

**ROBERTA RAYRA MARTINS CHAVES**

**MUTAÇÕES *KRAS* E ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO  
MAPK/ERK EM LESÕES PERIFÉRICAS DE CÉLULAS  
GIGANTES ASSOCIADAS AO IMPLANTE DENTÁRIO**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2019**

Roberta Rayra Martins Chaves

**MUTAÇÕES *KRAS* E ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO  
MAPK/ERK EM LESÕES PERIFÉRICAS DE CÉLULAS  
GIGANTES ASSOCIADAS COM IMPLANTE DENTÁRIO**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia – área de concentração em Estomatologia.

**Orientador:** Prof. Ricardo Santiago Gomez.  
**Coorientadora:** Prof.<sup>a</sup> Carolina Cavaliéri Gomes.

Belo Horizonte  
2019

## Ficha Catalográfica

C512m Chaves, Roberta Rayra Martins.  
2019 Mutações KRAS e ativação da via de sinalização MAPK/ERK  
T em lesões periféricas de células gigantes associadas ao  
implante dentário / Roberta Rayra Martins Chaves. -- 2019.

77 f. : il.

Orientador: Ricardo Santiago Gomez.  
Coorientadora: Carolina Cavaliéri Gomes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Granuloma de células gigantes. 2. Implantação dentária . 3. Imuno-histoquímica. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Gomes, Carolina Cavaliéri. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047

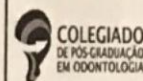
Elaborada por: Sérgio Barbosa dos Santos - CRB: 6/3182.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



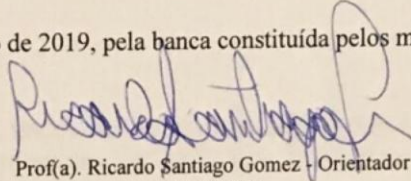
## FOLHA DE APROVAÇÃO

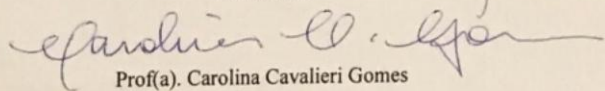
**MUTAÇÕES KRAS PATOGÊNICAS E ATIVAÇÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO ERK/MAPK EM LESÕES PERIFÉRICAS DE CÉLULAS GIGANTES ASSOCIADAS COM IMPLANTE DENTÁRIO**

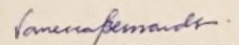
**ROBERTA RAYRA MARTINS CHAVES**

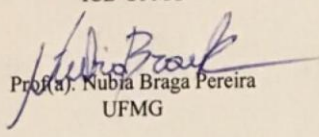
Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 02 de agosto de 2019, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Ricardo Santiago Gomez - Orientador  
FO-UFMG

  
Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes  
UFMG

  
Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes  
ICB-UFMG

  
Prof(a). Nubia Braga Pereira  
UFMG

Belo Horizonte, 2 de agosto de 2019.

Dedico este trabalho aos meus queridos pais, Fátima e Roberto, à minha admirável irmã, Larissa e à minha amada avó, Josefa.

## AGRADECIMENTOS

À Deus e à Nossa Senhora pela vida e saúde minha e dos meus familiares.

Aos meus pais, Fátima e Roberto, pelo amor e apoio incondicional. Por me tornarem uma pessoa íntegra. À minha amada irmã, Larissa, pela cumplicidade e por me fazer melhor a cada dia. Os amo além do infinito.

À minha saudosa e generosa avó Josefa, que tanto me ensinou em sua simplicidade. Te levarei em meu coração por toda a minha existência.

Ao Prof. Ricardo Santiago Gomez pelo exemplo de profissionalismo e liderança. Agradeço pela oportunidade, confiança e aprendizado.

A Prof<sup>a</sup> Carolina Cavaliéri Gomes pela delicadeza, paciência e pela valiosa contribuição no desenvolvimento deste estudo e para o meu crescimento profissional.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular, em especial Letícia e Thaís, pela gentil colaboração em todas as etapas deste trabalho.

Aos colegas de mestrado, por tornarem a rotina ainda mais leve.

Aos meus amigos de vida, em especial Camila e Sônia por tamanha amorosidade dispendida a mim, pelo contínuo apoio e pela genuína vibração positiva com minhas conquistas.

Aos meus familiares, especialmente Estela, Vanessa e Roberta, pelo carinho e por se fazerem presentes em minha vida.

Ao Prof. José Manoel Aguirre Urizar e Prof. Felipe de Paiva Fonseca por contribuírem com as amostras utilizadas nesta pesquisa.

À Prof<sup>a</sup> Isabela Almeida Pordeus pela atenciosidade, carinho e pelos preciosos conselhos.

Aos demais professores do departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas da FO-UFMG pelo conhecimento compartilhado diariamente.

Aos funcionários do Laboratório de Patologia e do Colegiado de Pós-Graduação da FO-UFMG pela solicitude de sempre.

*“As linhas entre a normalidade e a doença são flexíveis, quem as vai delimitar?”*

Siddhartha Mukherjee

## RESUMO

As lesões de células gigantes (LCG) compõem um grupo de doenças que acometem os maxilares e que compartilham do mesmo quadro histopatológico. Existem dois subtipos de LCG, a periférica e a central. A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão intraóssea, usualmente assintomática, que afeta com maior frequência a região anterior da mandíbula de indivíduos jovens. A lesão periférica de células gigantes (LPCG) se manifesta clinicamente como um nódulo usualmente de coloração vermelha-arroxeadada, que afeta com frequência a gengiva ou mucosa alveolar de indivíduos entre a quarta e quinta décadas de vida. Em alguns casos, a LPCG pode se desenvolver adjacente ao implante dentário, apresentando características clínicas e histopatológicas muito semelhantes a forma convencional não associada ao implante. Recentemente, nosso grupo de pesquisa reportou mutações recorrentes, mutuamente exclusivas e com ganho de função nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1*, com consequente ativação constitutiva da via de sinalização intracelular MAPK/ERK nas LCG dos maxilares. No entanto, o perfil molecular da LPCG associada aos implantes dentários é ainda desconhecido. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o perfil de alterações moleculares na LPCG associada aos implantes dentários, investigando mutações nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* previamente descritas na lesão convencional. Além disso, a ativação da via MAPK por meio da reação imuno-histoquímica para a forma fosforilada das proteínas ERK1/2 (fosfo-ERK1/2) foi também avaliada. Para isso, foram utilizadas 15 amostras de LPCG associada ao implante dentário incluídas em blocos de parafina. Mutações ativadoras no gene *KRAS* foram encontradas em 8 das 15 amostras analisadas, afetando os códons 12 (p.G12A/D), 14 (p.V14L), 37 (p.E37K), 127 (p.T127I) e 146 (p.A146V). Não foram detectadas mutações afetando os genes *FGFR1* e *TRPV4*. As células mononucleares mostraram uma forte marcação nuclear e citoplasmática para a proteína fosfo-ERK1/2 na análise imuno-histoquímica, o que sugere ativação da via MAPK/ERK na LPCG associada ao implante dentário. Concluindo, este estudo mostra ativação da via MAPK/ERK na LPCG associada aos implantes. Nossos achados também demonstram que as lesões relacionadas aos implantes apresentam perfil molecular semelhante a LPCG convencional.

**Palavras-chaves:** Lesões de células gigantes. Lesão periférica de células gigantes. Implante dental. *KRAS*. *FGFR1*. *TRPV4*. Via de sinalização MAPK.



## ABSTRACT

### ***KRAS* mutations and activation of the MAPK/ERK pathway in peripheral giant cell lesion associated with dental implant.**

Giant cell lesions (GLC) are a group of jaw diseases that share the same histopathological features. The GCL of the jaws have two distinct clinical subtypes: central and peripheral. The central giant cell lesion (CGCL) is an intraosseous disease, often asymptomatic that most commonly affects young individuals in the anterior region of the jaw. Peripheral giant cell lesion (PGCL) is clinically characterized by nodule with a reddish-purple color, mainly presented in the gingiva or alveolar mucosa of female individuals between the fourth and fifth decades of life. In some cases, PGCL may develop adjacent to a dental implant. The clinical and histopathological features of these lesions are very similar to those of non-implant-associated lesions. Recently, our research group reported recurrent, mutually exclusive and activating mutations in the TRPV4, KRAS and FGFR1 genes and a consequent constitutive activation of the MAPK/ERK intracellular signaling pathway in the GCL of the jaws. However, the molecular profile of PGCL associated with dental implants has not been determined. Thus, the objective of this study was to evaluate the molecular profile of the PGCL associated with dental implants by the investigation of KRAS, FGFR1 and TRPV4 mutations previously reported in the conventional lesions. MAPK activation was also evaluated through the immunohistochemical expression of the phosphorylated form of ERK1/2 proteins (phosphoERK1/2). For this purpose, 15 samples of PGCL associated with dental implant were used. Activating mutations in the KRAS gene were found in 7 of the 15 samples analyzed, affecting codons 12 (p.G12A / D), 14 (p.V14L), 37 (p.E37K) and 146 (p.A146V). Mutations in *FGFR1* and *TRPV4* genes were not detected. Mononuclear cells were strong staining by phospho-ERK1/2 protein in the immunohistochemical analysis, which confirmed the activation of the MAPK/ERK pathway in the PGCL associated with dental implants. In conclusion, the present study shows MAPK/ERK pathway activation in PGCL associated with dental implants. Our findings also demonstrate that the lesions associated with dental implants present a similar molecular profile with the conventional PGCL.

**Keywords:** Giant cell lesions. Peripheral giant cell lesion. Dental implant. *KRAS*. *FGFR*. *TRPV4*. MAPK/ERK pathway.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema de ativação da via MAPK/ERK.....	32
Figura 2 – Primeira etapa do processo de extração do DNA .....	37
Figura 3 – Segunda etapa do processo de extração do DNA .....	38
Figura 4 – Características histopatológicas da lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário .....	43
Figura 5 – Características histopatológicas da lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário .....	44
Figura 6 – Mutações <i>KRAS</i> p.G12A; p.G12D; p.V14L; p.E37K e p.T127I detectadas nas amostras #2, #7 #4, #6 e #11 pelo sequenciamento de Sanger.....	47
Figura 7 – Mutação <i>KRAS</i> p.A146V detectada nas amostras #1, #5 e #9 pelo sequenciamento de Sanger.....	48
Figura 8 – Mutação sinônima <i>KRAS</i> p.G15G detectada na amostra #11 pelo sequenciamento de Sanger.....	48
Figura 9 – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), <i>TRPV4</i> p.I678I; <i>KRAS</i> p.T144T e <i>FGFR1</i> p.A367V detectados nas amostras #4, #15, #9 e #11 pelo sequenciamento de Sanger .....	49
Figura 10 – Expressão de fosfo-ERK1/2 na lesão periférica de células gigantes associada com implantes .....	51
Figura 11 – Expressão de fosfo-ERK1/2 na lesão periférica de células gigantes associada com implantes .....	52
Figura 12 – Esquema de diferenciação osteoclástica mediada pela via de sinalização MAPK/ERK .....	56

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Revisão dos casos reportados de LPCG associada ao implante dentário .....	25
Tabela 2 – Primers utilizados para a Reação de PCR .....	39
Tabela 3 – Caracterização das 15 amostras de lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário .....	42
Tabela 4 – Mutações somáticas drivers encontradas nos casos de lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.....	45
Tabela 5 – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e mutação sinônima encontrados nos casos de lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.....	46

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LCG	Lesões de Células Gigantes
LPCG	Lesão Periférica de Células Gigantes
LCCG	Lesão Central de Células Gigantes
CGM	Células Gigantes Multinucleadas
<i>H3F3B</i>	<i>Histone Family Member 3B</i>
<i>H3F3A</i>	<i>Histone Family Member 3A</i>
<i>USP6</i>	<i>Ubiquitin Specific Peptidase 6</i>
<i>SH3BP2</i>	<i>SH3 Domain-Binding Protein 2</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
<i>TRPV4</i>	<i>Transient Receptor Potential Cation Channel 4</i>
NFκB	Nuclear Factor-Kappa B
TCIRG1	T-Cell Immune Regulator 1
MMP9	Metaloproteinase de Matriz-9
CTSK	Catalepsina K
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
VEGF	Fator De Crescimento Endotelial Vascular
TNF-α	Fator De Necrose Tumoral Alfa
TGF-β	Fator De Crescimento Tumoral Beta
TRAP	Tartrare-Resistant Acid Phosphatase
MCSF-1	Macrophagy Colony Stimulating Factor-1
RANK	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B
RANKL	Receptor Activator of Nuclear Factor κ B Ligand
ERK1/2	Extracellular Signal Regulated Kinase 1/2
ERK3/4	Extracellular Signal Regulated Kinase 3/4
ERK5	Extracellular Signal Regulated Kinase 5
ERK7	Extracellular Signal Regulated Kinase 7
JNK1/2/3	c-Jun N Terminal Kinase 1/2/3
<i>HRAS</i>	<i>Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
<i>NRAS</i>	<i>Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog</i>

RAF-1	<i>RAF-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
B-RAF	<i>B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
A-RAF	<i>A-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase</i>
Elk-1	<i>ETS Transcription Factor ELK-1</i>
c-fos	<i>c-Fos Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
c-Jun	<i>c-Jun Proto-Oncogene, AP-1 Transcription Factor Subunit</i>
IL-1	Interleucina-1
LPS	Lipopolissacarídeos
OPG	Osteoprotegerina
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i>
BAX	<i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
RTKs	Receptores Tirosina-Quinase
MAPKKK	MAPK Quinase Quinase
MAPKK	MAPK Quinase
Grb2	<i>Growth Factor Receptor-Bound Protein 2</i>
SOS	<i>Son Of Sevenless</i>
GDP	Difosfato de Guanosina
GTP	Trifosfato de Guanosina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
UPV-EHU	<i>Universidad del País Vasco - Euskal Herriko Unibertsitatea</i>
R.S.G.	Ricardo Santiago Gomez
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
R.R.M.C.	Roberta Rayra Martins Chaves
C.C.G.	Carolina Caviliéri Gomes
N.B.P.	Núbia Braga Pereira
µm	Micrômetro
rcf	Força Centrífuga Relativa
µl	Microlitro
IHQ	Imunohistoquímica
SNPs	Polimorfismos De Nucleotídeo Único

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>14</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>16</b>
2.1 Lesões de células gigantes.....	16
2.2 Lesão central de células gigantes (LCCG) .....	18
2.3 Lesão periférica de células gigantes (LPCG).....	20
2.4 LPCG associada a implantes dentários .....	22
2.5 Patologia molecular das LCG dos maxilares .....	27
2.5.1 Componentes celulares e desenvolvimento das LCG dos maxilares.....	27
2.5.2 Via de sinalização celular MAPK .....	30
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>34</b>
3.1 Objetivo geral.....	34
3.2 Objetivos específicos.....	34
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>35</b>
4.1 Aspectos éticos .....	35
4.2 Amostras .....	35
4.3 Extração do DNA.....	35
4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR) .....	39
4.5 Sequenciamento genômico (Sanger) .....	40
4.6 Imuno-histoquímica (IHQ) .....	40
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1 Caracterização da amostra .....	41
5.2 Análise Histopatológica .....	42
5.3 Sequenciamento de Sanger.....	44

5.4	Análise Imuno-histoquímica (IHQ).....	50
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>53</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>58</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>59</b>
	<b>APÊNDICE A – Termo de compromisso de utilização de dados .....</b>	<b>72</b>
	<b>APÊNDICE B – Atividades desenvolvidas durante o mestrado.....</b>	<b>73</b>
	Disciplinas cursadas .....	73
	Formação complementar .....	74
	Prêmios e títulos .....	74
	<b>APÊNDICE C - Produção científica durante o mestrado .....</b>	<b>75</b>
	<b>APÊNDICE D: Artigo científico que apresenta os resultados deste estudo.....</b>	<b>76</b>
	<b>ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG</b>	<b>77</b>

## 1 INTRODUÇÃO

As lesões de células gigantes (LCG) são um grupo de alterações patológicas de comportamento clínico distinto e quadro histopatológico semelhante, que acometem os ossos dos maxilares. Cisto ósseo aneurismático (HENRIQUES *et al.*, 2012), condroblastoma (KONDOH *et al.*, 2002), querubismo (PEÑARROCHA *et al.*, 2006), tumor marrom do hiperparatireoidismo (PÉREZ-GUILLERMO *et al.*, 2006) e LCG dos maxilares são as doenças que compõem este grupo.

De forma geral, essas lesões são caracterizadas por células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos arranjadas em um fundo de células mononucleares de formato ovoide e/ou fusiforme (FLANAGAN *et al.*, 2014). Apesar de compartilharem diversos achados histopatológicos, essas doenças possuem perfis moleculares distintos.

Grande parte dos cistos ósseos aneurismáticos primários apresentam um rearranjo cromossômico no gene *USP6* (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Em contrapartida, a substituição p.Lys36Met codificando predominantemente o gene *H3F3B* é a impressão digital do condroblastoma (BEHJATI *et al.*, 2013). As lesões de querubismo abrigam mutações 4p.16.3 no gene *SH3BP2* (UEKI *et al.*, 2001). Estudo recente analisou o exoma das LCG dos maxilares e detectou a presença de mutações somáticas recorrentes e mutuamente exclusivas em três genes: *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* (GOMES *et al.*, 2018). Enquanto isso, a patogenia molecular do tumor marrom do hiperparatireoidismo e da lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário ainda não foi elucidada.

As LCG dos maxilares são classificadas em dois subtipos de acordo com suas características clínicas – lesão central de células gigantes (LCCG) e lesão periférica de células gigantes (LPCG). A forma intraóssea é denominada LCCG e representa cerca de 7% de todos os tumores benignos dos maxilares. Possui predileção pelo sexo feminino e se desenvolve principalmente na região anterior da mandíbula de indivíduos entre as três primeiras décadas de vida (MANOR *et al.*, 2013; VALENTINE *et al.*, 2011).



A forma extraóssea é denominada LPCG e se apresenta clinicamente como um crescimento exofítico de consistência firme ou macia, superfície usualmente ulcerada e coloração vermelho-arroxeadada, localizado na mucosa alveolar e/ou gengival de indivíduos do sexo feminino, entre a quarta e quinta décadas de vida (BRIERLEY, *et al.*, 2018; CHRCANOVIC *et al.*, 2018). Essa lesão corresponde a aproximadamente 10% das lesões gengivais (TRUSCHNEGG *et al.*, 2016) e também pode ser vista em associação com um implante dentário.

As lesões periféricas de células gigantes associadas ao implante compartilham grande parte das características histopatológicas observadas na LPCG convencional. Contudo, há um comportamento clínico distinto em cada uma destas entidades. A perda óssea marginal é observada em 10% das LPCG convencionais e em 75% das lesões associadas à implantes dentários. Além disso, a taxa de recorrência é aproximadamente quatro vezes maior nas LPCG peri-implantares. (CHRCANOVIC *et al.*, 2018; CHRCANOVIC *et al.*, 2019).

Estudo recente analisou o exoma da LPCG e mostrou mutações recorrentes nos genes *KRAS* e *FGFR1* (GOMES *et al.*, 2018). Neste estudo, pretende-se investigar se essas mutações são compartilhadas com as LPCG associadas ao implante. O melhor entendimento da etiopatogenia dessas doenças pode tornar possível o desenvolvimento de ferramentas moleculares que poderão auxiliar no diagnóstico e no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Lesões de células gigantes

Células gigantes multinucleadas (CGM) podem estar presentes em condições fisiológicas nos músculos esqueléticos, placenta e osso. A presença dessas células além dessas localidades é considerada patológica (VARSHA, *et al.*, 2014). Algumas lesões reativas apresentam células gigantes do tipo corpo estranho, lesões associadas à inflamação granulomatosa também podem apresentar CGM como consequência da infecção, no entanto, nestes casos as CGM não representam a característica histopatológica definidora (FLANAGAN e SPEIGHT, 2014).

Existe um grupo de doenças da cavidade oral em que as CGM compõem um achado histopatológico patognomônico, denominado lesões de células gigantes (LCG). Este grupo é formado pelas LCG dos maxilares, cisto ósseo aneurismático, condroblastoma, querubismo e tumor marrom do hiperparatireoidismo. O quadro histopatológico destas doenças é constituído por um número variado de CGM tipo osteoclastos em um fundo de células mesenquimais mononucleares de formato ovoide e/ou fusiforme. Áreas de hemorragia, trabéculas ósseas irregulares, deposição de material osteoide e depósitos de hemossiderina também podem ser observados em alguns casos (FLANAGAN e SPEIGHT, 2014).

Devido à similaridade histopatológica, a análise microscópica é insuficiente para distinguir as LCG. Por isso, a compreensão das características clínicas, radiográficas e moleculares de cada uma dessas entidades é fundamental para a definição do correto diagnóstico.

O cisto ósseo aneurismático é uma lesão osteolítica que afeta predominantemente os ossos longos. Embora raro, alguns casos podem se manifestar nos ossos maxilares de forma isolada ou associados a outros processos patológicos, tais como displasia fibrosa, fibroma condromixoide, condroblastoma e tumor de células gigantes (HENRIQUES *et al.*, 2012).

Histopatologicamente, o cisto ósseo aneurismático pode se diferenciar das LCG dos maxilares pela presença de espaços preenchidos por sangue separados por septos de tecido conjuntivo (ROSENBERG *et al.*, 2005). A ocorrência de uma anormalidade vascular como a dilatação da rede de vascularização local é uma das teorias mais aceitas para o desenvolvimento dessa lesão (HENRIQUES *et al.*, 2012). Estudos recentes mostram que o rearranjo cromossômico do gene *USP6* é o principal evento genético na doença, com grande aplicação diagnóstica (BAUMHOER *et al.*, 2019).

Assim como o cisto ósseo aneurismático, o condroblastoma é usualmente encontrado na epífise de ossos longos e é extremamente raro nos maxilares (BUI *et al.*, 2009). Quando presente, este tumor cartilaginoso afeta predominantemente o côndilo e a articulação temporomandibular (GAUDET *et al.*, 2004; KONDOH *et al.*, 2002; PAYNE e YUSUF, 1987). A presença de ilhas eosinofílicas de matriz condroide e CGM distribuídas de forma esparsa e em menor número do que observado nas LCG dos maxilares, pode servir como base para o seu diagnóstico histopatológico diferencial (BUI *et al.*, 2009). Ainda, mutações p.K36M afetando o gene *H3F3B* constituem a impressão digital genética do condroblastoma (AMARY *et al.*, 2016; BEHJATI *et al.*, 2014).

O querubismo é uma doença congênita rara caracterizada pelo alargamento bilateral simétrico e assintomático dos ossos maxilares devido à proliferação local de tecido fibro-ósseo (LIU *et al.*, 2018). O início da expansão óssea é observado nos primeiros anos de vida do paciente e, na maior parte dos casos, a doença possui um curso auto limitante, regredindo durante a puberdade (von WOWERN, 2000). De forma distinta do observado nos casos de cisto ósseo aneurismático e condroblastoma, as lesões de querubismo não possuem uma característica histopatológica definidora, assim, o diagnóstico é estabelecido levando em conta suas características clínicas (PENÃRROCHA *et al.*, 2006). Além disso, o perfil molecular da doença mostra mutações ativadoras no gene *SH3BP2*, e pode ser bastante útil para o diagnóstico do querubismo (UEKI *et al.*, 2001).

O desequilíbrio entre a atividade osteoblástica/osteoclástica ocasionada pela presença do hiperparatireoidismo primário ou secundário pode originar o tumor marrom do hiperparatireoidismo. Nessa lesão a reabsorção óssea pode gerar espaços vacuolares preenchidos por sangue e depósitos de

hemossiderina (WILSON, SCHWARTZ e TEHRANY, 2013). Entretanto, as características histopatológicas são insuficientes para a distinção entre o tumor marrom do hiperparatireoidismo e a LCG dos maxilares. Por isso, os achados clínicos, radiográficos e histopatológicos devem ser correlacionados com exames complementares, como dosagem sérica de paratormônio, fósforo e cálcio para o correto diagnóstico (PÉREZ-GUILHERMO, *et al.*, 2006). Até o momento, a patogenia molecular das lesões de tumor marrom do hiperparatireoidismo não foi elucidada.

## 2.2 Lesão central de células gigantes (LCCG)

A lesão central de células gigantes (LCCG) é uma lesão proliferativa intraóssea benigna que pode ocorrer de forma esporádica ou associada com a síndrome de Noonan, síndrome de Jaffe Campanacci, síndrome de Ramon e a Neurofibromatose tipo I (CHRCANOVIC, GOMEZ e FREIRE-MAIA, 2011; EL-NAGGAR *et al.* 2017). A doença apresenta predileção pelo sexo feminino e acomete principalmente a região anterior da mandíbula, de indivíduos entre as três primeiras décadas de vida. A LCCG pode ter um comportamento clínico indolente, sendo assintomática, de crescimento lento ou extremamente agressivo. Os casos agressivos são caracterizados por uma área extensa de osteólise, observada na radiografia como radiolucidez multilocular que pode ocasionar reabsorção das raízes dentárias, expansão e/ou erosão da cortical óssea. A presença de dor, parestesia, deslocamento dentário, ulceração da mucosa oral sobrejacente, em decorrência da perfuração cortical, e uma maior taxa de recorrência, é comumente relatada nestes casos (AGHBALI *et al.*, 2013; MARTINI *et al.*, 2018).

Inúmeros estudos imunohistoquímicos objetivaram definir as diferenças moleculares entre as LCCG não-agressivas e agressivas. Alguns resultados evidenciaram que, nas lesões agressivas, pode haver um aumento na largura e na área de superfície, bem como na quantidade e atividade mitótica das CGM (HOSUR, *et al.*, 2018). Outros estudos mostraram que algumas citocinas relacionadas com os processos de osteoclastogênese e

angiogênese, como NFκB, CD31 e CD34, estavam mais expressas nas LCCG agressivas (PEACOCK, JORDAN e SCHMIDT, 2012; TOBÓN-ARROYAVE *et al.*, 2015). A expressão de TCIRG1, um gene relacionado à atividade osteoblástica, foi maior nas LCCG não-agressivas (PEACOCK *et al.*, 2017). Ainda, uma menor expressão do gene pró-apoptótico WWOX foi identificada nos casos agressivos de LCCG. A expressão reduzida ou ausente deste gene é vista em alguns tumores ósseos agressivos, como o osteossarcoma (AMARAL *et al.*, 2013).

Um tumor que apresenta bastante similaridade histopatológica com a LCCG é o tumor de células gigantes. Um estudo comparativo mostrou que as duas entidades, compartilharam a expressão de metaloproteinase de matriz-9 (MMP9), catalepsina K (CTSK) e regulador imune de células T-1 (TCIRG1), sugerindo que poderiam se tratar de lesões semelhantes em localizações distintas (PEACOCK *et al.*, 2017). No entanto, outro estudo mostrou que 92% dos tumores de células gigantes apresentam mutação no gene *H3F3A* que codifica a histona de replicação independente H3.3, levando a substituição p.Gly34Trp (p.G34W) (BEHJATI *et al.*, 2013). Esta mutação não foi detectada na LCCG (GOMES *et al.*, 2014). Além disso, a expressão da proteína p63, característica de uma variedade de neoplasias, foi negativa nas LCCG, enquanto os tumores foram p63 positivos (HOSUR *et al.*, 2018). Logo, essas lesões representam entidades patológicas distintas.

A excisão cirúrgica e a injeção intralesional de corticosteroides são as principais alternativas terapêuticas adotadas no manejo das LCCG. O tratamento com esteroides foi iniciado no ano de 1988 no intuito de minimizar os danos causados pela ressecção radical da lesão, uma vez que a doença ocorre com alta frequência em crianças e adultos jovens, quando a remoção cirúrgica pode ser mutiladora (JACOWAY, HOWEL e TERRY, 1988; RAJEEVAN e SOUMITHRAN, 1998). A partir de então, diversos relatos de regressão da LCCG por meio da abordagem conservadora foram reportados (DOLANMAZ, 2015; KERMER, MILLESI e WATZKE, 1994). Contudo, em alguns casos, as injeções intralesionais não surtiram efeito e a intervenção cirúrgica se fez necessária (NOGUEIRA, *et al.*, 2016).

O perfil molecular das LCCG foi recentemente estabelecido por nosso grupo de pesquisa com a detecção de mutações ativadoras envolvendo

os genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1*. As mutações no gene *TRPV4* (p.M713V e p.M713I) foram exclusivas e prevalentes nas LCCG. Essas substituições levaram a um aumento na ativação constitutiva do canal permeável ao cálcio e na morte celular. No entanto, não houve associação entre a presença da mutação e a agressividade da lesão. O gene *KRAS* foi alterado principalmente nos códons 12 e 146 e, em uma pequena porcentagem de amostras, as mutações *KRAS* e *TRPV4* coexistiram. As mutações no gene *FGFR1* ocorreram nos códons 380 e 381 e foram mutuamente exclusivas com as mutações nos demais genes. A presença dessas mutações provavelmente converge na ativação da via de sinalização intracelular *Mitogen-Activated Protein Kinase* (MAPK) (GOMES *et al.*, 2018).

### 2.3 Lesão periférica de células gigantes (LPCG)

A LPCG representa a contraparte extra óssea das LCG dos maxilares e usualmente possui comportamento clínico indolente. A doença apresenta predileção por indivíduos do sexo feminino, assim como a LCCG, entretanto, é prevalente entre a quinta e sexta década de vida, ocorrendo em média aos 48 anos de idade (BOFFANO *et al.*, 2013). Clinicamente é vista como um nódulo de base séssil ou pedunculada, consistência firme ou macia, com superfície ulcerada e coloração vermelho-arroxeadada, localizado na gengiva e mucosa alveolar anterior (BRIERLEY *et al.*, 2018). Cerca de um terço das LPCG apresenta crescimento profundo na mucosa, infiltrando o periósteo e causando uma erosão superficial no osso alveolar subjacente (CHRCANOVIC *et al.*, 2018). Nestes casos é possível observar uma área de rarefação óssea local na radiografia (BOŞCA *et al.*, 2018; KATSIKERIS *et al.*, 1998).

Além do comportamento clínico, algumas diferenças microscópicas foram observadas na LPCG comparada com a LCCG. A expressão de MMP-9 e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) foi menos intensa nas LPCG do que nas LCCG. Essas citocinas estimulam a osteoclastogênese e sua baixa expressão pode estar associada com o menor potencial de

reabsorção óssea na LPCG. Em contrapartida, as lesões periféricas exibiram uma maior quantidade de vasos sanguíneos em seu microambiente. Os fatores irritativos locais promovem uma secreção elevada de citocinas pró-angiogênicas e a presença do maior número de vasos sanguíneos é consistente com a natureza reativa da lesão (MATOS *et al.*, 2011).

Interações coordenadas entre o fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ) são eventos críticos para a diferenciação osteoclástica. Na LCCG observa-se correlação positiva entre a expressão dos dois fatores, enquanto a LPCG exibe aumento na expressão de TNF- $\alpha$  e uma redução na expressão de TGF- $\beta$ . A falta da correlação entre os níveis destes dois fatores e a maior expressão de TNF- $\alpha$  nas lesões periféricas corrobora com sua natureza reativa, uma vez que essa citocina atua como reguladora chave do processo inflamatório originado dos fatores irritativos locais supostamente responsáveis pelo desenvolvimento da LPCG (MATOS *et al.*, 2012).

Mutações *KRAS* (p. G12D/A, p.G13D, p.A146V/P) foram detectadas em 71,4% das LPCG investigadas por nosso grupo de pesquisa. Apenas 9 das 37 LCCG apresentavam essas alterações nesse gene. O gene *FGFR1* foi afetado de forma mutuamente exclusiva pelas substituições p.C381R e p.N330I em 10% dos casos de lesão periférica e em 16% das lesões centrais. Nenhuma LPCG apresentou mutações no gene *TRPV4*. A ativação da via MAPK também foi observada nas LPCG neste estudo (GOMES *et al.*, 2018).

A excisão cirúrgica associada à curetagem do osso alveolar subjacente apresentou taxa de recorrência 16% menor do que a simples excisão da lesão e, por isso, é o tratamento de escolha (CHRCANOVIC *et al.*, 2018). LPCG recidivantes constituem cerca de 10% dos casos e o risco é aumentado em lesões com superfície ulcerada e com presença de metaplasia óssea (BOFFANO *et al.*, 2018).

A LPCG pode se desenvolver em associação com o implante dentário. As características clínicas, radiográficas e histopatológicas são semelhantes às descritas nas lesões periféricas esporádicas (SCARANO, *et al.*, 2018). Os casos reportados sobre essa associação são escassos na literatura. Em um estudo retrospectivo de 2.824 LPCG, apenas 26 (0,92%) ocorreram na mucosa adjacente a implantes (CHRCANOVIC *et al.*, 2018).

## 2.4 LPCG associada a implantes dentários

O primeiro relato da associação entre implantes dentários e LPCG foi publicado por Hirshberg *et al.*, (2003). Alguns autores postularam que a exposição dos tecidos à superfície rugosa do implante pode tornar-se uma fonte de irritação crônica local que possivelmente ativa o gatilho para o crescimento reacional da lesão (CLOUTIER *et al.*, 2007). Para outros, as forças oclusais exercidas sobre as coroas dos implantes ocasionariam um processo de perda óssea. O infiltrado inflamatório resultante desse processo induziria uma resposta reativa dos tecidos moles, originando a LPCG (HERNANDEZ *et al.* 2009). Outras causas como restaurações protéticas mal adaptadas que ocasionam acúmulo de placa e tártaro entre a prótese e o implante, foram também relacionadas com o desenvolvimento da doença (ÖZDEN *et al.*, 2009).

O titânio não é um material inerte no organismo vivo. A corrosão do metal libera íons no meio biológico e constitui uma das causas de perda tardia do implante (OLMEDO, *et al.*, 2010). Partículas de titânio podem ser observadas em sítios acometidos pela peri-implantite e no exame histopatológico da LPCG associada a implante dentário (FRETWURST *et al.*, 2015; OLMEDO *et al.*, 2010). Essas partículas são vistas de forma livre ou sendo fagocitadas por macrófagos (GUGLIELMOTTI *et al.*, 2015). Assim, a corrosão do titânio foi incluída como um possível fator etiológico para o desenvolvimento da LPCG (SCARANO *et al.*, 2018).

As características clínicas da LPCG associada aos implantes são semelhantes às das lesões periféricas esporádicas. Elas correspondem a um nódulo de consistência firme e superfície lisa, erodida ou levemente ulcerada. Sua coloração pode ser semelhante a mucosa adjacente, eritematosa, vermelha-azulada ou acastanhada (PEÑARROCHA-DIAGO *et al.*, 2012). O sangramento à sondagem pode ser observado em alguns casos (ÖZDEN *et al.* 2009). Usualmente a lesão é assintomática e, como a LPCG dos maxilares, possui predileção pelo gênero feminino, com média de 50 anos de idade (GALINDO-MORENO *et al.*, 2016; JANÉ-SALAS *et al.*, 2015). Diferente da LPCG não-associada ao implante, as lesões periimplantares ocorrem com



maior frequência na região posterior da mandíbula e a reabsorção óssea geralmente é vista no exame radiográfico (BISCHOF, NEDIR e LOMBARDI, 2004).

O exame anatomohistopatológico revela a aparência típica da LPCG esporádica. CGM dispersas em um tecido conjuntivo vascularizado com numerosas células mononucleares de formato ovoide e/ou fusiforme são identificadas. Figuras de mitose muitas vezes podem ser observadas, bem como metaplasia óssea e calcificações distróficas (SCARANO *et al.*, 2018). Áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina são também encontrados. O resultado do processo de corrosão do metal pode ser observado como partículas pigmentadas de coloração enegrecida e constituem um achado diferencial da lesão periférica não associada a implante (OLMEDO *et al.*, 2010). A positividade para CD68, *tartrate-resistant acid phosphatase* (TRAP) e CTSK confirma a origem monocítica/macrofágica e a diferenciação osteoclástica das CGM, assim como observado nas demais LCG dos maxilares (GALINDO-MORENO *et al.*, 2016).

A LPCG ocorre em período tardio, após a osseointegração dos implantes. Por isso, pode-se afirmar que essas lesões não afetam o processo de integração do implante ao osso. No entanto, a doença pode aumentar a perda óssea alveolar e ocasionar a perda do implante (ATARBASHI-MONGADAM *et al.*, 2017). Devido a maior taxa de recorrência, a excisão cirúrgica da lesão e de uma faixa de gengiva/mucosa/periósteo adjacentes, associada à curetagem do osso afetado pela perda óssea é o tratamento preconizado (GALINDO-MORENO *et al.*, 2016). A remoção dos fatores irritativos como placa, cálculo, excesso de cimento e próteses mal adaptadas também deve ser realizada. A explantação é considerada nos casos de perda óssea acentuada e/ou quando a presença do implante impede a remoção completa da lesão (CLOUTIER *et al.*, 2007).

Os casos reportados de LPCG peri-implantar são escassos na literatura. Até o momento, foram reportados 42 casos. Destes, 22 (52,38%) acometeram a região posterior da mandíbula de indivíduos do sexo feminino (n=26 – 61,9%). Dos casos informados, 20 apresentaram reabsorção do osso alveolar subjacente (47,61%). A biópsia excisional associada à curetagem foi o tratamento realizado com maior frequência e a explantação foi conduzida em 6

casos. A taxa de recorrência foi de 26,19% e dois casos apresentaram múltiplas recidivas. A Tabela 1 reúne os achados da literatura sobre LPCG adjacente à implantes dentários até a presente data.

Tabela 1 – Revisão dos casos reportados de LPCG associada ao implante dentário.

<b>Autor</b>	<b>Idade</b>	<b>Sexo</b>	<b>Localização Anatômica</b>	<b>Reabsorção óssea</b>	<b>Tratamento</b>	<b>Recorrência</b>
<b>Hishberg et al., 2003.</b>	32	M*	Mandíbula posterior	Sim	1.Curetagem 2.Excisão a laser	Sim
	69	M	Maxila anterior	Sim	1.Curetagem. 2.Excisão a laser 3.Explantação	Sim
	44	F**	Mandíbula posterior	Sim	1.Curetagem. 2.Excisão a laser 3.Explantação	Sim
<b>Bischof et al., 2004.</b>	56	F	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não
<b>Cavezzi et al., 2004.</b>	42	M	Maxila posterior	NI	Biópsia excisional	Sim
<b>Cloutier et al., 2007.</b>	21	M	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional, explantação e curetagem	Não
<b>Hernandez et al., 2009.</b>	46	F	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Sim
	36	F	Maxila posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Sim
	62	F	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional	Não
<b>Özden et al., 2009.</b>	60	F	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não
<b>Hanselaer et al., 2010.</b>	33	F	Maxila posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não
<b>Olmedo et al., 2010.</b>	64	F	Maxila anterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não

<b>Peñarocho-Diago et al., 2012.</b>	54	F	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não
<b>Lester et al., 2014.</b>	68	M	Maxila	NI	Biópsia incisional	Não
	18	F	Mandíbula posterior	NI	Biópsia incisional	Sim (8)
	70	F	Mandíbula posterior	NI	Biópsia incisional	Sim (2)
	68	M	Mandíbula anterior	NI	Biópsia excisional	Não
	49	F	Mandíbula posterior	NI***	Biópsia excisional	Não
<b>Brown et al., 2015.</b>	46	M	Mandíbula posterior	Não	Biópsia excisional	Não
<b>Jané-Salas et al., 2015.</b>	64	M	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não
<b>Ogbureke et al., 2015.</b>	44	M	Mandíbula posterior	Sim	Biópsia excisional	NI
<b>Pacifici et al., 2015.</b>	60	M	Maxila anterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Não
<b>Galindo-Moreno et al., 2016.</b>	74	M	Maxila anterior	Não	Excisão com margens de segurança	Não
<b>Halperin-Sternfeld et al., 2016.</b>	53 (média) (n=9)	F(8) M(1)	Mandíbula posterior (8). Maxila posterior (1)	NI	NI	NI
<b>Sezgin et al., 2016.</b>	52	F	Maxila posterior	Sim	Biópsia excisional	Não
<b>Bornstein et al., 2018.</b>	84	F	Maxila anterior	Não	Biópsia excisional	Sim
<b>Bozkaya et al., 2018.</b>	42	F	Maxila posterior	Não	Biópsia excisional	Não
<b>Scarano et al., 2018.</b>	26	M	Mandíbula anterior	Sim	Biópsia excisional, ostectomia periférica e explantação	Não

<b>Bidra et al., 2019.</b>	49	M	Maxila anterior	Não	Biópsia excisional e curetagem	Não
	64	F	Maxila anterior	Sim	Biópsia excisional e curetagem	Sim
	65	M	Mandíbula anterior	Não	Biópsia excisional e curetagem	Sim
<b>Mordini et al., 2019.</b>	39	F	Maxila anterior	Não	Biópsia excisional e curetagem	Não
	52	F	Maxila posterior	Sim	Biópsia excisional, ostectomia periférica e explantação	Não
	31	M	Mandíbula anterior	Sim	Biópsia excisional, ostectomia periférica e explantação	Não

Legenda: \* Masculino \*\* Feminino \*\*\* Não informado  
 Fonte: Elaborado pela autora, 2019.

Até o momento, não existem estudos publicados em relação às alterações genéticas presentes na LPCG relacionada aos implantes dentários. A investigação da patogenia molecular nesse grupo de pacientes poderá contribuir para o desenvolvimento de novas ferramentas moleculares terapêuticas para a doença.

## 2.5 Patologia molecular das LCG dos maxilares

### 2.5.1 Componentes celulares e desenvolvimento das LCG dos maxilares

As LCG dos maxilares são constituídas por três componentes celulares bem definidos: células mononucleares fusiformes, ovoides e CGM.

Estudos ultraestruturais e imunohistoquímicos propõem que as células mononucleares fusiformes sejam miofibroblastos e constituam o componente proliferativo das LCG (SOUZA *et al.*, 1999; SOUZA, MESQUITA e GOMEZ, 2000), enquanto as células de formato ovoide pertençam à uma linhagem monocítica/macrofágica (TORABINIA, RAZAVI e SHOKROLAHI 2010).

Estudos iniciais de cultivo celular postularam que as CGM representariam um componente reacional, devido ao seu rápido desaparecimento no cultivo, em contraste com a contínua proliferação das células mononucleares (EL-MOFTY e OSDOPY *et al.*, 1985; LIM e GIBBINS *et al.*, 1995). Outros pesquisadores (BARTEL e PIATOWSKA 1977; EL-LABAM e LEE 1983), sugeriram que as CGM são derivadas da fusão entre miofibroblastos ou entre as células ovoides macrofágicas do estroma (VARSHA *et al.*, 2014). Contudo, a maior parte dos estudos se alinham ao contexto de que essas células possuem um fenótipo osteoclástico (EDWARDS, 2015; LIU *et al.*, 2003; MOHTASHAM *et al.*, 2017; PEACOCK *et al.*, 2017; PIRES-DUARTE *et al.*, 2011). Por este motivo, a compreensão do processo de osteoclastogênese pode elucidar o microambiente biológico associado ao desenvolvimento das LCG.

Os osteoclastos são derivados de células tronco monocíticas da medula óssea que se diferenciam após o estímulo de receptores extranucleares. *Macrophagy Colony Stimulating Factor-1* (MCSF-1) é uma citocina crítica para a diferenciação precoce dos osteoclastos (NIIDA *et al.*, 1999). Ela ativa e aumenta a sobrevivência dos monócitos e estimula a expressão do *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B* (RANK) na membrana dessas células, que posteriormente será ligado ao *Receptor Activator of Nuclear Factor  $\kappa$  B Ligand* (RANKL) (TROEN, 2003).

O RANKL é um fator de membrana expresso por osteoblastos, células estromais e células T e é um dos principais receptores responsáveis pela indução da diferenciação osteoclástica (BROOKS, GLOGAUER E MCCULLOCH, 2018). A ligação do RANKL ao RANK promove a ativação de membros da família *TNF Receptor Activating Factors* (TRAFs). Os TRAFs são adaptadores críticos na transmissão de sinais extracelulares e do sinal RANKL/RANK para diversas vias de transdução de sinal intracelulares, como a via MAPK. Na osteoclastogênese mediada por RANKL, a ativação da via

MAPK por TRAF6 leva à ativação de vias MAPK como *extracellular signal regulated kinase 1/2* (ERK1/2), *c-jun N terminal kinase* (JNK) e p38 culminando na formação dos osteoclastos (SUN, 2008).

Os domínios TRAFs também interagem com outras citocinas como interleucina-1 (IL-1), TNF- $\alpha$  e lipopolissacarídeos (LPS). Essas citocinas são expressas pelas células mononucleares fusiformes e ativam as vias de sinalização à jusante modulando a diferenciação e a maturação osteoclástica, até mesmo na ausência da sinalização RANKL/RANK. (BROOKS, GLOGAUER E MCCULLOCH, 2018; TROEN, 2003). Ainda, MCSF-1 pode iniciar a osteoclastogênese de forma direta, por meio da ligação com seu receptor c-fms, autofosforilação de ERK1/2 e ativação da proteína quinase p38 (SUN, 2008; TROEN, 2003).

Os achados de diversos estudos imunohistoquímicos evidenciaram que as LCG dos maxilares expressam diversas citocinas associadas ao processo de osteoclastogênese. A metaloproteinase de matriz 9 (MMP9) e o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) são moléculas solúveis usualmente associadas ao processo de angiogênese, que nas LCG, estão associadas com a formação dos osteoclastos (MATOS *et al.*, 2011).

A produção de MMP9 e VEGF leva à formação de paredes vasculares incompletas que proporcionam uma fonte de monócitos e precursores de osteoclastos do sangue. Dessa forma, essas células são recrutadas para o interior da lesão por meio da produção local de *Monocyte Chemoattractant Protein-1* (MCP-1) e TGF- $\beta$ , fatores que são expressos principalmente pelas células mononucleares do estroma (TOBÓN-ARROYAVE *et al.*, 2005; VARSHA *et al.*, 2014). Uma vez recrutadas, as células de fenótipo macrófágico produzem enzimas como TRAP e MMP9, que atuam na desmineralização óssea, e TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , citocinas que agem de forma coordenada e estimulam a diferenciação osteoclástica (MATOS *et al.*, 2012).

Em um elegante estudo, Liu, Yu e Li (2003) demonstraram o papel crucial do sistema RANKL/RANK/OPG na formação das CGM nas LCG dos maxilares. Os miofibroblastos do estroma das LCG expressam RANKL, enquanto que as células ovoides e CGM expressam RANK. Osteoprotegerina (OPG) foi expressa por todos os componentes celulares da lesão. As CGM e uma fração de células mononucleares do estroma ainda foram reativas para

CD68, MMP-9, CTSK, V-ATPase e CA II, enzimas que estão associadas com a acidificação do meio e quebra de colágeno I e II no processo de reabsorção óssea osteoclástica (LIU, YU e LI, 2003).

As células mononucleares fusiformes das LCG não expressam marcadores de macrófagos e osteoclastos. Em contrapartida, expressam intensamente citocinas produzidas durante o processo de proliferação celular, como PCNA e Ki-67. Embora representem o componente proliferativo das LCG, estudos imunohistoquímicos confirmaram a negatividade destes miofibroblastos para a proteína p63. A expressão intensa dessa proteína é vista em uma variedade de neoplasias, portanto, sua negatividade corrobora com a hipótese de que as LCG possuem uma natureza não-neoplásica (HOSUR *et.al.*, 2019).

A expressão nuclear de Ki-67 não foi observada nas CGM, o que sugere que elas não possuem atividade proliferativa no desenvolvimento das LCG (SOUZA *et al.*, 1999). Diante deste achado, um grupo de pesquisadores buscou elucidar a atividade apoptótica deste componente celular e identificaram a expressão dos genes pró-apoptóticos *Bcl-2 associated X protein* (BAX) e caspase 3. A expressão destes genes foi maior nas CGM das lesões periféricas do que nas CGM das lesões centrais. O auto índice apoptótico observado na LPCG fortalece a hipótese de que essa lesão possui uma natureza reacional (AMARAL, *et al.*, 2011).

Apesar da possível natureza reativa da LPCG, mutações afetando os genes *KRAS* e *FGFR1* foram detectadas na doença. Essas mutações ocorrem nas células mononucleares da lesão e promovem a ativação constitutiva de uma importante via de sinalização celular, responsável pelo controle de inúmeros processos celulares, a via MAPK (GOMES *et al*, 2018).

### 2.5.2 Via de sinalização celular MAPK

As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) são proteínas serina/treonina quinases presentes nas células eucarióticas que convertem o estímulo extracelular em vários tipos de respostas celulares. Essas proteínas



constituem múltiplas vias que, de forma coordenada, regulam a expressão gênica, a atividade mitótica, a motilidade, sobrevivência, apoptose, diferenciação e o metabolismo celular (CARGNELLO e ROUX, 2011).

Até o momento, seis vias de sinalização intracelular MAPK foram bem caracterizadas, *extracellular signal-regulated kinases 1/2* (ERK1/2), *c-Jun amino (N)-terminal kinases 1/2/3* (JNK1/2/3), p38 e suas isoformas (p38 $\alpha$ , p38 $\beta$ , p38 $\gamma$  e p38 $\delta$ ), ERK5, ERK3/4 e ERK7. No entanto as vias ERK1/2, JNK1/2/3 e p38 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  são as mais extensivamente estudadas (KRISHNA e NARANG, 2008).

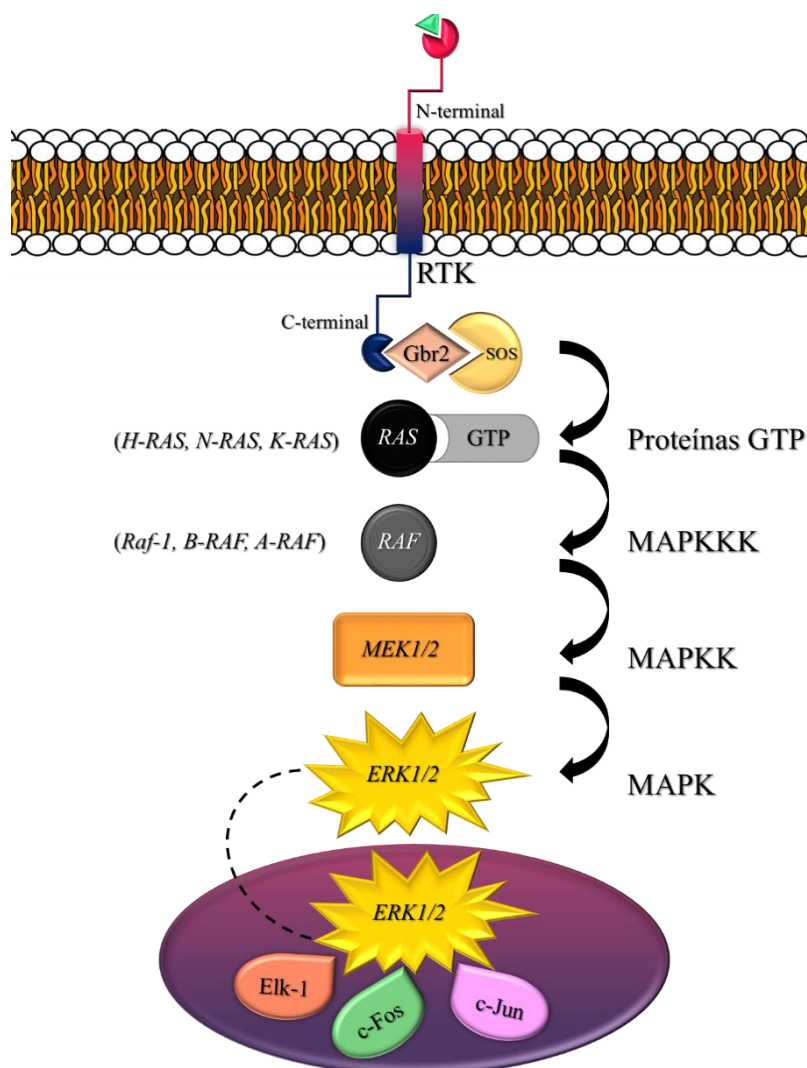
Cada via MAPK é composta por um módulo quinase de três camadas. Os receptores tirosina-quinase (RTKs) captam o estímulo extracelular e os transmitem para as proteínas de ligação (proteínas GTPs) que promovem a ativação à jusante do módulo MAPK quinase quinase (MAPKKK), que por sua vez leva à fosforilação e ativação do módulo MAPK quinase (MAPKK). Por fim, os componentes do módulo MAPKK ativam a via MAPK alvo (DHILLON *et al.*, 2007).

A cascata de sinalização ERK1/2 é uma via de regulação central, responsável principalmente pelo controle da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular. A ativação dessa cascata tem início com a ligação de um fator estimulador no domínio N-terminal extracelular dos RTKs que então dimerizam e ativam o domínio C-terminal intracelular traduzindo o sinal à jusante, principalmente por meio da interação com a proteína Grb2 (*growth factor receptor-bound protein 2*) (OLEA-FLORES *et al.*, 2019). Grb2 interage com o fator de mudança do nucleotídeo guanina SOS (*son of sevenless*) e promove a mudança do GDP (difosfato de guanosina) ligado ao RAS para GTP (trifosfato de guanosina). Assim, as proteínas da superfamília RAS (*H-RAS*, *N-RAS* e *K-RAS*) são ativadas e reguladas positivamente (CARGNELLO e ROUX, 2011).

As proteínas RAS são as proteínas de ligação da via MAPK/ERK (Mc KAY E MORRISON, 2007). Quando ativadas, transmitem o sinal para as proteínas da família RAF (*RAF-1*, *B-RAF* e *A-RAF*) que correspondem ao módulo MAPKKK da cascata. Então, as proteínas RAF transmitem o sinal por meio da fosforilação das proteínas MEK1/2, constituintes do módulo MAPKK. Por último, MEK1/2 ativa ERK1/2 que pertencem ao nível MAPK da via.

ERK1/2 ativadas se translocam para o interior do núcleo e fosforilam os seus alvos nucleares, como os fatores de transcrição Elk-1, c-Fos e c-Jun. Estes fatores regulam os processos de diferenciação, proliferação e sobrevivência celular (WORTZEL e SEGER, 2011). A Figura 1 representa os componentes de sinalização da via MAPK/ERK.

Figura 1 – Esquema de ativação da via MAPK/ERK



Legenda: Um fator estimulador extracelular se liga ao receptor tirocína quinase (RTK). A ligação resulta na tradução do sinal à jusante por meio da interação com a proteína Gbr2 e com o fator SOS. Essa interação promove a ativação das proteínas RAS, que então ativam as proteínas RAF, conduzindo à fosforilação de MEK1/2 e, conseqüentemente, ativação e fosforilação de ERK1/2. Dessa forma, ERK1/2 se transloca ao núcleo onde interagem com os seus fatores de transcrição alvo.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A desregulação da via MAPK/ERK foi associada ao desenvolvimento de um terço das neoplasias humanas (ZHANG *et al.*, 2015). Essa via pode conduzir o processo de trans-diferenciação das células epiteliais em células mesenquimais no câncer. Essa mudança de fenótipo favorece um aumento na migração, invasão e resistência das células neoplásicas ao tratamento quimioterápico (OLEA-FLORES *et al.*, 2019). A via MAPK/ERK também possui um papel na regulação dos sistemas cardiovascular, nervoso, urológico, imunológico e digestório (SUN *et al.*, 2015).

Um grupo de síndromes humanas se originam de mutações germinativas *upstream* nos genes que compõem a via MAPK/ERK. Essas desordens são denominadas RASopatias e carregam deformidades craniofaciais, má formações cardíacas, disfunções neurológicas, anormalidades cutâneas, musculoesqueléticas e oftalmológicas (TIDYMAN e RAUEN, 2009). Múltiplas LCCG podem ocorrer nos pacientes portadores de RASopatias como Neurofibromatose tipo 1, síndrome de Noonan, e síndrome cranio-facial-cutânea (CHRCANOVIC, GOMEZ e FREIRE-MAIA, 2011; NEUMANN *et al.*, 2009).

Recentemente, foi visto que a via MAPK/ERK é ativada constitutivamente nas LCG dos maxilares e no fibroma não-ossificante, em decorrência das mutações nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* (BAUMHOER *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2018). A ativação da via também foi observada no ameloblastoma e no tumor odontogênico adenomatoide, que são tumores odontogênicos benignos (COURA *et al.*, 2019; DINIZ *et al.*, 2017; GOMES, *et al.*, 2016).

Diante do amplo espectro de alterações patológicas mediadas por MAPK/ERK, numerosos estudos têm sido desenvolvidos no intuito de definir alvos terapêuticos moleculares capazes de interferir na sua ação, inibindo a progressão de diversas desordens (FANG *et al.*, 2018; MILOSEVIC *et al.*, 2014; VANDAMME *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2015). Com esse efeito, o indivíduo afetado pode ser beneficiado com uma abordagem terapêutica mais conservadora e com um melhor prognóstico.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o perfil de alterações moleculares na LPCG associada a implantes dentários

#### 3.2 Objetivos específicos

Investigar mutações nos genes *KRAS*, *FGFR-1* e *TRPV4* em LPCG associadas a implantes dentários.

Estudar a ativação da via das MAPK na LPCG associada a implantes dentários por meio de análise imuno-histoquímica das proteínas fosfo-ERK1/2.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

O presente estudo retrospectivo foi aprovado pelo Comité de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 08043219.2.0000.5149) (ANEXO A). Foram seleccionados casos de LPCG associadas aos implantes dentários a partir dos arquivos do Serviço de Patologia Oral e Maxilo Facial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG) e da Unidade de Patologia Oral e Maxilo Facial do Serviço de Clínica Odontológica da Faculdade de Medicina Bucal da Universidade do País Basco (UPV-EHU). Solicitou-se a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e o Termo de Compromisso de Utilização de Dados foi assinado (APÊNDICE A).

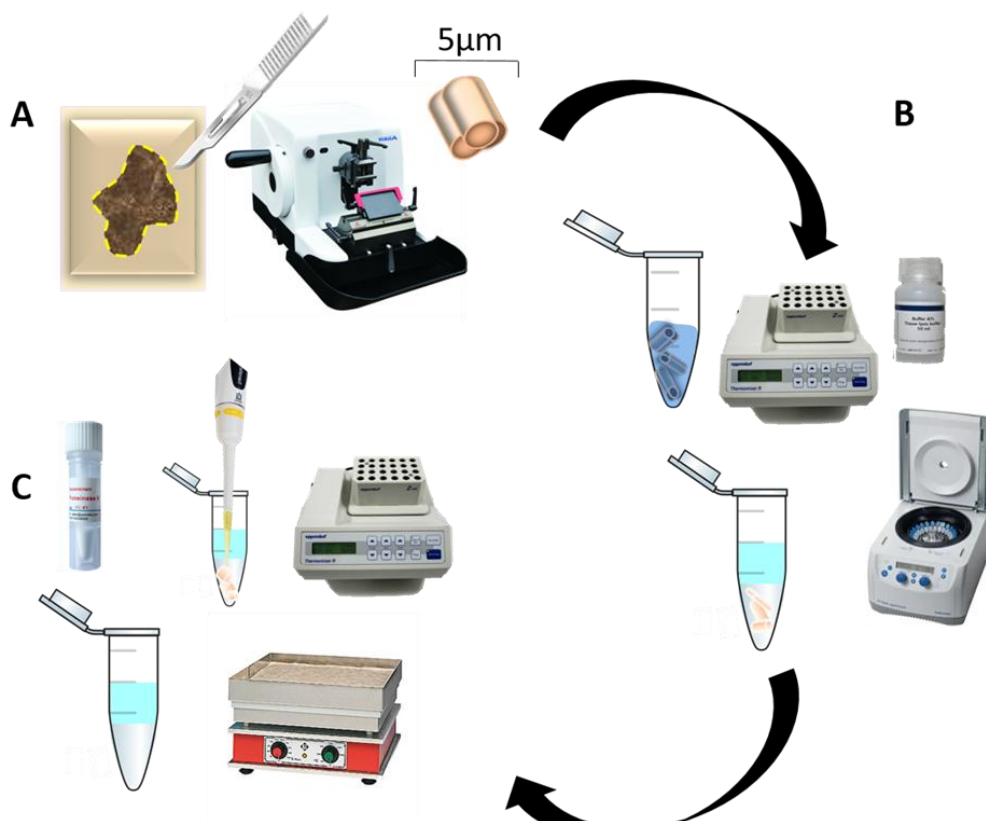
### 4.2 Amostras

Lâminas coradas em hematoxilina e eosina de casos arquivados de LPCG associadas aos implantes dentários foram revisados por um patologista bucal (R.S.G) e seleccionadas após confirmação do diagnóstico. Utilizou-se uma amostra de conveniência constituída por quinze espécimes de LPCG periimplantares fixados em formol tamponado a 10%, pH 7,4 e incluídos em parafina.

### 4.3 Extração do DNA

Para extração de DNA dos tecidos parafinados utilizou-se o kit comercial *QIAamp® DNA FFPE Tissue* (QIAGEN, Hilden, Germany). Em média 23 cortes com 5µm de espessura foram obtidos, desprezando-se os três primeiros cortes de cada amostra. Visando otimizar a etapa de desparafinização, utilizou-se uma solução desparafinizadora (QIAGEN, Hilden Germany), seguindo as orientações do fabricante. A solução foi adicionada aos cortes acondicionados em microtubos que, após agitação, foram incubados por 15 minutos a 56°C. Em seguida a solução tampão *ATL* (QIAGEN, Hilden, Germany) foi adicionada e os tubos foram centrifugados por 1 minuto a 11.000 rcf, resultando na separação da mistura em duas fases. Assim, prosseguiu-se a digestão enzimática do tecido por meio da adição de *proteinase K* (Thermo Fisher Scientific, São Paulo) na fase transparente e incubação a 56°C até a lise completa do tecido. Subsequentemente, os tecidos foram incubados em banho seco a 90°C por 1 hora para inversão das ligações covalentes entre os ácidos nucleicos (*crosslinks*) originadas da ação do formaldeído sobre o tecido. A primeira etapa do processo de extração pode ser observada na Figura 2.

Figura 2 – Primeira etapa do processo de extração do DNA.



Legenda: a) Obtenção dos cortes.

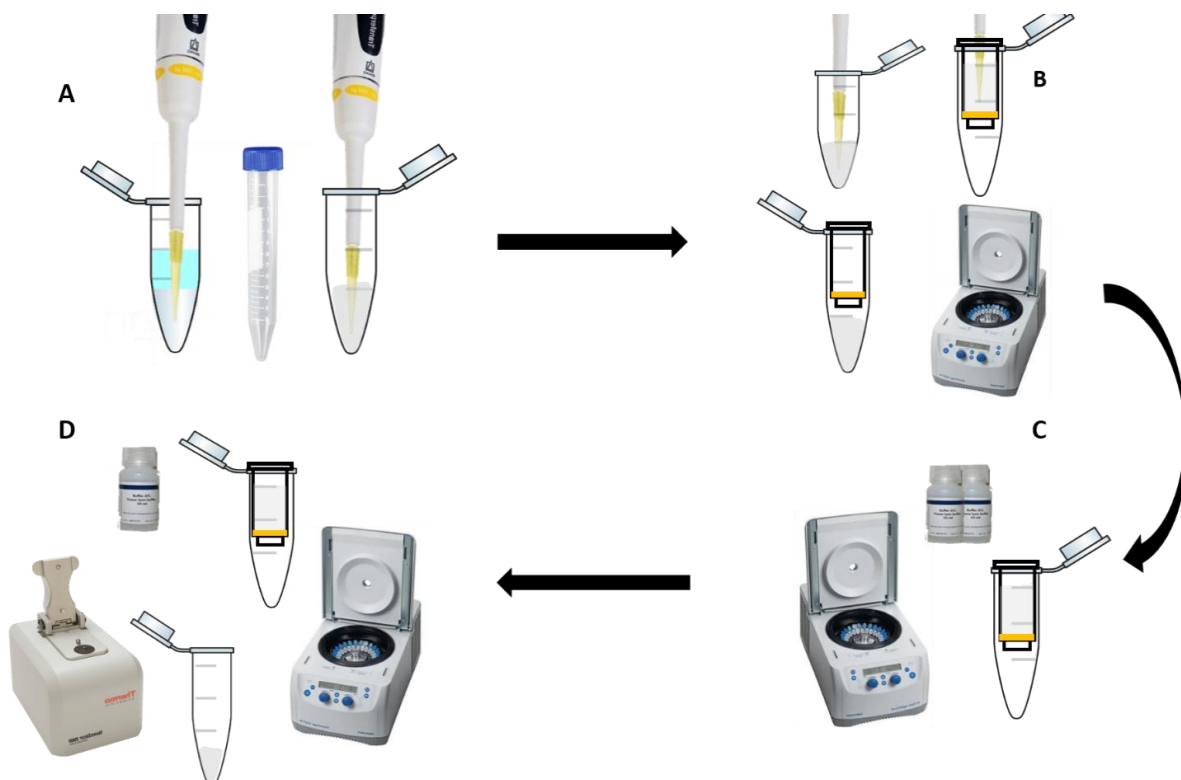
b) Incubação com solução desparafinizadora e separação da mistura com Buffer ATL.

c) Incubação com Proteinase K e banho seco.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Em seguida, a fase transparente foi transferida para um novo microtubo e adicionados tampão *AL* e etanol 100%. Todo o conteúdo foi transferido para a coluna *QIAamp Min Elute column*, *QIAGEN, Hilden, Germany*) e centrifugado a 6000 rcf por um minuto. O processo de lavagem subsequente foi conduzido por meio da adição dos tampões *AW1* e *AW2*, seguido por centrifugação a 6000 rcf por 1 minuto cada. Finalmente, o DNA foi eluído em tampão *ATE*. Um microlitro de DNA foi analisado quantitativamente e qualitativamente usando o instrumento *NanoDrop (NanoDrop, Thermo Fischer Scientific, São Paulo, Brasil)*. A razão de absorbância 260/280 de aproximadamente 2 foi considerada para determinar a pureza do DNA extraído. As principais etapas da segunda fase do processo de extração podem ser observadas na Figura 3.

Figura 3 – Segunda etapa do processo de extração do DNA



Legenda: a) Transferência da fase transparente e adição de *Buffer AL* e etanol 100%.  
b) Transferência do conteúdo para coluna e centrifugação.  
c) Processo de lavagem com *Buffers AW1* e *AW2*.  
d) Eluição do DNA com *Buffer ATE* e quantificação em *NanoDrop*.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.



#### 4.4 Reação em cadeia de polimerase (PCR)

A reação em cadeia de polimerase (PCR) foi realizada para amplificar as regiões de interesse para o presente estudo. Para a reação, foram utilizados o reagente MyTaq™ Mix (Bioline Reagents Ltd, UK) e os *primers* abrangendo a sequência alvo de cada gene analisado. Os *primers* utilizados foram desenhados por meio do programa Primer-BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>). A cauda M13 foi adicionada para simplificar o fluxo de trabalho. Os *primers* utilizados e a temperatura de *melting* para cada gene estão descritos na Tabela 2. Foram utilizados um controle negativo, no qual o DNA não foi inserido, e um controle positivo constituído de DNA extraído de lesões de hiperplasia fibrosa.

Tabela 2 – *Primers* utilizados para a Reação de PCR.

Gene	Exon	<i>Primers Forward e Reverse</i>	Temperatura de <i>melting</i> (°C)
<i>KRAS</i>	2	5'GGCCTGCTGAAAATGACTGAA3' 5'GGTCCTGCACCAGTAATATGC3'	60
<i>KRAS</i>	4	5'TGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT3' 5'TCAGTGTTACTTACCTGTCTTGTC3'	58
<i>FGFR1</i>	9	5'GTCCATTTTGCTTCCGTTGT3' 5'GCAGAGTGAATGGGAGAGTCC3'	60
<i>FGFR1</i>	8	5'TGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT3' 5'TCAGTGTTACTTACCTGTCTTGTC3'	60
<i>TRPV4</i>	13	5'ACCTTCAGCACCTTCTCCT3' 5'CCAGATGTGCTTGCTCTCCT3'	58

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

A termociclagem foi conduzida no equipamento *Mastercycler® pro series* (Eppendorf, Hamburg, Germany). A temperatura de anelamento variou de acordo com os primers, sendo 60°C para os primers *KRAS* exon 2 e *FGFR1* exons 8 e 9, e 58°C para os primers *KRAS* exon 4 e *TRPV4* exon 13. Sendo assim, as amplificações foram realizadas em reações de termociclagem independentes.

A desnaturação inicial ocorreu a 95°C por 3 minutos, seguida por 45 ciclos de desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento por 15 segundos,

e extensão a 72°C por 30 segundos. A extensão final ocorreu a 72°C por 10 minutos.

A eletroforese em gel de agarose a 1,5%, para verificar a amplificação do DNA, utilizou 5µl do marcador *SYBR Safe DNA Gel Stain* (*Invitrogen, São Paulo, Brasil*) para fluorescência das bandas.

#### 4.5 Sequenciamento genômico (Sanger)

A purificação enzimática dos produtos de PCR foi realizada utilizando-se a enzima *ExoSAP-IT* (*Affymetrix, USB®, Santa Clara, CA, USA*) de acordo com as instruções do fabricante. Foram adicionados 2µl de enzima em 5µl de produto e então a solução passou por dois ciclos de termociclagem. O primeiro a 37°C por 15 min e o segundo a 80°C por 15min (*Mastercycler® pro series, Eppendorf, Hamburg, Germany*).

O sequenciamento bidirecional dos produtos de PCR foi realizado por meio de eletroforese capilar utilizando o sequenciador automático *ABI3130* (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*), com o reagente *BigDye v3.1 chemistry* (*Applied Biosystem*). Os cromatogramas foram analisados manualmente por meio do *software SnapGene® Viewer 4.3.4* utilizando as sequências referências de cada um dos genes. As ferramentas online PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) e SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant*) foram usadas para predição *in silico* do possível impacto funcional da substituição de um aminoácido na constituição da proteína.

#### 4.6 Imuno-histoquímica (IHQ)

A imuno-histoquímica (IHQ) foi realizada para investigar a ativação da via MAPK por meio da detecção da proteína ERK fosforilada. A reação de IHQ foi conduzida em protocolo *overnight*. Com o uso do micrótomo, dois cortes de 4µm de espessura de cada amostra foram obtidos e fixados em

lâminas de vidro silanizadas (*StarFrost, Knittel Glass, Germany*). No primeiro dia de reação, as lâminas contendo os cortes foram imersas em xilol (*Merck KGaA, Darmstadt, Germany*) por 25 minutos para desparafinação. Em seguida, os cortes foram reidratados em uma sequência de álcoois (álcool absoluto I, II, álcool 95% e 80%) por 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi realizada com a imersão dos cortes em solução TRIS- EDTA (Tris 1,21g + EDTA 0,372g – pH 8,0) a 90°C por 30 minutos utilizando panela elétrica a vapor (*IHC-Tek™ Epitope Retrieval Steamer Set*). O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com 2 banhos de 10 minutos cada, utilizando uma solução de metanol e peróxido de hidrogênio na proporção de 1:1. O anticorpo primário anti-pERK1/2 (*Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E) XP® Rabbit mAb #4370 – Cell Signaling Technology, Danvers, USA*) foi diluído em 1:100 e incubado por 18 horas a 4°C em câmara úmida.

O anticorpo secundário (*Dako envision-dual link system-HRP – Agilent Dako, Carpinteria, USA*) foi incubado em câmara úmida por 1 hora e meia. A reação foi revelada com a incubação dos cortes em solução DAB (*Dako Liquid DAB + Substrate Chromogen System – Agilent Dako, Carpinteria, USA*) durante 3 a 7 minutos, de acordo com a inspeção visual. Subsequentemente, foram realizados 5 banhos com água destilada e a contra-coloração em hematoxilina de Meyer. Os resultados foram avaliados em microscópio óptico de luz por três pesquisadores (R.R.M.C., C.C.G. e N.B.S.) e a marcação nuclear ou citoplasmática foi estabelecida como critério para a confirmação do resultado positivo da reação.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

A média de idade dos indivíduos afetados nos 15 casos de LPCG associada ao implante dentário foi de 59 anos (variando de 29 a 73). Destes, 12 (80%) foram do sexo feminino. A proporção masculino/feminino foi de 1:4. A

região posterior da mandíbula foi o sítio oral mais afetado (11/15; 73,3%). Todas as lesões foram associadas a implantes dentários. A reabsorção da crista óssea alveolar foi observada em 40% dos casos (6/15) e todos os pacientes foram tratados com biópsia excisional. A caracterização das amostras é apresentada na Tabela 3.

Tabela 3 – Caracterização das 15 amostras de lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.

<b>Amostra #</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Localização anatômica</b>	<b>Reabsorção óssea</b>
1	Feminino	70	Maxila posterior	Sim
2	Feminino	73	Mandíbula posterior	Não
3	Masculino	70	Mandibula posterior	Sim
4	Feminino	46	Mandibula posterior	Não
5	Masculino	50	Mandibula posterior	Sim
6	Feminino	52	Maxila anterior	Sim
7	Feminino	69	Mandibula posterior	Não
8	Feminino	61	Mandibula posterior	Não
9	Feminino	53	Maxila posterior	Não
10	Masculino	70	Maxila posterior	Não
11	Feminino	64	Mandibula posterior	Não
12	Feminino	53	Mandibula posterior	Não
13	Feminino	29	Mandibula posterior	Sim
14	Feminino	70	Mandibula posterior	Sim
15	Feminino	57	Mandibula posterior	Não

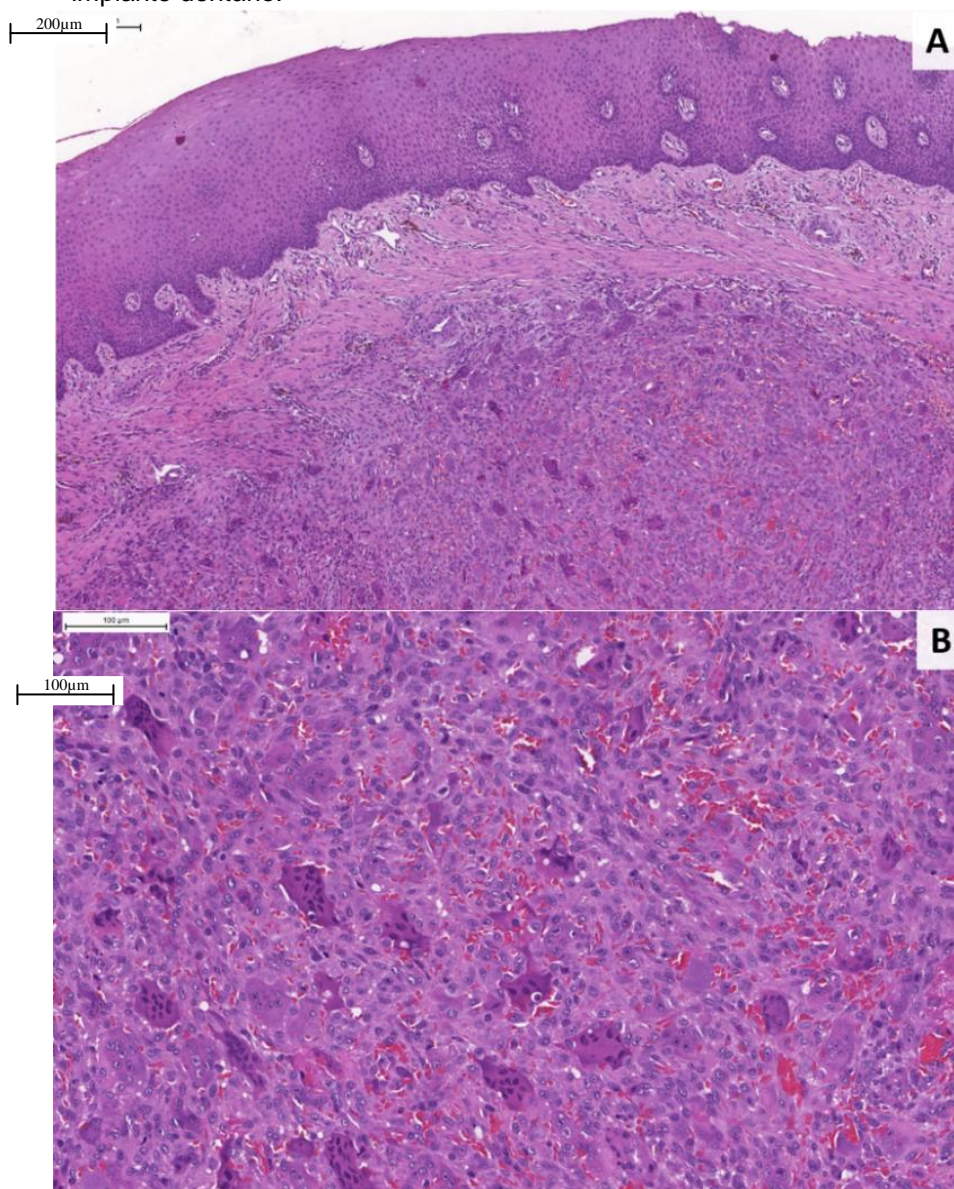
Fonte: elaborado pela autora, 2019

## 5.2 Análise Histopatológica

O exame histopatológico de todas as 15 amostras revelou um estroma fibrovascular, contendo células mononucleares fusiformes e ovoides

entremeadas por CGM. Áreas de hemorragia com depósitos de hemossiderina foram observadas esporadicamente. Neoformação óssea não foi observada nos casos analisados. Partículas originadas da corrosão do titânio foram observadas na amostra #10 (FIGURA 5). Imagens representativas do aspecto histopatológico da LPCG associada ao implante dentário podem ser observadas nas Figuras 4 e 5.

Figura 4 – Características histopatológicas da lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.



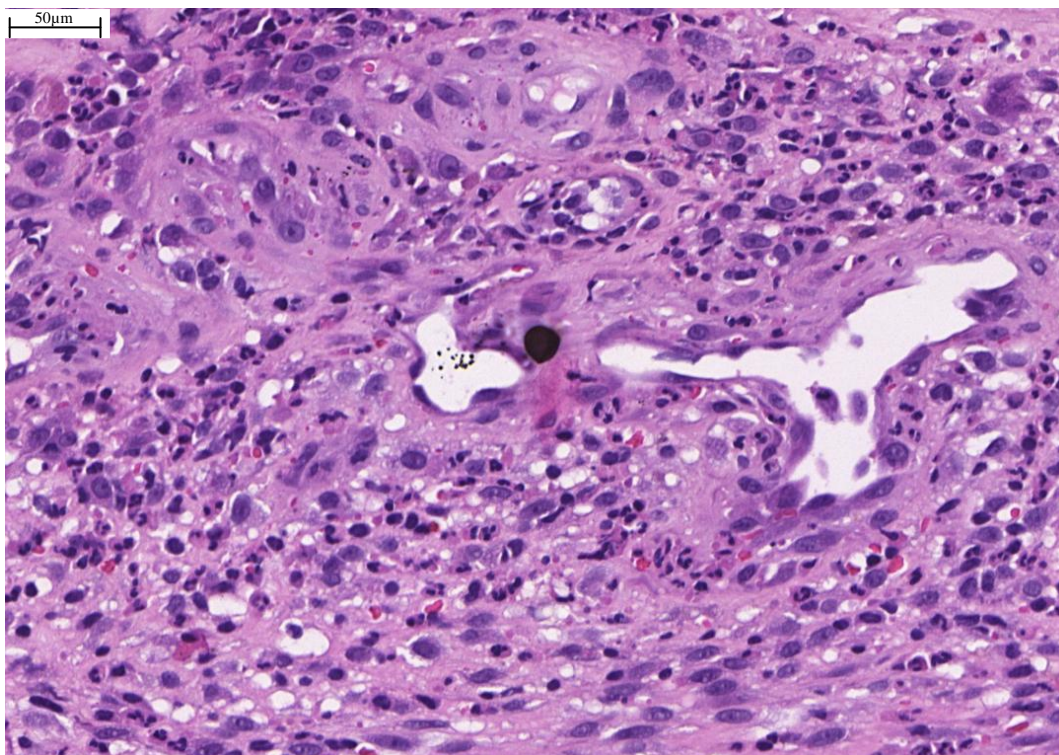
Legenda: Observam-se células mononucleares fusiformes e ovoides entremeadas por células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos em um estroma fibrovascularizado.

(Screenshots obtidos a partir do aplicativo *Case Viewer 2.3*)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.



Figura 5 – Características histopatológicas da lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.



Legenda: Áreas de pigmentação enegrecida sugestiva de partículas de titânio podem ser observadas no centro da imagem.

(Screenshots obtidos a partir do aplicativo *Case Viewer 2.3*)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

### 5.3 Sequenciamento de Sanger

Os resultados do sequenciamento por amostra estão descritos nas Tabelas 3 e 4. Mutações somáticas *drivers* (condutoras), com ganho de função e mutuamente exclusivas afetando os códons 12, 14, 37, 127 e 146 do gene *KRAS* foram detectadas em 8 das 15 amostras avaliadas (53.4%) (FIGURA 6, TABELA 4). Destas, 6 apresentaram mutações descritas como patogênicas e 2 mostraram variantes raras de significado incerto previamente descritas em apenas uma amostra cada (ROSSI *et al.*, 2017; ALAKUS *et al.* 2014). As mutações *KRAS* p.G12A/D (c.35G>C/T) foram detectadas nos casos #2 e #7, respectivamente. Essas mutações são as alterações patológicas mais frequentemente descritas em neoplasias de pulmão, pâncreas e intestino

(HAIGIS, 2017). As amostras #1, #5 e #9 apresentaram a mutação *KRAS* p.A146V (c.437C>T) (FIGURA 7). Essa mutação é encontrada em uma ampla proporção dos casos de carcinoma colorretal e mieloma múltiplo (HAIGIS, 2017; KORTUM *et al.*, 2015; VAUGHN *et al.*, 2011). A mutação *KRAS* p.V14L (c.40G>C) foi detectada na amostra #4. Mutações no códon 14 estão associadas às Rasopatias e à leucemia linfoblástica (DAMM *et al.*, 2014; HAIGIS, 2017; RICHTER-PECHAŃSKA *et al.*, 2017). As variantes *KRAS* p.E37K (c.109G>A) e p.T127I (c.380C>T) foram detectadas nas amostras #6 e #10. Essas mutações são raras e foram reportadas em uma amostra de discrasia de células plasmáticas (ROSSI *et al.*, 2017) e uma amostra de pseudomixoma peritoneal, respectivamente (ALAKUS *et al.* 2014). A mutação sinônima *KRAS* p.G15G (c.45C>T) foi detectada em 1 caso (#11) (FIGURA 8).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) foram detectados em 4 casos, sendo #4 e #15 (*TRPV4* p.I678I c.2034C>T); #11 (*FGFR1* p.A367V c.2000C>T) e #9 (*KRAS* p.T144T c.432A>G) (FIGURA 9, TABELA 4).

Os demais casos #3, #8, #12 e #13 apresentaram a sequência *wild-type* (selvagem) para todos os genes investigados. Nenhuma mutação patogênica foi detectada nos genes *FGFR1* e *TRPV4*. Os cromatogramas dos casos mutados podem ser observados nas Figuras 6, 7, 8 e 9.

Tabela 4 – Mutações somáticas *drivers* encontradas nos casos de lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.

Amostra (#)	<i>KRAS</i> exon 2 (codons 10, 12, 13, 14 e 19)	<i>KRAS</i> exon 4 (codon 146)	Predição de patogenicidade	
			<i>PolyPhen-2</i> **	SIFT***
1	WT*	p.A146V	0.998	0
2	p.G12A	WT	0.956	0.02
4	p.V14L	WT	0.998	0
5	WT	p.A146V	0.998	0
6	p.E37K	WT	0.628	0
7	p.G12D	WT	0.517	0
9	WT	p.A146V	0.998	0
10	WT	p.T127I	0.070	0.34

\* *Wild Type* – sequência selvagem

\*\* *Polymorphism Phenotyping v2*: 0 – mutação possivelmente benigna.

1 – mutação possivelmente patogênica.

\*\*\* *Sorting Tolerant From Intolerant*: ≤ 0.05 – mutação possivelmente patogênica

> 0.05 – mutação possivelmente benigna.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Tabela 5 – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) e mutação sinônima encontrados nos casos de lesão periférica de células gigantes associada ao implante dentário.

Amostra (#)	<i>KRAS</i> exon 2 (codons 10, 12, 13, 14 e 19)	<i>KRAS</i> exon 4 (codon 146)	<i>TRPV4</i> exon 13 (codon 713)	<i>FGFR1</i> exon 8 e 9 (codon 381)	MAF** (gnomAD)	dbSNP***
4	WT*	WT	p.I678I	WT	0.1695	rs3742037
9	p.T144T	WT	WT	WT	0.000007964	rs766109434
11	p.G15G	WT	WT	WT	-	-
11	WT	WT	WT	p.A367V	0.00000406	rs1324436328
15	WT	WT	p.I678I	WT	0.1695	rs3742037

\**Wild Type* – sequência selvagem

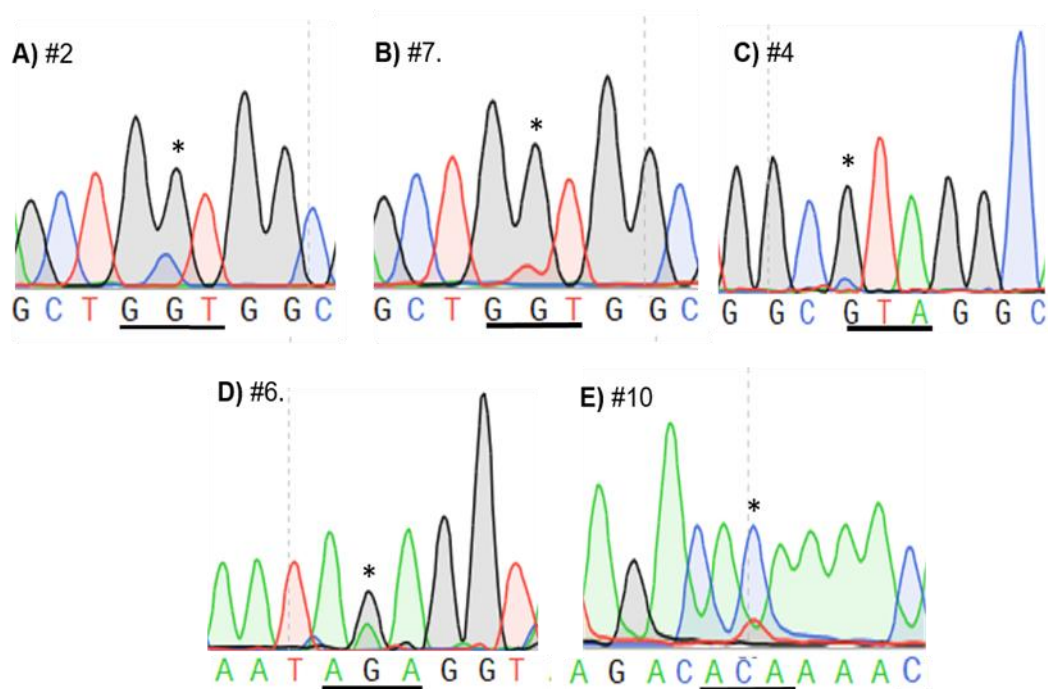
\*\**Minor Allele Frequency* – Frequência do alelo menos comum. Determina a frequência em que este alelo ocorre na população. MAF>0.01 são consideradas variantes de nucleotídeo único comuns e representam, potenciais polimorfismos.

\*\*\**Single Nucleotide Polymorphism database*.

Fonte: elaborado pela autora, 2019.



Figura 6 – Mutações *KRAS* p.G12A; p.G12D; p.V14L; p.E37K e p.T127I detectadas nas amostras #2, #7 #4, #6 e #11 pelo sequenciamento de Sanger.



Legenda: Cromatogramas mostrando trocas de nucleotídeos associadas às mutações no gene *KRAS*.

a) Troca de Guanina para Citosina (*KRAS* c.35G>C) resultando na substituição de Glicina por Alanina (p.G12A).

b) Troca guanina para timina (*KRAS* c.35G>T) resultando na substituição de Glicina por Asparagina (p.G12D).

c) Troca de Guanina para Citosina (*KRAS* c.40G>C) resultando na substituição de Valina por Leucina (p.V14L).

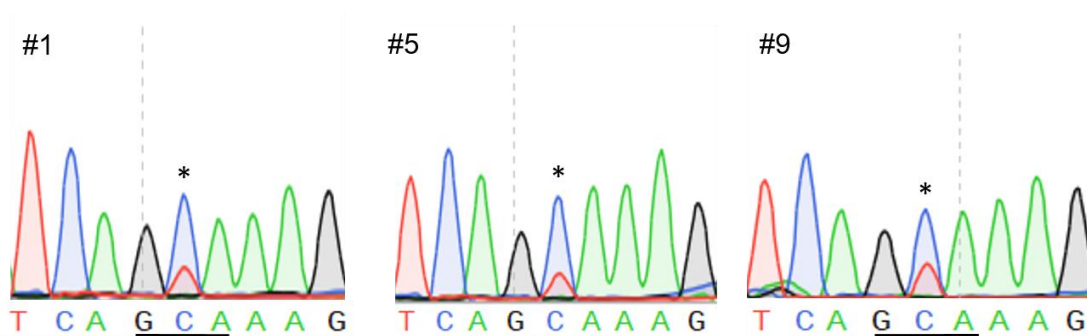
d) Troca de Guanina para Adenina (*KRAS* c.109G>A) resultando na substituição de Glutamina por Lisina (p.E37K).

e) Toca de Citosina para Timina (*KRAS* c.380C>T) resultando na substituição de Treonina por Isoleucina (p.T127I)

(Screenshots obtidos do aplicativo *Snap Gene® Viewer* 4.3.4)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Figura 7 – Mutação *KRAS* p.A146V detectada nas amostras #1, #5 e #9 pelo sequenciamento de Sanger.

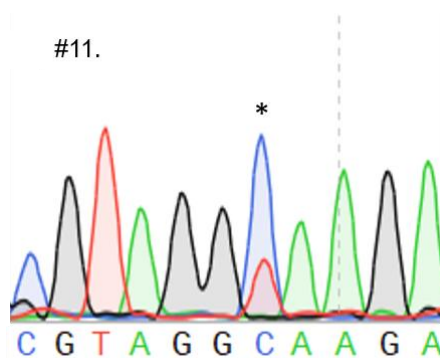


Legenda: Cromatogramas mostrando troca de Citosina para Timina (*KRAS* c.437C>T) com consequente substituição do aminoácido Alanina pelo aminoácido Valina (p.A146V).

(Screenshots obtidos do aplicativo *Snap Gene® Viewer* 4.3.4)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Figura 8 – Mutação sinônima *KRAS* p.G15G detectada na amostra #11 pelo sequenciamento de Sanger

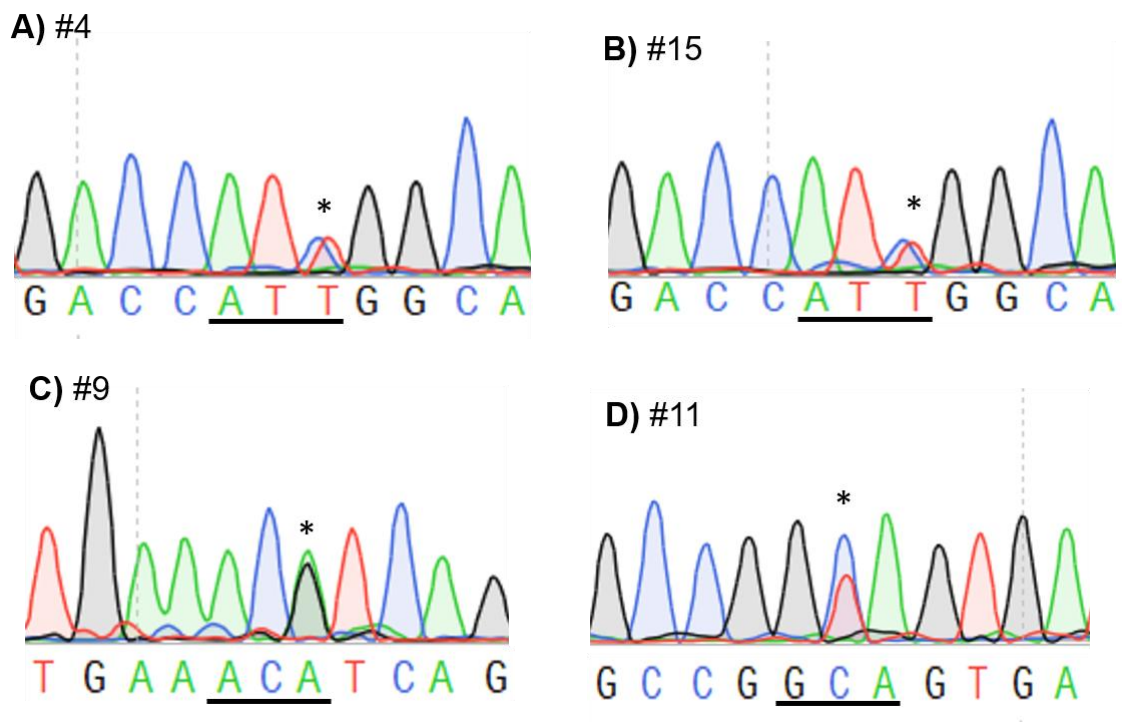


Legenda: Cromatograma mostrando a troca de Citosina para Timina (*KRAS* c.45G>C) com manutenção do aminoácido Glicina – mutação sinônima (p.G15G).

(Screenshot obtido do aplicativo *Snap Gene® Viewer* 4.3.4)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

Figura 9 – Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), *TRPV4* p.I678I; *KRAS* p.T144T e *FGFR1* p.A367V detectados nas amostras #4, #15, #9 e #11 pelo sequenciamento de Sanger



Legenda: Cromatogramas mostram trocas de nucleotídeos associadas aos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs).

- a) e b) Troca de Citosina para Timina (*TRPV4* c.2034C>T) com manutenção do aminoácido Isoleucina (p.I678I).
- c) Troca de Alanina para Guanina (*KRAS* c.432A>G) com manutenção do aminoácido Treonina (p.T144T).
- d) Troca de Citosina para Timina (*FGFR1* c.2000C>T) resultando na substituição de Alanina por Valina (p.A367V)

(Screenshots obtidos do aplicativo *Snap Gene® Viewer* 4.3.4)

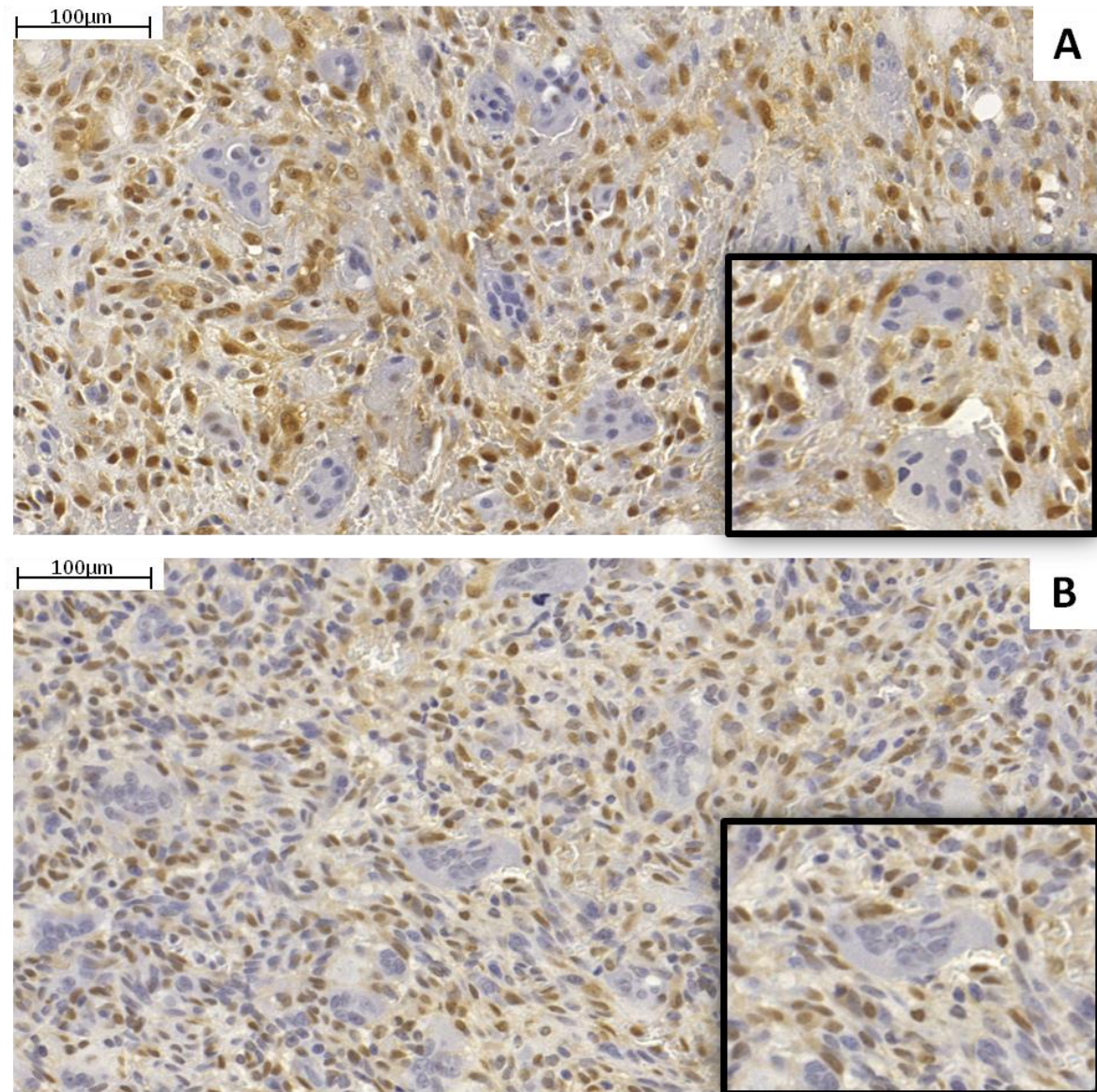
Fonte: elaborado pela autora, 2019.

#### 5.4 Análise Imuno-histoquímica (IHQ)

A imunopositividade para a forma fosforilada da proteína ERK1/2 foi observada em todos os casos investigados. As células mononucleares apresentaram intensa positividade nuclear e citoplasmática para fosfo-ERK1/2 [p44/42 MAPK (Erk1/2)], enquanto as células gigantes multinucleadas foram negativas. Grande parte das células endoteliais também demonstrou forte expressão nuclear e citoplasmática de ERK1/2 fosforilada. A positividade de fosfo-ERK1/2 nesses componentes celulares sugere ativação da via MAPK/ERK. Ainda, a positividade da forma fosforilada das proteínas ERK 1 e 2 foi observada nas células constituintes do epitélio estratificado pavimentoso, o que é consistente com a atividade proliferativa característica de células epiteliais e com papel da via MAPK no processo de proliferação celular. A expressão de ERK1/2 nos componentes celulares supracitados pode ser observada nas Figuras 10 e 11.



Figura 10 – Expressão de fosfo-ERK1/2 na lesão periférica de células gigantes associada com implantes



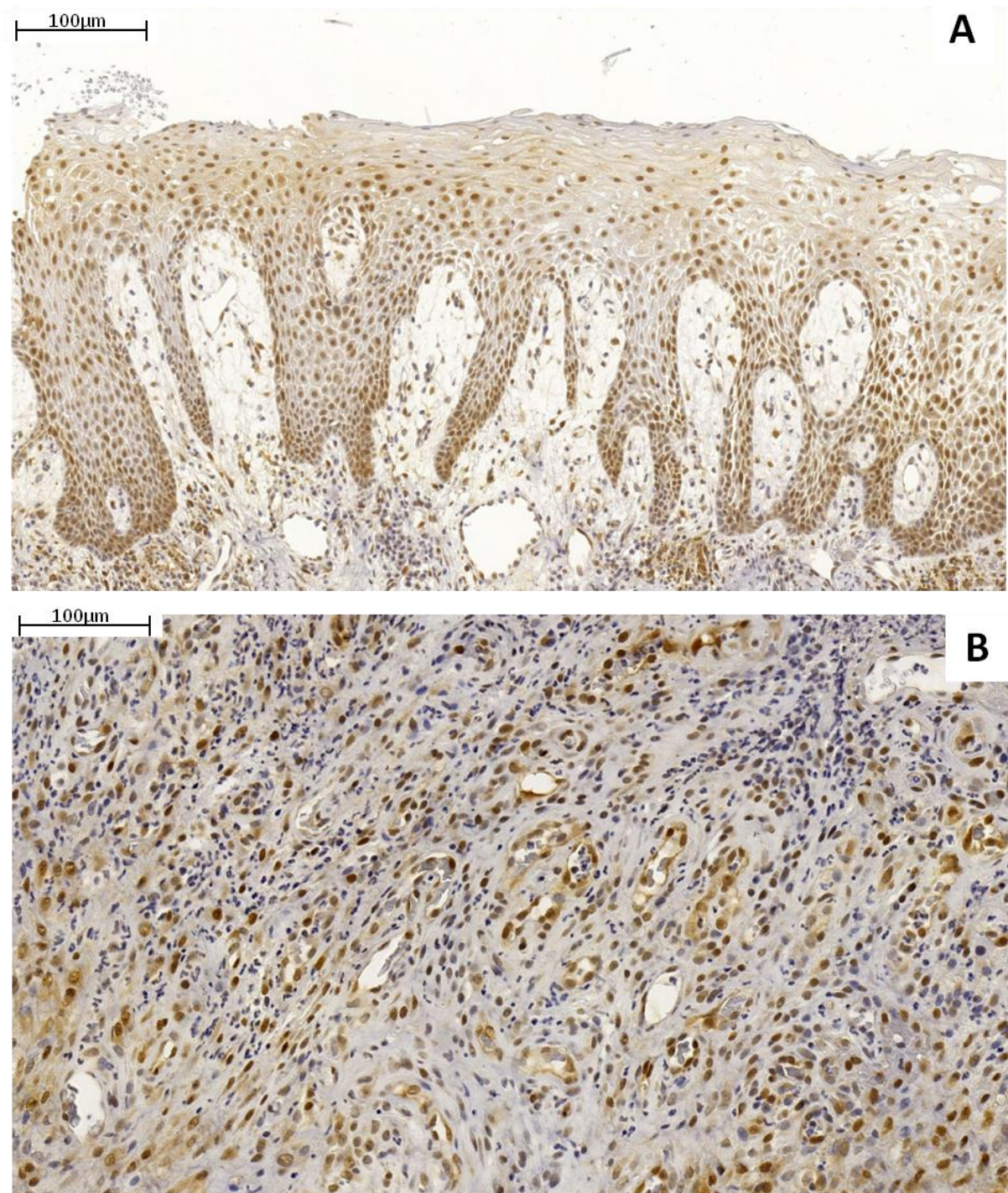
Legenda: Marcação nuclear e citoplasmática intensa para fosfo-ERK1/2 nas células mononucleares e ausência de marcação nas células gigantes multinucleadas nos casos #2 (A) e #15 (B). Imunonegatividade das células gigantes multinucleadas em destaque no canto inferior direito de ambas as imagens.

(Screenshots obtidos do aplicativo Case Viewer 2.3)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.



Figura 11 – Expressão de fosfo-ERK1/2 na lesão periférica de células gigantes associada com implantes



Legenda: Marcação nuclear e citoplasmática de fosfo-ERK1/2 pelas células do epitélio de revestimento da mucosa (A) e células endoteliais (B).

(Screenshots obtidos do aplicativo *Case Viewer 2.3*)

Fonte: elaborado pela autora, 2019.

## 6 DISCUSSÃO

Ocasionalmente, a LPCG pode ser encontrada associada com um implante dentário. Até o momento, apenas 42 casos desta lesão foram reportados na literatura (BIDRA, PERSENAIRE e NATARAJAN, 2019; BORSTEIN *et al.*, 2018; BOZCAYA *et al.*, 2018; CHRCANOVIC *et al.*, 2019). Foi sugerido que a doença se origina de uma resposta reativa da gengiva ou mucosa alveolar aos estímulos inflamatórios crônicos locais. A exposição dos tecidos gengivais à superfície rugosa do implante, o acúmulo de placa e tártaro sob as margens de próteses mal adaptadas e a corrosão do titânio foram algumas fontes de irritação crônica local descritas como fator etiológico (CLOUTIER *et al.*, 2007; HERNANDEZ *et al.*, 2009; OLMEDO *et al.*, 2010; ÖZDEN *et al.*, 2009). No entanto, não existem estudos sobre o mecanismo molecular relacionado ao desenvolvimento dessa lesão.

As lesões periimplantares e as LPCG convencionais compartilham as mesmas características clínicas e histopatológicas. Estudo recente analisou o exoma das LPCG e detectou mutações ativadoras nos genes *KRAS* e *FGFR1* em 71% e 10% das amostras investigadas, respectivamente (GOMES *et al.*, 2018). O mesmo perfil mutacional foi descrito para o fibroma não-ossificante, que apresentou uma alta proporção de mutações *KRAS* (47.3%) e *FGFR1* (21%) (BAUHMOER *et al.*, 2019). O fibroma não-ossificante é uma lesão intraóssea de curso auto limitante, que ocorre na região posterior da mandíbula de indivíduos jovens e compartilha o mesmo quadro histopatológico visto nas LCG dos maxilares. Ainda, substituições afetando o gene *TRPV4* foram reportadas apenas na LCCG.

Em razão da similaridade microscópica entre as LCG com a LPCG associada aos implantes, no presente estudo investigamos as mutações *hotspot* nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* em 15 amostras das lesões associadas à implantes dentários. Diante do conhecimento de que essas mutações promovem a ativação constitutiva de MAPK/ERK, estudamos também a expressão da proteína fosforilada da ERK para avaliação da ativação dessa via de sinalização.

A superfamília *RAS* é constituída por proteínas conservadas à montante que possuem um papel crucial na transdução do sinal extracelular e ativação de

inúmeras vias de sinalização à jusante. Mutações nos genes *RAS* são as principais alterações genéticas encontradas em uma infinidade de processos neoplásicos, benignos ou malignos (CICENAS *et al.*, 2017; DINIZ *et al.*, 2017; MONTSERRAT *et al.*, 1989; WANG *et al.*, 2017). Em consonância com os achados anteriormente relatados para o fibroma não-ossificante e a LPCG convencional (BAUMHOER *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2018), 8/15 (53,4%) das LPCG associadas ao implante dentário mostraram mutações *KRAS* levando às substituições p.G12A (n=1), p.G12D (n=1), p.V14L (n=1), p.E37K (n=1), p.T127I (n=1) e p.A146V (n=3).

*KRAS* é o oncogene mais frequentemente mutado no câncer. As mutações ocorrem no códon 12 em cerca de 90% dos casos. A substituição p.G12D é vista em 40% a 50% dos cânceres de pâncreas e colorretais, enquanto p.G12A é mais reportada nos cânceres de pulmão (HAIGIS *et al.*, 2017). Alterações no códon 146 representam uma proporção significativa de mutações *KRAS* e ocorrem quase que exclusivamente nos carcinomas colorretais (CICENAS *et al.*, 2017; HAIGIS *et al.*, 2017). As mutações *KRAS* p.E37K e p.T127I foram previamente reportadas em uma amostra de pseudomixoma peritoneal e em uma amostra de discrasia de células plasmáticas, respectivamente (ALAKUS *et al.*, 2014; ROSSI *et al.*, 2017). No entanto, são consideradas variantes raras de significado incerto e estudos futuros são necessários para a elucidação do efeito funcional dessas mutações.

Dentre os cânceres de pâncreas, pulmão e colorretal, o adenocarcinoma pancreático ductal é o que carrega a maior proporção de mutações *KRAS* (HAIGIS *et al.*, 2017; PERINCHERI e HUI, 2014; TSUCHIDA *et al.*, 2016).

A pancreatite crônica foi considerada um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de pâncreas (LOWENFEELS *et al.*, 1993). Mutações no códon 12 do gene *KRAS* foram amplamente detectadas nos exames citológicos dos pacientes afetados pela doença (CALDAS *et al.*, 1994; FURUYA *et al.*, 1997; van LAETHEM, 1999). Do mesmo modo, pacientes portadores de doenças intestinais inflamatórias, como a colite ulcerativa e a doença de Crohn, foram considerados mais propensos a desenvolver câncer colorretal (GRIVENNIKOV, 2013; LYDA *et al.*, 2000). Em contrapartida, mutações *KRAS* também foram encontradas em tecidos pulmonares, pancreáticos e endometriais sem alterações neoplásicas e em amostras de fezes de pacientes saudáveis (LAC *et al.*, 2019; TADA *et al.*, 1996; YAKUBOVSKA *et al.*, 1995). Devido à essas conjecturas, o campo de estudo que busca elucidar o papel da inflamação na oncogênese tem crescido exponencialmente.



A interação entre as células do sistema imunológico com um antígeno endógeno ou exógeno resulta na formação de radicais livres que podem se difundir entre as células durante a inflamação, danificar o DNA e formar moléculas altamente mutagênicas, capazes de causar mutações somáticas, ativar proto-oncogenes e inibir a ação dos genes supressores de tumor (KHANSARI, SHAKIBA e MAHMOUDI, 2009). A presença de proteínas *RAS* ativas em níveis fisiológicos não foi suficiente para a indução de processos patológicos (GUERRA *et al.*, 2003). Contudo, o estímulo inflamatório pode amplificar a atividade de *RAS* à níveis patológicos, resultando na regulação positiva das vias pró-inflamatórias e em uma progressão rápida para o câncer (BAOAN *et al.*, 2009; DANILUK *et al.*, 2012).

Portanto, a presença da inflamação nos tecidos peri-implantares pode promover a ativação de *RAS* e a cronicidade deste estímulo pode amplificar a atividade deste gene, dando origem às alterações moleculares detectadas neste estudo. A manutenção da regulação positiva dos genes *RAS* promove a ativação da via de sinalização MAPK/ERK. A positividade intensa para a proteína fosfo-ERK no estudo imunohistoquímico, observada nas células mononucleares das nossas amostras, é consistente com a ativação sustentada desta via.

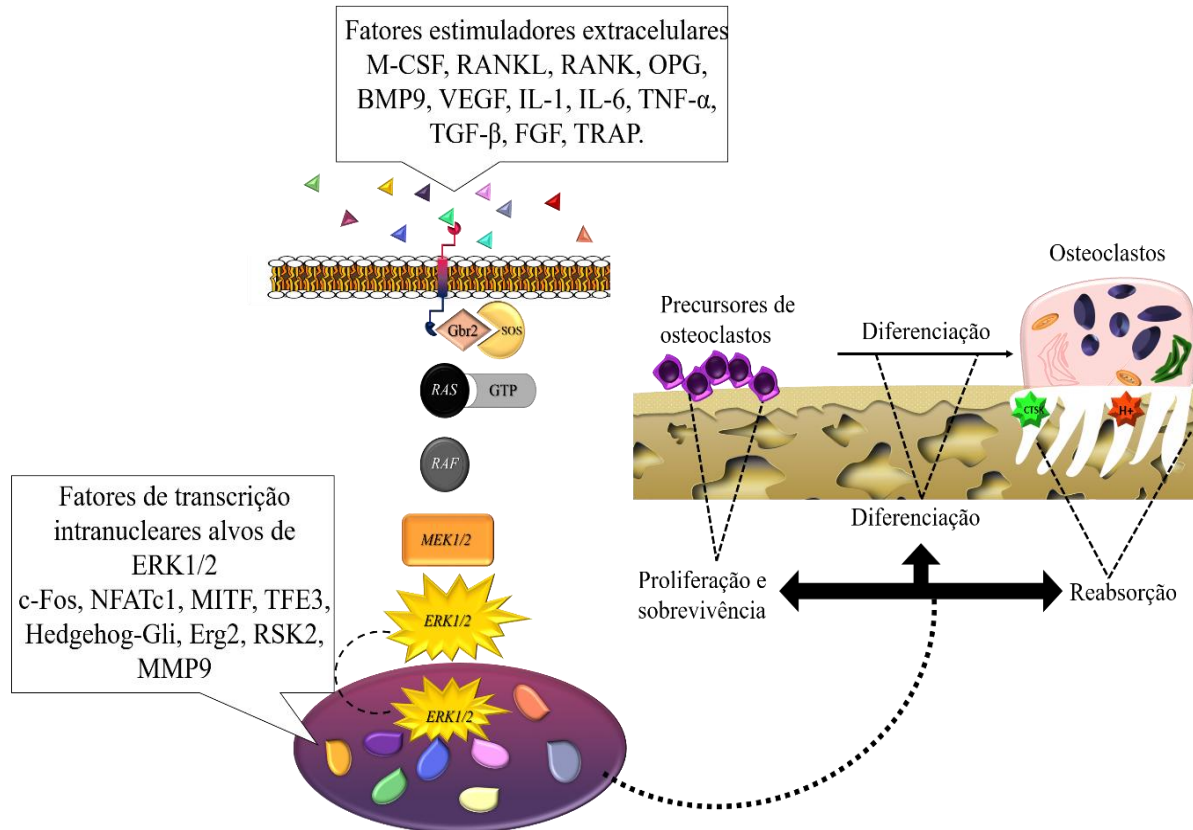
Diversas pesquisas sugerem que as células mononucleares das LCG dos maxilares representam o componente lesional proliferativo (HOSUR *et al.*, 2017; MIGHELL, ROBINSON e HUME, 1996; SOUZA *et al.*, 1999; SOUZA, MESQUITA e GOMEZ *et al.*, 2000). No presente estudo, a positividade imuno-histoquímica para fosfo-ERK1/2 foi encontrada principalmente nas células mononucleares, sendo que as CGM foram negativas, o que dá suporte a hipótese de que as células mononucleares representam o componente proliferativo na LPCG associada com implantes.

Ademais, estudo recente confirmou que as mutações *KRAS* p.G12D no fibroma não-ossificante ficaram restritas à essas células (BAUHMOER *et al.*, 2019). Assim como previamente elucidado, é possível que as mutações identificadas neste estudo também estejam presentes em uma proporção pequena das células mononucleares (BOVÉE e HOGENDOORN, 2019). Entretanto, novos estudos são necessários para confirmação dessa hipótese.

A osteoclastogênese é um dos inúmeros processos celulares que pode ser controlado pela via de sinalização MAPK/ERK. Uma variedade de citocinas e fatores de crescimento expressos pelas LCG atuam de forma sinérgica na regulação

positiva da sinalização de ERK no processo de formação dos osteoclastos. Uma vez ativada, diversos fatores de transcrição atuam controlando a osteoclastogênese (LEE *et al.*, 2009, LEE *et al.*, 2018). Um estudo experimental em camundongos mostrou que a supressão da via MAPK/ERK inibiu a expressão de genes indutores da formação osteoclástica, prevenindo a perda óssea induzida por partículas de titânio (HU *et al.*, 2017). A cascata de sinalização osteoclastogênica MAPK/ERK é representada pela Figura 12.

Figura 12 – Esquema de diferenciação osteoclástica mediada pela via de sinalização MAPK/ERK



Legenda: As citocinas e fatores estimuladores extracelulares desencadeiam a ativação da via de sinalização MAPK/ERK. ERK1/2 translocada ao núcleo ativa os fatores de transcrição intranucleares responsáveis pela proliferação, sobrevivência e diferenciação dos precursores de osteoclastos em osteoclastos maduros, culminando na reabsorção óssea.

Fonte: LEE *et al.*, 2018 (Adaptado).

As CGM que compõem a LPCG associada ao implante possuem um fenótipo osteoclástico. A análise dos achados do presente estudo com a literatura pertinente nos permite postular que o estímulo inflamatório crônico local poderia ser o fator etiológico potencial para as mutações no gene *RAS*. Essas mutações estão possivelmente localizadas em um percentual de células mononucleares fusiformes

do estroma que levam ao acúmulo e ativação das demais células mononucleares presentes na lesão. A ativação sustentada da via MAPK/ERK, por sua vez, poderia levar à regulação positiva do processo de osteoclastogênese, resultando na formação das CGM. Ainda, as células mononucleares fusiformes podem expressar citocinas que participam do processo de recrutamento das células de linhagem monocítica/macrofágica e dos pré-osteoclastos vindos do sangue, o que também repercute na formação das CGM. Logo, o equilíbrio entre as atividades das células mononucleares mutadas e não-mutadas, células de linhagem monocítica/macrofágica e CGM pode definir o microambiente de desenvolvimento da LPCG associada ao implante dentário.

Mutações no gene *FGFR1* são eventos genéticos extremamente raros e podem não ter sido detectados por dois motivos: a reduzida quantidade de amostras disponíveis para o estudo e pela limitação da técnica de detecção utilizada. O sequenciamento de Sanger amplifica apenas uma região previamente definida do gene estudado. É possível que utilizando técnicas mais sensíveis como o sequenciamento do exoma inteiro, um padrão mutacional mais heterogêneo pudesse ser encontrado. A ausência de mutações afetando o gene *TRPV4* era de certa forma esperada, uma vez que essas alterações também não foram detectadas nas LPCG esporádicas e no fibroma não-ossificante.

## 7 CONCLUSÃO

Em suma, os resultados deste estudo nos permitem inferir que as mutações *KRAS* ativadoras da via MAPK/ERK p.G12A, p.G12D, p.V14L, p.E37K, p.T127I e p.A146V ocorrem na LPCG associada ao implante dentário. A expressão da proteína ERK fosforilada foi intensa nas células mononucleares da lesão. A doença apresenta elevada similaridade genética com a LPCG convencional e com o fibroma não-ossificante e pode ser incluída sob o mesmo espectro de alterações patológicas ricas em células gigantes. O desenvolvimento de outros estudos utilizando o sequenciamento de exoma completo em um maior número de amostras pode ampliar o perfil mutacional detectado nas LPCG peri-implantares.

## REFERÊNCIAS

AGHBALI, A. et al. Correlation of histopathologic features with demographic, gross and radiographic findings in giant cell granulomas of the jaws. **Journal of dental research, dental clinics, dental prospects**, v. 7, n. 4, p. 225, 2013.

ALAKUS, H. et al. Genome-wide mutational landscape of mucinous carcinomatosis peritonei of appendiceal origin. **Genome medicine**, v. 6, n. 5, p. 43-54, 2014.

AMARAL, F. 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. **Tumor Biology**, v. 32, n. 5, p. 997-1003, 2011.

AMARAL, F. et al. WWOX expression in giant cell lesions of the jaws. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 116, n. 2, p. 210-13, 2013.

AMARY, M. F. et al. The H3F3 K36M mutant antibody is a sensitive and specific marker for the diagnosis of chondroblastoma. **Histopathology**, v. 69, n. 1, p. 121-27, 2016.

ATARBASHI-MOGHADAM, F. et al. Reactive oral lesions associated with dental implants. A systematic review. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12342, 2018.

BAOAN, J. I. et al. Ras activity levels control the development of pancreatic diseases. **Gastroenterology**, v. 137, n. 3, p. 1072-82, 2009.

BARTEL, H.; PIATOWSKA, D. Electron microscopic study of peripheral giant-cell reparative granuloma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, v. 43, n. 1, p. 82-96, 1977.

BAUHMOER, D. et al. An update of molecular pathology of bone tumors. Lessons learned from investigating samples by next generation sequencing. **Gene Chromosomes and Cancer**, v. 58, n. 2, p. 89-99, 2019.

BAUMHOER, D. et al. Activating mutations in the MAP-kinase pathway define non-ossifying fibroma of bone. **The Journal of pathology**, v. 248, n. 1, p. 116-22, 2019.

BEHJATI, S. et al. Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nature genetics**, v. 45, n. 12, p. 1479, 2013.

BISCHOF, M.; NEDIR, R.; LOMBARDI, T. Peripheral giant cell granuloma associated with a dental implant. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 19, n. 2, 2004.

BOFFANO, P. et al. Review of peripheral giant cell granulomas. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 24, n. 6, p. 2206-8, 2013.

BORNSTEIN, M. M. et al. Peripheral giant-cell granuloma in peri-implant tissues. **Swiss dental journal**, v. 128, n. 12, p. 980, 2018.

BOȘCA, A. B. et al. Diagnostic and therapeutic approaches in oral cavity granulomas based on new data concerning their origin and pathogenesis. **Romanian journal of morphology and embryology**, v. 59, n. 3, p. 679-90, 2018.

BOVÉE, J. V. M. G; HOGENDOORN, P. C. W. Non-ossifying fibroma: a RAS-MAPK driven benign bone neoplasm. **The Journal of pathology**, v.248, p. 116-22, 2019.

BOZKAYA, S. et al. Peripheral giant cell granuloma related to a dental implants - A clinical report. **Journal of Dental & Oro-facial Research**, v.9, n.1, p. 52-4, 2013.

BIDRA, A. S.; PERSENAIRE, M. J.; NATARAJAN; E. Management of peripheral giant cell granuloma around complete-arch fixed implant-supported prosthesis: A case series. **The Journal of prosthetic dentistry**, 2019.

BRIERLEY, D. J.; CRANE, H.; HUNTER, K. D. Lumps and bumps of the gingiva: a pathological miscellany. **Head and neck pathology**, p. 1-11, 2019.

BROOKS, P. J.; GLOGAUER, M.; MC CULLOCH; C. A. An Overview of the Derivation and Function of Multinucleated Giant Cells and Their Role in Pathological Processes. **The American journal of pathology**, 2019.

BROWN A. L., et. al. Peripheral Giant Cell Granuloma Associated with a Dental

Implant: A Case Report and Review of the Literature. **Case reports in dentistry**, v. 2015, n. 697673, 2015.

BUI, P. et al. Chondroblastoma of the temporomandibular joint: report of a case and literature review. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 67, n. 2, p. 405-9, 2009.

CALDAS, C. et al. Detection of K-ras mutations in the stool of patients with pancreatic adenocarcinoma and pancreatic ductal hyperplasia. **Cancer research**, v. 54, n. 13, p. 3568-73, 1994.

CARGNELLO, M.; ROUX, P. P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 76, n. 2, p. 496, 2011.

CAVEZZI J. O. Complicações em implante dentário devido a lesão periférica de células gigantes: relato de caso clínico. **Revista Brasileira de Patologia Oral**, v. 3, n. 4, p. 199–203, 2004.

CHRCANOVIC, B. R.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Peripheral giant cell granuloma: An updated analysis of 2824 cases reported in the literature. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 5, p. 454-59, 2018.

CHRCANOVIC, B. R., GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Peripheral giant cell granuloma associated with dental implants: a systematic review. **Journal of stomatology, oral and maxillofacial surgery**, p. 1-6, 2019.

CHRCANOVIC, B. R.; GOMEZ, R. S.; FREIRE-MAIA, B. Neurofibromatosis type 1 associated with bilateral central giant cell granuloma of the mandible. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 7, p. 538-43, 2011.

CICENAS, J. et al. KRAS, NRAS and BRAF mutations in colorectal cancer and melanoma. **Medical Oncology**, v. 34, n. 2, p. 26, 2017.

CLOUTIER, M. et al. An analysis of peripheral giant cell granuloma associated with dental implant treatment. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 103, n. 5, p. 618-22, 2007.

COURA, B. P. et al. KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. **Modern Pathology**, p. 1, 2019.

DANILUK, J. et al. An NF- $\kappa$ B pathway-mediated positive feedback loop amplifies Ras activity to pathological levels in mice. **The Journal of clinical investigation**, v. 122, n. 4, p. 1519-28, 2012.

DINIZ, M. G. et al. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. **Oral oncology**, v. 72, p. 165-73, 2017.

DHILLON, A. S. et al. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279, 2007.

DOLANMAZ, D. et al. Management of central giant cell granuloma of the jaws with intralesional steroid injection and review of the literature. **Oral and maxillofacial surgery**, v. 20, n. 2, p. 203-9, 2016.

EDWARDS, P. C. Insight into the pathogenesis and nature of central giant cell lesions of the jaws. **Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal**, v. 20, n. 2, p. e196, 2015.

EL-LABBAN, N. G.; LEE, K. W. Myofibroblasts in central giant cell granuloma of the jaws: an ultrastructural study. **Histopathology**, v. 7, n. 6, p. 907-18, 1983.

EL-MOFTY, S. K.; OSDOBY, P. Growth behavior and lineage of isolated and cultured cells derived from giant cell granuloma of the mandible. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 14, n. 7, p. 539-52, 1985.

EL-NAGGAR, Adel K. (Ed.). WHO classification of head and neck tumours. **International Agency for Research on Cancer**, 2017.

FANG, Y. et al. Pharmacological inhibition of TRPV4 channel suppresses malignant biological behavior of hepatocellular carcinoma via modulation of ERK signaling pathway. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 101, p. 910-19, 2018.

FLANAGAN, A. M.; SPEIGHT, P. M. Giant cell lesions of the craniofacial bones. **Head and neck pathology**, v. 8, n. 4, p. 445-53, 2014.

FRETWURST, T. et al. Metal elements in tissue with dental peri-implantitis: a pilot study. **Clinical oral implants research**, v. 27, n. 9, p. 1178-86, 2016.



FURUYA, N. et al. Long-term follow-up of patients with chronic pancreatitis and K-ras gene mutation detected in pancreatic juice. **Gastroenterology**, v. 113, n. 2, p. 593-98, 1997.

GALINDO-MORENO, P. et al. Immunophenotype of dental implant-associated peripheral giant cell reparative granuloma in a representative case report. **Journal of Oral Implantology**, v. 42, n. 1, p. 55-60, 2016.

GAUDET, E. L. et al. Chondroblastoma of the temporal bone involving the temporomandibular joint, mandibular condyle, and middle cranial fossa: case report and review of the literature. **CRANIO**, v. 22, n. 2, p. 160-68, 2004.

GOMES, C. C. et al. TRPV4 and KRAS and FGFR1 gain-of-function mutations drive giant cell lesions of the jaw. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 4572 e 1-10, 2018.

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 surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 118, n. 5, p. 583-85, 2014.

GRIVENNIKOV, S. I. Inflammation and colorectal cancer: colitis-associated neoplasia. In: **Seminars in immunopathology**. p. 229-44, 2013.

GUERRA, C. et al. Tumor induction by an endogenous K-ras oncogene is highly dependent on cellular context. **Cancer cell**, v. 4, n. 2, p. 111-20, 2003.

GUGLIELMOTTI, M. B. et al. Migration of titanium dioxide microparticles and nanoparticles through the body and deposition in the gingiva: an experimental study in rats. **European journal of oral sciences**, v. 123, n. 4, p. 242-48, 2015.

HAIGIS, K. M. KRAS alleles: the devil is in the detail. **Trends in cancer**, v. 3, n. 10, p. 686-97, 2017.

HALPERIN-STERNFELD, M.; SABO, E.; AKRISH, S. The Pathogenesis of Implant-Related Reactive Lesions: A Clinical, Histologic and Polarized Light Microscopy Study. **Journal of periodontology**, v. 87, n. 5, p. 502-10, 2016.

HANSELAER, L. et al. [Giant cell peripheral granuloma surrounding a dental implant: case report]. **Revue Belge de Medecine Dentaire**, v. 65, n. 4, p.152-8, 2010.

HENRIQUES, A. et al. Clinical pathological analysis of nine cases of aneurysmal bone cyst of the jaws in a Brazilian population. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 269, n. 3, p. 971-76, 2012.

HERNANDEZ, G. et al. Clinical outcomes of peri-implant peripheral giant cell granuloma: a report of three cases. **Journal of periodontology**, v. 80, n. 7, p. 1184-91, 2009.

HIRSHBERG, A. et al. Peripheral giant cell granuloma associated with dental implants. **Journal of periodontology**, v. 74, n. 9, p. 1381-84, 2003.

HOSUR, M. B. et al. Clinicopathological profile of central giant cell granulomas: An institutional experience and study of immunohistochemistry expression of p63 in central giant cell granuloma. **Journal of oral and maxillofacial pathology**, v. 22, n. 2, p. 173, 2018.

HU, X. et al. Theaflavin-3, 3'-digallate represses osteoclastogenesis and prevents wear debris-induced osteolysis via suppression of ERK pathway. **Acta biomaterialia**, v. 48, p. 479-88, 2017.

JACOWAY, J. R.; HOWEL, F. V.; TERRY, B. C. Central giant cell granuloma-an alternative to surgical therapy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v. 66, p. 572, 1988.

JANÉ-SALAS, E. et al. Pyogenic granuloma/peripheral giant-cell granuloma associated with implants. **International journal of dentistry**, v. 2015, 2015.

KHANSARI, N.;SHAKIBA, Y.; MAHMOUDI, M. Chronic inflammation and oxidative stress as a major cause of age-related diseases and cancer. **Recent patents on inflammation & allergy drug discovery**, v. 3, n. 1, p. 73-80, 2009.

KATSIKERIS, N; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU, E; ANGELOPOULOS, P. Peripheral giant cell granuloma. Clinicopathologic study of 224 new cases and review of 956 reported cases. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 17, n. 2, p. 94-9, 1988.

KERMER, C., MILLESI, W., WATZKE, I. M. Local injection of corticosteroids for central giant cell granuloma. A case report. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 23, n. 6, p. 366-68, 1994.

KONDOH, T. et al. Chondroblastoma of the mandibular condyle: report of a case. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 60, n. 2, p. 198-203, 2002.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 65, n. 22, p. 3525-44, 2008.

LAC, V. et al. Oncogenic mutations in histologically normal endometrium: the new normal?. **The Journal of pathology**, v. 249, n. 2, p. 173-81, 2019.

LEE, M. S. et al. GM-CSF regulates fusion of mononuclear osteoclasts into bone-resorbing osteoclasts by activating the Ras/ERK pathway. **The Journal of Immunology**, v. 183, n. 5, p. 3390-99, 2009.

LEE, K. et al. Roles of mitogen-activated protein kinases in osteoclast biology. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 10, p. 3004-24, 2018.

LESTER, S. R et. al. Peripheral giant cell granulomas: a series of 279 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 118, n. 4, p.475-81, 2014.

LIM, L.; GIBBINS, J. R. Immunohistochemical and ultrastructural evidence of a modified microvasculature in the giant cell granuloma of the jaws. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 79, n. 2, p. 190-98, 1995.

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

LIU, B.; YU, S.; LI, T-J. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 32, n. 6, p. 367-75, 2003.

LOWENFELS, A. B. et al. Pancreatitis and the risk of pancreatic cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 328, n. 20, p. 1433-37, 1993.

LYDA, M. H. et al. Microsatellite instability and K-ras mutations in patients with ulcerative colitis. **Human pathology**, v. 31, n. 6, p. 665-71, 2000.

MANOR, E. et al. Cytogenetics of central giant cell granuloma of the mandible. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 9, p. 1541-44, 2013.

MARTINI, G. et al. Immunohistochemical expression of RANKL in oral giant cell lesions is predictive of aggressiveness. **Brazilian oral research**, v. 32, 2018.

MATOS, F. R. et al. Immunoexpression of MMP-9, VEGF, and vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 4, p. 338-44, 2011.

MATOS, F. R. et al. Immunoexpression of TNF- $\alpha$  and TGF- $\beta$  in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 2, p. 194-99, 2012.

MCKAY, M. M., MORRISON, D.K. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3113, 2007.

MIGHELL, A. J.; ROBINSON, P. A.; HUME, W. J. PCNA and Ki-67 immunoreactivity in multinucleated cells of giant cell fibroma and peripheral giant cell granuloma. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 25, n. 5, p. 193-99, 1996.

MILOSEVIC, Z. et al. Targeting RAS-MAPK-ERK and PI3K-AKT-mTOR signal transduction pathways to chemosensitize anaplastic thyroid carcinoma. **Translational Research**, v. 164, n. 5, p. 411-23, 2014.

MOHTASHAM, N. et al. A comparative study of osteopontin and MMP-2 protein expression in peripheral and central giant cell granuloma of the jaws. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v.85, p.150-56, 2017.

MONTSERRAT, M. et al. Oncogene activation in human benign tumors of the skin (keratoacanthomas): is HRAS involved in differentiation as well as proliferation?. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 86, n.16, p. 6372-76, 1989.

MORDINI, L. Esthetic Management of Peripheral Giant Cell Granuloma Affecting A Dental Implant in The Esthetic Zone. **Clinical advances in periodontics**, v. 9, n. 2, p. 77-82, 2019.

NEUMANN, T. E. et al. Multiple giant cell lesions in patients with Noonan syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome. **European Journal of Human Genetics**, v. 17, n. 4, p. 420, 2009.

NIIDA, S. et al. Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. **Journal of Experimental Medicine**, v. 190, n. 2, p. 293-98, 1999.

NOGUEIRA, R. L. M. et al. Surgical Treatment, Oral Rehabilitation, and Orthognathic Surgery After Failure of Pharmacologic Treatment of Central Giant Cell Lesion: A Case Report. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 12, p. 2567 e1-10, 2016.

OGBUREKE, E. I. et. al. A peripheral giant cell granuloma with extensive osseous metaplasia or a hybrid peripheral giant cell granuloma-peripheral ossifying fibroma: a case report. **Journal of Medical Case Reports**, v.9, n.14, p. 1-5, 2015.

OLEA-FLORES, M. et al. Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial–Mesenchymal Transition in Cancer. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 12, p. 2885, 2019.

OLIVEIRA, A. M. USP6 (Tre2) Fusion Oncogenes in Aneurysmal Bone Cyst. **Cancer Research**, v. 64 n.6, p. 1920-23, 2004.

OLMEDO, D. G. et al. Reactive lesions of peri-implant mucosa associated with titanium dental implants: a report of 2 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 39, n. 5, p. 503-7, 2010.

ÖZDEN, F. O. et al. Peripheral giant cell granuloma associated with dental implants: a rare case report. **International Journal of Oral & Maxillofacial Implants**, v. 24, n. 6, 2009.

PACIFICI, A. et al. Clinical management of a peri-implant giant cell granuloma. **Case reports in dentistry**, v. 2015, n. 976756, 2015.

PAYNE, M.; YUSUF, H. Benign chondroblastoma involving the mandibular condyle. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 25, n. 3, p. 250-55, 1987.

PEACOCK, Z. S. et al. Genetic analysis of giant cell lesions of the maxillofacial and axial/appendicular skeletons. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 2, p. 298-308, 2017.

PEACOCK, Z. S., JORDAN, R.C.K, SCHMIDT, BL. Giant cell lesions of the jaws: does the level of vascularity and angiogenesis correlate with behavior? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 70, n. 8, p. 1860-6, 2012.

PEÑARROCHA, M. et al. Cherubism: a clinical, radiographic, and histopathologic comparison of 7 cases. **Journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 64, n. 6, p. 924-30, 2006.

PÉREZ-GUILLERMO, M. et al. Cytologic aspect of brown tumor of hyperparathyroidism. Report of a case affecting the hard palate. **Diagnostic cytopathology**, v. 34, n. 4, p. 291-94, 2006.

PERINCHERI, S.; HUI, P. KRAS mutation testing in clinical practice. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 15, n. 3, p. 375-84, 2015.

PIRES-DUARTE, A. et al. Increased expression of NFATc1 in giant cell lesions of the jaws, cherubism and brown tumor of hyperparathyroidism. **Oncology letters**, v. 2, n. 3, p. 571-73, 2011.

RAJEEVAN, N. S.; SOUMITHRAN, C. S. Intralesional corticosteroid injection for central giant cell granuloma: a case report. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 27, n. 4, p. 303-4, 1998.

ROSENBERG A. E.; NIELSEN G. P; FLETCHER J.A. Aneurysmal bone cyst. In: Fletcher CDM, Unni KK, Mertens F(eds) WHO classification of tumors: pathology and genetics of tumors of soft tissue and bone, 3rd edn. IARC Press, Lyon, 2005, pp 338–39.

ROSSI, A. et al. Mutational landscape reflects the biological continuum of plasma cell dyscrasias. **Blood cancer journal**, v. 7, n. 2, p. e537, 2017.

SCARANO, A. et al. Peripheral Giant Cell Granuloma Associated With Dental Implants. **Journal of Craniofacial Surgery**, v. 29, n. 2, p. e196-e99, 2018.

SEZGIN, Y. et al. Peripheral giant cell granuloma associated with residual cement and periimplantitis: a case report. **Research & Reviews: Journal of Dental Sciences**, v. 4, n. 2, p. 64-7, 2016.

SOUZA, P. E. A. et al. Immunohistochemical expression of p53, MDM2, Ki-67 and PCNA in central giant cell granuloma and giant cell tumor. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 28, n. 2, p. 54-58, 1999.

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

SUN, S. Bone disease drug discovery: examining the interactions between osteoblast and osteoclast. **Expert opinion on therapeutic targets**, v. 12, n. 2, p. 239-51, 2008.

SUN, Y. et al. Signaling pathway of MAPK/ERK in cell proliferation, differentiation, migration, senescence and apoptosis. **Journal of Receptors and Signal Transduction**, v. 35, n. 6, p. 600-4, 2015.

TADA, M. et al. Analysis of K-ras gene mutation in hyperplastic duct cells of the pancreas without pancreatic disease. **Gastroenterology**, v. 110, n. 1, p. 227-31, 1996.

TIDYMAN, W. E.; RAUEN, K. A. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. **Current opinion in genetics & development**, v. 19, n. 3, p. 230-36, 2009.

TSUCHIDA, N.; MURUAN, A.; GRIECO, M. Kirsten Ras oncogene: Significance of its discovery in human cancer research. **Oncotarget**, v. 7, n. 29, p. 46717, 2016.

TOBÓN-ARROYAVE, S. I. et al. Immunoexpression of NF- $\kappa$ B and their inhibitory subunits I $\kappa$ B $\alpha$  and I $\kappa$ B $\beta$  in giant cell lesions of the jaws: implications for their clinical behavior. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 44, n. 9, p. 752-60, 2015.

TORABINIA, N.; RAZAVI, S. M.; SHOKROLAHI, Z. A comparative immunohistochemical evaluation of CD68 and TRAP protein expression in central and peripheral giant cell granulomas of the jaws. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 4, p. 334-37, 2011.

TROEN, B. R. Molecular mechanisms underlying osteoclast formation and activation. **Experimental gerontology**, v. 38, n. 6, p. 605-14, 2003.

TRUSCHNEGG, A. et al. Epulis: a study of 92 cases with special emphasis on histopathological diagnosis and associated clinical data. **Clinical oral investigations**, v. 20, n. 7, p. 1757-64, 2016.

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

VALENTINE, J. C., NELSON, B. L. Central giant cell lesion. **Head and neck pathology**, v. 5, n. 4, p. 385-88, 2011.

VANDAMME, D. et al. Regulation of the MAPK pathway by raf kinase inhibitory protein. **Critical Reviews™ in Oncogenesis**, v. 19, n. 6, 2014.

van LAETHEM, J. Ki-Ras Oncogene Mutations in Chronic Pancreatitis: Which Discriminating Ability for Malignant Potential?. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 880, n. 1, p. 210-18, 1999.

VARSHA, V. K. et al. Expression of CD34 and CD68 in peripheral giant cell granuloma and central giant cell granuloma: An immunohistochemical analysis. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 18, n. 3, p. 341-48, 2014.

von WOWERN, N. et al. Cherubism: a 36-year long-term follow-up of 2 generations in different families and review of the literature. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 90, n. 6, p. 765-72, 2000.

WANG, H. et al. EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with sinonasal inverted papilloma and oncocytic papilloma. **Histopathology**, 2019.

WILSON, J. J.; SCHWARTZ, H. C.; TEHRANY, G. M. Brown tumor of the posterior maxilla as initial manifestation of primary hyperparathyroidism: case report. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 71, n. 5, p. 886-90, 2013.

WORTZEL, I.; SEGER, R. The ERK cascade: distinct functions within various subcellular organelles. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 195-209, 2011.

YAKUBOVSKAYA, M. S. et al. High frequency of K-ras mutations in normal appearing lung tissues and sputum of patients with lung cancer. **International journal of cancer**, v. 63, n. 6, p. 810-14, 1995.

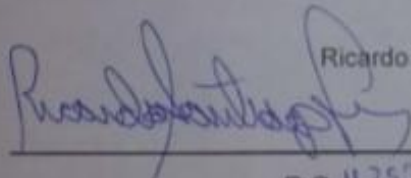


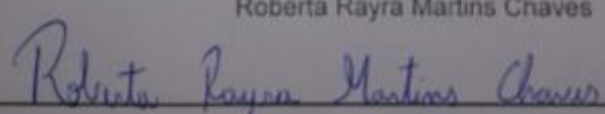
ZHANG, X. et al. MAPK/ERK signaling pathway-induced hyper-O-GlcNAcylation enhances cancer malignancy. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 410, n. 1-2, p. 101-10, 2015.

**APÊNDICE A – Termo de compromisso de utilização de dados****Termo de Compromisso de Utilização de Dados-TCUD**

Nós, Ricardo Santiago Gomez e Roberta Rayra Martins Chaves, pesquisadores envolvidos no projeto de título: ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES DE CÉLULAS GIGANTES ASSOCIADAS A IMPLANTES DENTÁRIOS, nos comprometemos a manter a confidencialidade sobre os dados coletados nos arquivos do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FAO-UFMG), bem como a privacidade de seus conteúdos, como preconizam os Documentos Internacionais e a Resolução CNS nº 196/96 do Ministério da Saúde. Informamos que os dados a serem coletados dizem respeito a lesão periférica de células gigantes associadas a implantes dentários ocorridos entre as datas de: junho de 1953 a junho de 2019.

Belo Horizonte, 18 de março de 2019.

  
Ricardo Santiago Gomez  
\_\_\_\_\_  
R.G. 113579176

Roberta Rayra Martins Chaves  
  
\_\_\_\_\_  
R.G. MG - 14.114.662

OBS: TODOS OS PESQUISADORES QUE TERÃO ACESSO AOS DOCUMENTOS DO ARQUIVO DEVERÃO TER O SEU NOME e R.G. INFORMADO E TAMBÉM DEVERÃO ASSINAR ESTE TERMO. SERÁ VEDADO O ACESSO AOS DOCUMENTOS A PESSOAS CUJO NOME E ASSINATURA NÃO CONSTAREM NESTE DOCUMENTO.

## APÊNDICE B – Atividades desenvolvidas durante o mestrado

### Disciplinas cursadas

Período	Turma	Nome Atividade	Tipo Mat	Freq	Nota	Conc	Sit Final	Créd	Integr ?
2018/1	DIP CPC822 A	ESTUDOS AVANCADOS EM ESTOMATOLOGIA II		S	85	B	A	04	Sim
2018/1	DIP FAO802 ES1	ESTAGIO DOCENTE I		S	100	A	A	03	Sim
2018/1	DIP FAO804 A	SEMINARIOS DE PESQ. EM ODONTOLOGIA I		S	95	A	A	03	Sim
2018/2	DIP CPC821 A	ESTUDOS AVANCADOS EM ESTOMATOLOGIA I		S	90	A	A	04	Sim
2018/2	DIP CPC823 A	ESTUDOS AVANCADOS EM ESTOMATOLOGIA III		S	90	A	A	04	Sim
2018/2	DIP CPC838 ESM	EST. CLÍ. E LAB. EM EST. E PAT. BUCAL II		S	95	A	A	04	Sim
2018/2	DIP FAO803 ES2	ESTAGIO DOCENTE II		S	100	A	A	03	Sim
2018/2	DIP FAO805 A	SEMINARIOS DE PESQ. EM ODONTOLOGIA II		S	90	A	A	03	Sim
2018/2	DIP FAO808 A	BIOESTAT. APL. À PESQ. ODONTOLÓGICA I		S	90	A	A	04	Sim
2018/2	DIP OPO812 A	EPIDEMIOLOGIA I		S	90	A	A	02	Sim
2018/2	DIP OSP815 A	METODOLOGIA DA PESQ. EM ODONTOLOGIA I		S	95	A	A	02	Sim
2018/2	DIP OTI804 A	NORMALIZACAO BIBLIOGRAFICA		S	87	B	A	02	Sim
2019/1	DIP FAE914 U	DIDATICA DO ENSINO SUPERIOR		S	93	A	A	04	Sim
2019/1	DIP MED821 H	TOPICOS AVANCADOS EM MEDICINA MOLECULAR	E	S	98	A	A	02	Não
2019/1	DIP CPC838 ESM	EST. CLÍ. E LAB. EM EST. E PAT. BUCAL II		S	100	A	A	04	Sim
2019/1	ETF GER000	ELABORACAO DE TRABALHO FINAL						0	Sim
2019/1	<b>TFP ODO004</b>	<b>DEFESA DE DISSERTAÇÃO</b>					<b>A</b>	<b>0</b>	<b>Sim</b>

Legenda: Tipo Mat: Tipo de Matrícula: Normal ou Eletiva    Freq: Frequência

Conc: Conceito    Sit Final: Situação Final na Atividade

A: Aprovado    S: Suficiente    4: Dispensa

Créd: Número de créditos atribuídos

Integr? :Indica se a atividade será computada ou não na integralização dos créditos exigidos.

<b>(Créditos em Atividades Acadêmicas)</b>	
Exigidos	35
Cursados/Dispensados	48
Aproveitamento de Créditos	00
Utilizados para Integralização Em Curso	35
Situação Curricular	00
	POS-GRADUADO

### **Formação complementar**

- Odontologia baseada em Evidências e Pesquisa Transnacional. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Pesquisa em Iniquidades em Saúde. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Distúrbios alimentares, distúrbios do movimento e qualidade do sono. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Cuidados com a voz e técnicas de apresentação em público. (Carga horária: 4h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Sinalização molecular envolvida na cicatrização e no CCE. (Carga horária: 3h). Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil.
- Curso de Aperfeiçoamento em Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial. (Carga horária: 210h). Instituto de ensino superior, IES, Brasil.

### **Prêmios e títulos**

SCHIMMELPENNING SYNDROME: A CASE REPORT. 1º colocado na categoria Apresentação Oral de Casos Clínicos. 44º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral – SOBEP, 2018.

### APÊNDICE C - Produção científica durante o mestrado

- FONSECA, V. J.; MARTINS-CHAVES, R. R.; BAIRES CAMPOS, F. E.; LEHMAN, L. F.; MORAES, G. M.; CASTRO, W. H. Applications of digital subtraction angiography in the management of penetrating injuries of the maxillofacial region: A case report. **Imaging Science in Dentistry**, v. 48, p. 295, 2018.
- GONCALVES, C. L.; CAMPOS, F. E. B.; LEHMAN, L. F. C.; MARTINS-CHAVES, R. R.; LIMA, F. L.; CASTRO, W. H. Tratamento conservador de ameloblastoma em mandíbula: relato de caso. **Journal of the Brazilian College of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 5, p. 45, 2019.
- MARTINS-CHAVES, R. R.; PINTO-JR, A. A. C.; GOMES, C. C.; CASTRO, W. H.; GOMEZ, R. S. Multiple adenomatoid odontogenic tumors in a patient with schimmelpenning syndrome. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**, v. 00, p. e1-e6, 2019.

## APÊNDICE D: Artigo científico que apresenta os resultados deste estudo

MARTINS-CHAVES, R. R. et al. KRAS mutations in implant-associated peripheral giant cell granuloma. *Oral diseases*, 2019.

<https://doi.org/10.1111/odi.13241>











Received: 17 October 2019 | Revised: 6 November 2019 | Accepted: 14 November 2019

DOI: 10.1111/odi.13241

ORIGINAL ARTICLE

ORAL DISEASES  WILEY

# KRAS mutations in implant-associated peripheral giant cell granuloma

Roberta Rayra Martins-Chaves<sup>1</sup>  | Letícia Martins Guimarães<sup>1</sup>  |  
Thaís dos Santos Fontes Pereira<sup>1</sup>  | Núbia Braga Pereira<sup>2</sup>  | Bruno Ramos Chrcanovic<sup>3</sup>  |  
Felipe Paiva Fonseca<sup>1</sup>  | Irene Lafuente-Ibáñez de Mendoza<sup>4</sup>  |  
José Manuel Aguirre-Urizar<sup>4</sup>  | Carolina Cavaliéri Gomes<sup>2</sup>  | Ricardo Santiago Gomez<sup>1</sup> 

<sup>1</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>3</sup>Department of Prosthodontics, Faculty of Odontology, Malmö University, Malmö, Sweden

<sup>4</sup>Unit of Oral and Maxillofacial Pathology of the Dental Clinic Service, Department of Stomatology II, University of the Basque Country (UPV-EHU), Bizkaia, Spain

### Correspondence

Ricardo Santiago Gomez, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, School of Dentistry. Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, CEP 31270-901, Brazil.  
Email: rsgomez@ufmg.br

### Funding information

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

### Abstract

**Objectives:** To investigate the molecular pathogenesis of implant-associated peripheral giant cell granuloma (IA-PGCG).

**Methods:** A convenience sample of 15 IA-PGCG cases was selected. Hotspot mutations of *KRAS*, *FGFR1*, and *TRPV4* genes, previously reported in conventional giant cell lesions of the jaws, were investigated by Sanger sequencing. As these mutations could activate MAPK/ERK pathway, the expression of phospho-ERK1/2 was also evaluated by immunohistochemistry.

**Results:** *KRAS* mutations were detected in 8/15 (53.4%) samples. Similar to conventional peripheral giant cell granuloma, the *KRAS* mutations most frequently occurred in codon 146 (p.A146V,  $n = 3$ ), followed by codon 12 (p.G12A and p.G12D,  $n = 1$  each) and codon 14 (p.V14L,  $n = 1$ ). Variants of unknown significance (VUS) were also detected in two cases, affecting codons 37 (p.E37K) and 127 (p.T127I). All samples showed wild-type (WT) sequences for *FGFR1* and *TRPV4* genes. Consistent with MAPK/ERK pathway activation, all mononuclear cells of the lesion showed strong staining for phospho-ERK1/2 protein in the immunohistochemical analysis.

**Conclusions:** *KRAS* mutations and activation of the MAPK-ERK signaling pathway occur in IA-PGCG. This is the first study to demonstrate cancer-associated gene mutations in a non-neoplastic reactive condition associated with dental implants.

### KEYWORDS

dental implants, genetics, giant cell granuloma, MAPK, peripheral giant cell granuloma, RAS

**ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES DE CÉLULAS GIGANTES ASSOCIADAS A IMPLANTES DENTÁRIOS

**Pesquisador:** Ricardo Santiago Gomez

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 08043219.2.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.203.629

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não