetas neurais bem formadas e enriquecidas em células progenitoras.

As rosetas neurais foram selecionadas no dia 12 utilizando um reagente de seleção comercializado pela STEMCELL, chamado *STEMdiff™ Neural Rosette Selection Reagent*. As células foram então recolocadas em cultura utilizando meio de expansão neural e proliferaram dando origem às células progenitoras neurais.

Para gerar neurônios maduros a partir das células progenitoras neurais, as células foram cultivadas por uma semana em meio de diferenciação, comercializado pela STEMCELL (*STEMdiff Forebrain Neuron Differentiation*) e depois cultivadas por três semanas em meio de maturação, também comercializado pela STEMCELL (*STEMdiff Forebrain Neuron Maturation*).

Após validação das hNPC e neurônios por imunofluorescência, o RNA das hNPC e dos neurônios foi extraído, utilizado kits específicos e seguindo recomendações do fabricante, e enviado a um centro de referência para realização do RNAseq. Essa etapa visava avaliar os impactos das mutações na expressão gênica. Para investigar os efeitos das mutações nas modificações pós-traducionais na histona H3.3, proteínas histonas das hNPC foram extraídas também utilizando kits comercialmente disponíveis e enviadas ao centro de referência para

realização da espectrometria de massas. Modificações pós-traducionais também foram avaliadas por meio de ChIP-seq. Para a avaliação da metilação do DNA, o DNA das hNPC foi extraído seguindo o protocolo do fabricante de kits específicos e enviado ao centro de referência para a condução do WGBS.

1.4. Imunofluorescência para validação das etapas de diferenciação

Para validar a geração de hNPC e neurônios a partir das células-tronco, foi realizada a imunofluorescência. Para análise do resultado e obtenção das imagens, um treinamento completo foi oferecido pelo instituto de pesquisa para manuseio e utilização do microscópio confocal, mais especificamente o *Zeiss LSM780 Laser Scanning Confocal Microscope and IR lasers + OPO*.

Para a realização da imunofluorescência, as células foram fixadas com paraformaldeído 4% e sacarose 15% diluídos em PBS. As células passaram então pelas etapas de permeabilização com TritonX-100 0,3% diluído em PBS, por uma etapa de bloqueio de locais de ligação inespecíficos com TritonX-100 0,03% em PBS e 5% de soro de cabra. Após a etapa de bloqueio, as células foram incubadas com os anticorpos primários (Nestin, SOX1 e PAX6 para hNPC e MAP2 para neurônios). Estes foram diluídos em concentrações estabelecidas em solução de bloqueio e incubados nas amostras durante a noite a 4°C. No dia seguinte, as células foram lavadas com PBS Tween 0,05% antes de serem incubadas com os anticorpos secundários conjugados a agentes fluorescentes 488, 594 ou 647 (diluição: 1/1000, ALEXA), por uma hora protegidas da luz e à temperatura ambiente. Ao final, as amostras foram montadas em um meio de montagem contendo DAPI (*ProLong™ Diamond Antifade Mountant*). As imagens foram então adquiridas no microscópio confocal *Zeiss LSM780 Laser Scanning* com uma objetiva de aumento de 20X e analisadas usando o software Zen.

2. Cultura celular 3D (organoides cerebrais ou mini cérebros)

2.1 Geração de organoides cerebrais

Organoides cerebrais foram gerados para estudar os efeitos das mutações de interesse no tamanho dos organoides e também na estrutura interna dos mesmos. Os organoides cerebrais foram primeiramente descritos em um artigo publicado na *Nature* em 2013 (LANCASTER *et al.*, 2013). Eles reproduzem algumas estruturas do cérebro e o modelo de "mini cérebros" permite então, entre outras coisas, estudar a neurogênese e as consequências de alterações genéticas para o desenvolvimento do córtex cerebral (FIGURA S2).

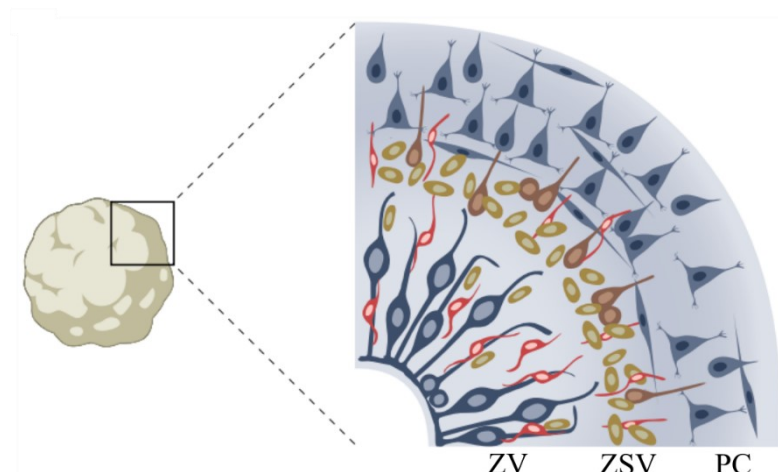


Figura S2 - Estrutura interna dos organoides cerebrais. Organoides cerebrais recapitulam características do desenvolvimento do cérebro humano, incluindo estruturas da zona ventricular (ZV), áreas da zona subventricular (ZSV) e placa cortical (PC).

Fonte: Adaptado de EICHMÜLLER, O. L.; KNOBLICH, J. A. Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research. *Nat Rev Neurol* (2022).

O protocolo utilizado no laboratório foi o descrito e publicado por outro grupo em 2018 (QIAN *et al.*, 2018). As hPSC foram então dissociadas com *accutase* e semeadas em placas de Petri em densidade muito baixa para gerar colônias distintas. As colônias formadas foram incubadas com colagenase tipo IV entre 45 minutos e 1 hora a 37°C (Colagenase tipo IV, diluída a 1X em DMEM/F12) para desprendê-las da placa. As colônias foram então delicadamente transferidas para uma placa com aderência ultra fraca e contendo meio específico para células-tronco com baixa concentração de FGF. No dia 3, metade do volume do meio foi substituído pelo mesmo meio fresco, ao qual foram adicionados 2 µM de dorsomorfina e 2 µM de A83-01, inibidores da via de sinalização TGF-β/SMAD que direcionam as células-tronco para a diferenciação neuroectodérmica.

A partir do dia 5, os organoides cerebrais foram gradualmente expostos ao meio de indução contendo um meio de base suplementado com 1µM de CHIR99021, 1 µM de SB-431542 e 5 µM de cicloplamina para promover a dorsalização dos organoides cerebrais. Dois dias depois, os organoides cerebrais foram dispersos em gota de Matrigel, que atua como matriz extracelular, e deixados a 37°C por 30 minutos. O Matrigel polimeriza e permite que os organoides cerebrais expandam e organizem as estruturas internas. No dia 14, os organoides foram dissociados do Matrigel e transferidos para placas de 60 mm contendo 5 mL de meio de diferenciação, as quais foram posicionadas em um agitador orbital com agitação constante de 80 rpm instalado na incubadora a 37°C, para proporcionar uma melhor oxigenação e promover a difusão de nutrientes, fatores de diferenciação e maturação durante a diferenciação. Do dia 35

ao dia 70, Matrigel 1% foi adicionado ao meio de diferenciação, o qual foi substituído por meio de maturação no dia 70. Os organoides podem ser cultivados por mais de 110 dias no meio de maturação e os meios são trocados duas vezes por semana.

Imagens dos organoides cerebrais foram obtidas utilizando um microscópio EVOS para visualização da presença de estruturas internas (FIGURA S3) e para mensuração da área dos mesmos. Para mensurar a área foi utilizado o software *ImageJ* e os gráficos foram gerados no *GraphPad Prism*.

2.2 Imunofluorescência para análise das estruturas celulares internas dos organoides cerebrais

Os organoides cerebrais foram fixados em paraformaldeído 4% e então transferidos para solução de sacarose 30% por 48h a 4°C. Em seguida, os organoides foram incluídos em *cryomolds* de plástico contendo a solução OCT (*Optimal cutting temperature*), os quais foram colocados sobre gelo seco, permitindo que o OCT solidificasse. Os organoides fixados e congelados foram armazenados a -80°C.

Foram realizados cortes de 15 a 20µm de espessura em um criostato, os quais foram recuperados em lâminas de vidro com carga e resistentes ao frio, as quais foram armazenadas a -20°C até o uso para a imunofluorescência.

Para realizar a imunofluorescência, as lâminas foram primeiramente lavadas com PBS, para remover a OCT. Posteriormente foi realizada a etapa de permeabilização com Triton-X a 0,3%, diluído em PBS. Seguindo a permeabilização, a caneta DAKO foi aplicada ao redor dos cortes de tecido, com o objetivo de criar uma barreira hidrofóbica ao redor da amostra. Em seguida, os tecidos foram bloqueados utilizando 0,03% Triton-X e 10% de soro de jumento por 1 hora.

Os cortes de organoides foram então incubados com os anticorpos primários (SOX2 para células progenitoras neuronais e TUJ1 para neurônios), diluídos em concentrações estabelecidas e em solução de bloqueio, durante a noite a 4°C. No dia seguinte, os cortes foram lavados com Tween 0,05% diluído em PBS, seguido da incubação com os anticorpos secundários conjugados com agentes fluorescentes 488 ou 594 (diluição: 1/1000, ALEXA), por uma hora protegidos da luz e à temperatura ambiente. As lâminas foram montadas em meio de montagem contendo DAPI e as imagens foram visualizadas no microscópio confocal *Zeiss LSM780 Laser Scanning* com a objetiva de aumento de 20X e analisadas usando o software *Zen* (FIGURA S3).

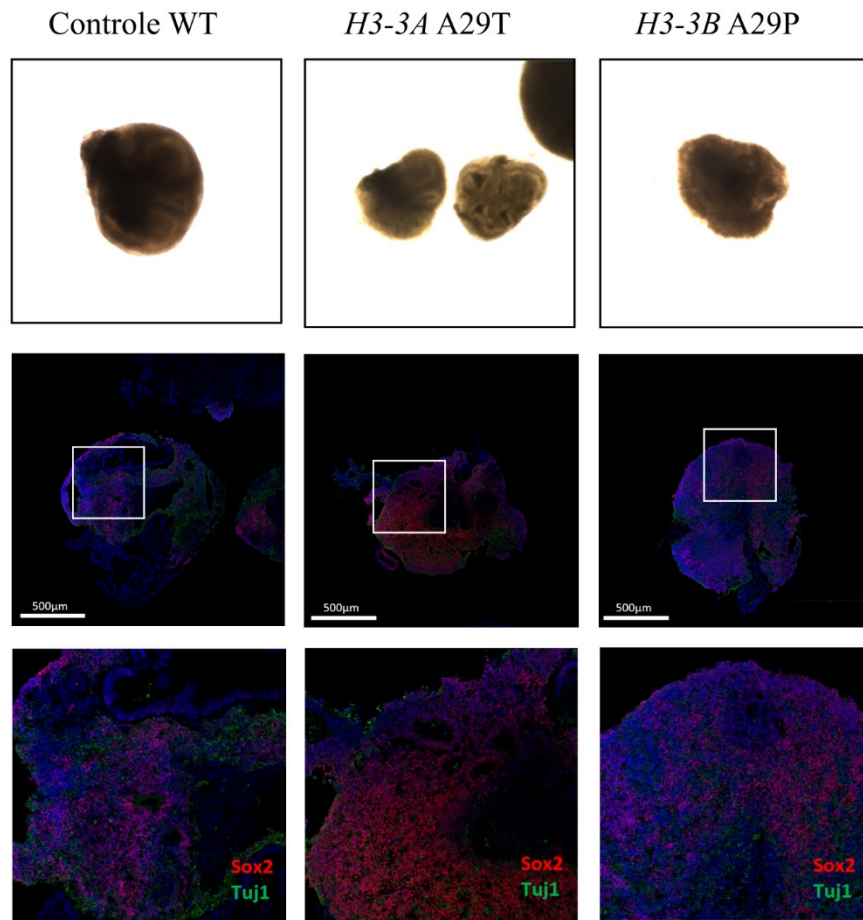


Figura S3 - Imagens *Brightfield* e de imunofluorescência evidenciando as estruturas internas dos organoides cerebrais nos diferentes grupos. Observa-se estruturas internas mimetizando o ventrículo cerebral em imagens *Brightfield*. As mesmas são vistas nas imagens resultantes da imunofluorescência, onde observamos também a marcação para marcador de células progenitoras neuronais (SOX2) em vermelho e para neurônios (Tuj1) em verde no grupo controle e nos grupos contendo as mutações de interesse. WT: wild-type.

Fonte: Produzido pelo próprio autor.

3. Modelo animal

Com o objetivo de estudar os efeitos das mutações de interesse em histona H3.3 *in vivo*, modelo animal de camundongo *Knock-In* Direto (DKI) com as mutações germinativas heterozigóticas *H3f3a* p.A29T e *H3f3a* p.A29P foi gerado. Neste caso as duas mutações foram inseridas no mesmo gene, para avaliar o efeito da troca de aminoácidos propriamente dita. A utilização deste modelo tem o potencial de auxiliar na compreensão do papel dessas mutações durante o neurodesenvolvimento e pode fornecer *insights* adicionais sobre os mecanismos por trás dos fenótipos opostos de macrocefalia e microcefalia nos pacientes portadores das mutações.

3.1 CRISPR-Cas9 para edição genômica do modelo animal

Para realizar a edição do genoma dos camundongos inserindo as mutações *H3f3a* p.A29T e *H3f3a* p.A29P, foi desenhado um gRNA complementar à região de interesse e dois ssODN, consistindo na sequência do DNA molde contendo as mutações de interesse. No desenho do ssODN foram incorporadas também 3 mutações silenciosas para prevenir o reconhecimento do DNA template pela Cas9 e inibir o corte indesejado do mesmo.

Foi realizada a microinjeção desses componentes e também da enzima Cas9 (50 ng/μl de gRNA: 20 ng/μl de ssODN:50 ng/μl de Cas9) em embriões na fase de blastocisto obtidos de camundongo fêmea da linhagem B6C3H que havia cruzado com macho também B6C3H. Os blastocistos submetidos ao CRISPR-Cas9 foram então posteriormente reimplantados em outra fêmea pseudo-grávida para obtenção dos filhotes contendo as mutações.

Após nascimento dos filhotes, os mesmos foram genotipados por meio da técnica de sequenciamento de Sanger (FIGURA S4A). O DNA genômico de camundongos com idade entre 7 e 21 dias foi extraído de um fragmento da cauda. O DNA foi amplificado por PCR convencional com o reagente MyTaq™ HS Red Mix (Bioline) e primers específicos para a região de interesse. Os cromatogramas gerados pelo sequenciamento foram analisados pareando-os com a sequência referência do genoma. Os camundongos positivos para as mutações foram utilizados como *mosaic founders* para a obtenção das gerações seguintes. No caso dos *founders*, eles também foram genotipados por MiSeq (FIGURA S4A).

A estratégia de reprodução para estabelecer os camundongos mutantes heterozigotos para as mutações *H3f3a* p.A29T e *H3f3a* p.A29P consistiu no acasalamento dos *mosaic founders* com camundongos *wild-type* (selvagens) da linhagem C57BL/6 (FIGURA S4B).

Assim que a linhagem com a mutação for estabelecida (à partir da geração 2), experimentos serão conduzidos para caracterizar fenotipicamente os modelos de camundongo *H3f3a* p.A29T e *H3f3a* p.A29P realizando mensurações do peso e tamanho corporal, incluindo medições da cabeça, testes comportamentais, necropsia de corpo inteiro, coleta de embriões e outros estudos funcionais relacionados. Serão conduzidos experimentos para avaliar os potenciais efeitos das mutações durante o neurodesenvolvimento, no fenótipo cerebral e no desenvolvimento de outros órgãos. Investigações dos efeitos das mutações no epigenoma e transcriptoma serão também realizadas por meio de diferentes técnicas, incluindo NGS.

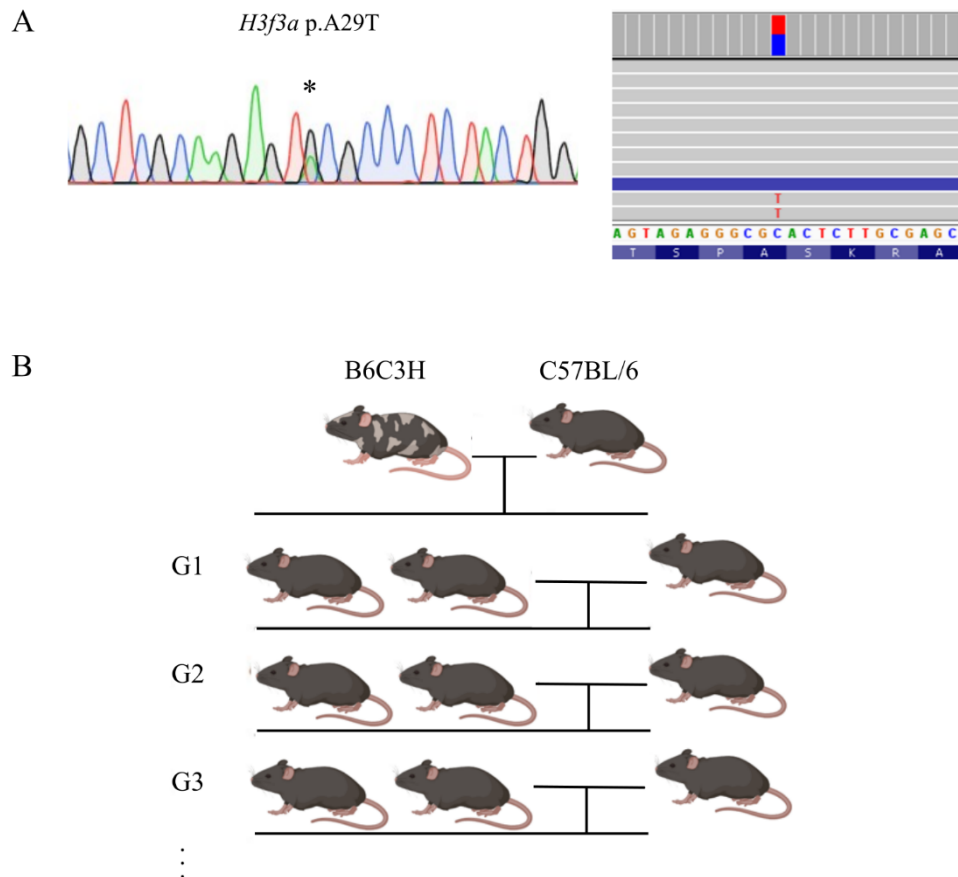


Figura S4 - Genotipagem dos *founders* e estratégia de reprodução para estabelecimento das linhagens. **(A)** Cromatograma e resultado de MiSeq ilustrativos de um caso de *founder* positivo para a mutação *H3f3a* p.A29T. **(B)** A estratégia de reprodução consistiu no acasalamento dos *mosaic founders* da linhagem B6C3H com camundongos wild-type da linhagem C57BL/6 para obtenção da geração 1 (G1). Para o estabelecimento das gerações seguintes, camundongos heterozigotos para a mutação nascidos na geração anterior foram cruzados com camundongos C57BL/6 wild-type, até obter número suficiente de animais.

Fonte: Produção do próprio autor (produzida em parte utilizando o BioRender (BioRender.com)).

4. Outras atividades

Além da participação direta no projeto do grupo da professora Jabado, durante o período do sanduíche também houve participação em projeto liderado pela orientadora Carolina Cavalieri Gomes, com foco em estudos de alterações moleculares em tumores dos maxilares, em parceria com a professora Nada Jabado.

O projeto visou a caracterização genômica do fibroma cemento-ossificante dos maxilares, por meio de combinação de técnicas de NGS, incluindo WES e RNA-seq. Por meio destas técnicas e da análise bioinformática subsequente foram investigadas mutações patogênicas, genes de fusão e alterações no número de cópias. Estudos prévios haviam

interrogado alterações genéticas no fibroma cemento-ossificante apenas por meio de técnicas com alvos específicos. Esta foi o primeiro estudo a investigá-las em escala global.

Os resultados deste estudo desenvolvido no laboratório da professora Jabado foram redigidos sob forma de artigo científico e publicado no periódico *Modern Pathology* (GOMEZ *et al.*, 2024) (APÊNDICE C).

5. Contribuições do doutorado sanduíche para a formação acadêmica

O estágio sanduíche no período de 12 meses no laboratório da professora Nada Jabado foi uma oportunidade muito enriquecedora, pois permitiu o aprendizado e execução de variadas técnicas laboratoriais, as quais são importantes para pesquisa no campo da patologia.

Dentre as técnicas aprendidas estão: Edição do genoma de células e animais pela tecnologia CRISPR-Cas9; cultura celular; imunofluorescência; sequenciamento de Sanger; NGS; geração de organoides cerebrais; extração de histonas; trabalho com modelo animal, incluindo genotipagem de animais e manejo dos mesmos para execução da estratégia de acasalamento e obtenção das gerações adequadas para as etapas experimentais. Treinamento avançado foi realizado no centro de referência em trabalho com modelo animal do instituto de pesquisa, incluindo o aprendizado do manejo dos animais, eutanásia, perfusão, injeções subcutâneas e coleta de embriões. Além disso, durante o estágio, foi dada a oportunidade de aprender e desenvolver habilidades de interpretação de resultados de NGS, como RNA-seq, ChIP-seq e WGBS, além de resultados de espectrometria de massas.

Após passar por treinamentos, aprender e executar as técnicas, fui considerada pela equipe do laboratório apta a treinar alunos recém-chegados para a execução de algumas das técnicas, incluindo o desenvolvimento de organoides cerebrais. Esta foi uma oportunidade de compartilhar conhecimento, desenvolver habilidades de ensino e trabalhar em equipe. Assim, considero que o período de doutorado sanduíche contribuiu muito e enriqueceu a minha formação acadêmica, tendo sido uma oportunidade única de trabalhar em um laboratório de ponta reconhecido internacionalmente.

6. Referências

BRYANT, L. *et al.* Histone H3.3 beyond cancer: Germline mutations in Histone 3 Family 3A and 3B cause a previously unidentified neurodegenerative disorder in 46 patients. *Sci Adv*, Washington, v. 6, n. 49, p. eabc9207, Dec. 2020.

EICHMÜLLER, O. L.; KNOBLICH, J. A. Human cerebral organoids - a new tool for clinical neurology research. **Nat Rev Neurol**. London, v. 18, n. 11, p. 661-680, Nov. 2022.

GOMEZ, R. S. *et al.* Comprehensive Genomic Analysis of Cemento-Ossifying Fibroma. **Mod Pathol**, Baltimore, v. 37, n. 2, p. 100388, Feb. 2024.

LANCASTER, M. A. *et al.* Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. **Nature**, London, v. 501, n. 7467, p. 373-379, Sept. 2013.

QIAN, X. *et al.* Generation of human brain region-specific organoids using a miniaturized spinning bioreactor. **Nat Protoc**, London, v. 13, n. 3, p. 565-580, Mar. 2018.

APÊNDICE C – Artigo científico publicado no periódico *Modern Pathology* com dados obtidos durante o período de doutorado sanduíche

Mod Pathol 37 (2024) 100388

MODERN PATHOLOGY



Journal homepage: <https://modernpathology.org/>

Research Article

Comprehensive Genomic Analysis of Cemento-Ossifying Fibroma

Ricardo Santiago Gomez^{a,b,*}, Ahmed El Mouatani^c, Filipe Fideles Duarte-Andrade^a, Thais dos Santos Fontes Pereira^a, Letícia Martins Guimarães^{c,d}, Tenzin Gayden^c, Damien Faury^e, Emily M. Nakada^e, Sylvie Langlois^f, Daniel Sinnett^{f,g}, Wagner Henriques de Castro^a, Marina Gonçalves Diniz^d, Nada Jabado^{c,e,h}, Carolina Cavalieri Gomes^{c,d,*}

^a Department of Oral Surgery and Pathology, Faculty of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; ^b Medical School, Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ^c Department of Human Genetics, McGill University, Montreal, Canada; ^d Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; ^e Department of Pediatrics, McGill University and the Research Institute of the McGill University Health Centre, Montreal, Canada; ^f Division of Hematology-Oncology, Research Center, Centre Hospitalier Universitaire Sainte-Justine, Montreal, Canada; ^g Department of Pediatrics, Université de Montreal, Montreal, Canada; ^h Division of Experimental Medicine, Department of Medicine, McGill University, Montreal, Canada

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 August 2023
Revised 9 November 2023
Accepted 12 November 2023
Available online 22 November 2023

Keywords:

fibro-osseous lesion
ossifying fibroma
genetics
copy number alteration
whole-exome sequencing
RNAseq
gene fusions

Cemento-ossifying fibroma (COF) of the jaws is currently classified as a benign mesenchymal odontogenic tumor, and only targeted approaches have been used to assess its genetic alterations. A minimal proportion of COFs harbor *CDC73* somatic mutations, and copy number alterations (CNAs) involving chromosomes 7 and 12 have recently been reported in a small proportion of cases. However, the genetic background of COFs remains obscure. We used a combination of whole-exome sequencing and RNA sequencing to assess somatic mutations, fusion transcripts, and CNAs in a cohort of 12 freshly collected COFs. No recurrent fusions have been identified among the 5 cases successfully analyzed by RNA sequencing, with in-frame fusions being detected in 2 cases (*MARS1::GOLT1B* and *PARG::BMS1* in one case and *NCLN::FZR1* and *NFIC::SAMD1* in the other case) and no candidate fusions identified for the remaining 3 cases. No recurrent pathogenic mutations were detected in the 11 cases that had undergone whole-exome sequencing. A *KRAS* p.L19F missense variant was detected in one case, and 2 *CDC73* deletions were detected in another case. The other variants were of uncertain significance and included variants in *PC*, *ACTB*, *DOK6*, *HACE1*, and *COL1A2* and previously unreported variants in *PTPN14*, *ATP5F1C*, *APOBEC1*, *HDAC5*, *ATF7IP*, *PARP2*, and *ACTR3B*. The affected genes do not clearly converge on any signaling pathway. CNAs were detected in 5/11 cases (45%), with copy gains involving chromosome 12 occurring in 3/11 cases (27%). In conclusion, no recurrent fusions or pathogenic variants have been detected in the present COF cohort, with copy gains involving chromosome 12 occurring in 27% of cases.

© 2023 United States & Canadian Academy of Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

The cemento-ossifying fibroma (COF) is a benign fibro-osseous neoplasm currently classified as a benign mesenchymal

odontogenic tumor.¹ It arises in the tooth-bearing areas of the jaws.¹ Clinically, a COF presents as an expansive asymptomatic enlargement, mainly affecting the posterior region of the mandible.²⁻⁴ Radiographic examinations show a well-defined radiolucent image in early stages and radiopaque deposits that increase over time.^{3,4} The first choice of treatment is conservative surgery by enucleation and curettage, and it rarely recurs.⁵ COF is microscopically characterized by the production of bone and cementum-like calcifications in a fibrous connective stroma.¹ In

* Corresponding authors.
E-mail addresses: professor@ricardogomez.com.br (R.S. Gomez), carolinacgomes@ufmg.br, gomes.carolinac@gmail.com (C.C. Gomes).

