

**LETÍCIA MARTINS GUIMARÃES**

**ALTERAÇÕES MOLECULARES NO TUMOR MARROM DO  
HIPERPARATIREOIDISMO DOS MAXILARES**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2020**

Letícia Martins Guimarães

**ALTERAÇÕES MOLECULARES DO TUMOR MARROM DO  
HIPERPARATIREOIDISMO DOS MAXILARES**

Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal

Orientador: Prof.(a): Dra. Carolina Cavaliéri Gomes

Belo Horizonte  
2020

## Ficha Catalográfica

G963a Guimarães, Leticia Martins.  
2020 Alterações moleculares no tumor marrom do  
T hiperparatireoidismo dos maxilares / Leticia Martins  
Guimarães. -- 2020.

73 f. : il.

Orientadora: Carolina Cavalieri Gomes.

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

1. Granuloma de células gigantes. 2. Células gigantes. 3. Hiperparatireoidismo. 4. Doenças ósseas. 5. MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular. I. Gomes, Carolina Cavalieri. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047

Elaborada por: Miriam Cândida de Jesus - CRB: 6-2727.

Biblioteca Faculdade de Odontologia - FAO UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

ALTERAÇÕES MOLECULARES NO TUMOR MARROM DO HIPERPARATIREOIDISMO DOS  
MAXILARES

**LETÍCIA MARTINS GUIMARÃES**

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 Patologia Bucal.

Aprovada em 23 de julho de 2020, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes – Orientadora  
FO-UFMG

Prof(a). Marina Gonçalves Diniz  
UFMG

Prof(a). Hélder António Rebelo Pontes  
Universidade Federal do Pará

*Isabela*

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 31 / 08 /2020.

Profa. Isabela Almeida Pordeus  
Coordenadora  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho àqueles que foram o meu alicerce na construção deste sonho: pais Marcos e Rosário, padrinhos Paulo e Cássia, irmã Leísa e namorado Vinícius.

## AGRADECIMENTO

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora pelo dom da vida, por tantas bênçãos e por me proporcionar tudo o que eu precisava para chegar até aqui.

Aos meus pais Marcos e Rosário, aos meus segundos pais Paulo e Cássia, à minha irmã Leísa e ao meu namorado Vinícius meu mais profundo sentimento de gratidão. Cada palavra de carinho, incentivo e apoio foram muito importantes para minha chegada até aqui. Às minhas avós, Eliza (*in memoriam*) e Creusa, meu mais carinhoso agradecimento pelas orações. Aos demais familiares, amigos de infância e amigos de colégio, agradeço pela torcida e apoio.

Em especial agradeço a minha orientadora Carolina Cavaliere Gomes por ter compartilhado tanto conhecimento, concedido apoio imprescindível e por ter acreditado em mim, abrindo portas e oferecendo oportunidades.

Ao professor Ricardo Santiago Gomez os meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos ao longo destes dois anos. Agradeço também a todos os outros professores que em algum momento fizeram parte da minha trajetória no mestrado, seja na clínica de Estomatologia, na sala de aula, no laboratório do ICB ou na rotina do laboratório de patologia.

Obrigada aos professores colaboradores que disponibilizaram amostras das suas instituições para a minha pesquisa: Hélder Antônio Rebelo Pontes (Universidade Federal do Pará, Brasil), Fabricio Passador-Santos (São Leopoldo Mandic, Brasil), Ronnel Bologna-Molina (Universidad de la República, Uruguai), Bruno Augusto Benevenuto de Andrade (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil), Mário José Romañach (Universidade Federal do Rio de Janeiro, Brasil), Júlio César Tanos de Lacerda (Hospital Odilon Behrens, Brasil), Román Carlos (Centro Clínico Cabeza y Cuello, Guatemala) e Adalberto Mosqueda-Taylor (Universidad Autónoma Metropolitana, México). Agradeço também aos pacientes que gentilmente contribuíram para a realização do trabalho.

Por tornarem a rotina mais leve, compartilhar dificuldades e conquistas, agradeço os colegas do mestrado. Aos colegas do laboratório de Biologia Molecular, que contribuíram com o meu trabalho e que compartilharam comigo o dia-a-dia no laboratório, meus sinceros agradecimentos. Em especial a Thaís, que caminhou junto

a mim do início ao final dos meus experimentos e que sempre se esforçou para sanar as minhas dúvidas e dividir comigo o seu vasto conhecimento.

Gostaria de agradecer aos funcionários do laboratório de Anatomia Patológica da FO-UFMG, Mara, Dani e Domênico por todo apoio e auxílio ao longo das rotinas e dos procedimentos relacionados à minha pesquisa. Aos demais funcionários do colegiado de pós-graduação, da biblioteca e da limpeza, meu muito obrigada.

Finalmente, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa pela qual fui assistida ao longo do curso e também à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

"Que faria a ciência sem o amor? Envaideceria. Que faria o amor sem a ciência?  
Erraria"

São Bernardo de Claraval



## RESUMO

Tumores marrons são lesões resultantes de alterações no metabolismo ósseo em decorrência do hiperparatireoidismo, uma das desordens endócrinas mais comuns no mundo. Os tumores marrons podem ocorrer no hiperparatireoidismo primário, secundário e terciário. Essas lesões ocorrem principalmente nos ossos longos, mas podem afetar os maxilares e apesar de apresentarem características clínicas e microscópicas bem estabelecidas, a patogênese molecular dos tumores marrons ainda não foi elucidada. Recentemente, mutações patogênicas nos genes *TRPV4*, *FGFR1* e *KRAS* foram descritas em lesões de células gigantes dos maxilares e em fibroma não-ossificante dos ossos longos (*FGFR1* e *KRAS*), lesões que são mímicas histológicas dos tumores marrons do hiperparatireoidismo. O objetivo do presente estudo foi investigar em tumores marrons dos maxilares a presença de mutações nesses genes. Para investigar tais mutações, foi realizado o sequenciamento de Sanger em uma amostra de conveniência composta por 13 tumores marrons dos maxilares associados ao hiperparatireoidismo primário e secundário. Sabendo-se que mutações nos genes analisados levam a ativação da via de sinalização celular MAPK/ERK, a detecção imuno-histoquímica da forma fosforilada da proteína ERK1/2 (pERK1/2) também foi avaliada nessas lesões. Mutações patogênicas no gene *KRAS* foram detectadas em sete casos (p.G12V n=4, p.G12D n=1, p.G13D n=1, p.A146T n=1). Variantes de significado incerto, p.A134T e p.E37K também foram detectadas. Todas as amostras exibiram sequências selvagens para os genes *FGFR1* e *TRPV4*. A ativação da via MAPK/ERK foi demonstrada pela positividade imuno-histoquímica das células mononucleares dos tumores marrons para pERK1/2. Portanto, mutações no gene *KRAS* e ativação da via de sinalização celular MAPK/ERK foram detectadas em tumores marrons do hiperparatireoidismo dos maxilares. Tais resultados expandem o espectro de lesões de células gigantes cuja patogênese molecular envolve a sinalização RAS.

**Palavras-chave:** Granuloma de células gigantes. Células gigantes multinucleadas. Hiperparatireoidismo. Doenças ósseas. MAP Quinases Reguladas por Sinal Extracelular. Mutação.

## ABSTRACT

### Molecular alterations in brown tumor of hyperparathyroidism of the jaws

Brown tumors are lesions that result from abnormal bone metabolism in hyperparathyroidism, which is one of the most common endocrine disorders worldwide. Brown tumors can occur in primary, secondary and even in tertiary hyperparathyroidism. It occurs mainly in long bones, but occasionally affects the jaws and, despite its well-known clinical and microscopic features, the molecular pathogenesis of brown tumors remains unclear. Recently, pathogenic mutations in *TRPV4*, *FGFR1* and *KRAS* were described in giant-cell lesions of the jaws and non-ossifying fibromas of the bones (*FGFR1* and *KRAS*), which are histologic mimics of brown tumors. The aim of this study was to investigate in brown tumors of the jaws the presence of mutations in these genes. To assess such mutations, a convenience sample of 13 brown tumors of the jaws associated with primary or secondary hyperparathyroidism was targeted by Sanger sequencing. As mutations in these genes are known to activate the MAPK/ERK signaling pathway, the immunostaining of the phosphorylated form of ERK1/2 (pERK1/2) was also assessed in these lesions. *KRAS* pathogenic mutations were detected in seven cases (p.G12V n=4, p.G12D n=1, p.G13D n=1, p.A146T n=1). *KRAS* variants of unknown significance, p.A134T and p.E37K, were also detected. All samples showed wild-type sequences for *FGFR1* and *TRPV4* genes. The activation of the MAPK/ERK signaling pathway was demonstrated by pERK1/2 immunohistochemical positivity of the brown tumors' mononuclear cells. In conclusion, mutations in *KRAS* and activation of the MAPK/ERK signaling pathway were detected in brown tumors of hyperparathyroidism of the jaws, expanding the spectrum of giant cell lesions whose molecular pathogenesis involve RAS signaling.

**Keywords:** Granuloma. Giant cells. Hyperparathyroidism. Bone diseases. Extracellular Signal-Regulated MAP Kinases. Mutation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mecanismos de ação do paratormônio em normalidade.....	20
Figura 2 - Hiperparatireoidismo primário, secundário e terciário .....	24
Figura 3 - Aspecto clínico-radiográfico do tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares .....	26
Figura 4 - Características histopatológicas do tumor marrom do hiperparatireoidismo .....	27
Figura 5 - Esquema da ativação da via de sinalização MAPK/ERK .....	30
Figura 6 - Fluxograma metodológico .....	36
Figura 7 - Características histopatológicas observadas nas amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo .....	42
Figura 8 - Áreas sugestivas de osteíte fibrosa cística .....	43
Figura 9- Captura de tela dos cromatogramas das mutações patogênicas detectadas nos códons 12,13 e 146 do gene <i>KRAS</i> por sequenciamento de Sanger em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares .....	46
Figura 10 - Captura de tela dos cromatogramas das variantes de significado incerto detectadas no gene <i>KRAS</i> por sequenciamento de Sanger em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares.....	47
Figura 11 - Expressão imuno-histoquímica para a proteína pERK1/2 em tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares .....	48
Figura 12 - Hipótese para formação de tumores marrons na presença de mutação no gene <i>KRAS</i> .....	53

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Iniciadores utilizados para a detecção das mutações previamente descritas nas lesões de células gigantes esporádicas .....	39
Tabela 2 - Características clínicas dos 13 indivíduos afetados por tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares incluídos no estudo .....	43
Tabela 3 - Dados dos exames sorológicos dos 13 indivíduos afetados por tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares incluídos no estudo .....	44
Tabela 4 - Dados moleculares dos 13 casos de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares incluídos no estudo.....	45

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AKT	<i>Serine/threonine-protein kinase AKT</i>
ARAF	<i>A-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
$\alpha$	Alfa
BRAF	<i>B-Raf proto-pncogene, serine/threonine kinase</i>
C.C.G	Carolina Cavalieri Gomes
c-Fms	<i>Macrophage colony-stimulating factor 1 receptor</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
dl	Decilitro
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DRC	Doença renal crônica
<i>Drivers</i>	Conductoras
ERK1/2	<i>Extracellular signal regulated kinase 1/2</i>
ERK3/4	<i>Extracellular signal regulated kinase 3/4</i>
ERK5	<i>Extracellular signal regulated kinase 5</i>
ERK7/8	<i>Extracellular signal regulated kinase 7/8</i>
FAPEMIG	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais
FFPE	Fixado em formol e incluído em parafina
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i>
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
gDNA	DNA genômico
GDP	Difosfato de guanosina
GNAS	<i>GNAS complex locus</i>
°C	Grau Celsius
GTP	Trifosfato de guanosina
H&E	Hematoxilina e eosina
<i>H3F3A</i>	<i>H3.3 histone A</i>
HPT	Hiperparatireoidismo
HRAS	<i>HRas proto-oncogene, GTPase</i>
IHQ	Imuno-histoquímica

JNK1/2/3	<i>c-jun N terminal kinase 1/2/3</i>
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
L.M.G	Letícia Martins Guimarães
L	Litro
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MAPKKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase</i>
MASI	<i>Mutant allele-specific imbalance</i>
M-CSF	<i>Macrophagy colony-stimulating factor</i>
MEK1/2	<i>Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1/2</i>
µl	Microlitro
µm	Micrômetro
µM	Micromolar
mA	Miliampere
mg	Miligrama
ml	Mililitro
mTOR	<i>Serine/threonine-protein kinase mTOR</i>
NFATc1	<i>Nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1</i>
ng	Nanograma
NRAS	<i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>
OPG	<i>Osteoprotegerin</i>
pb	Pares de base
PCNA	<i>Proliferating cell nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PI3K	<i>Phosphatidylinositol 3-kinase</i>
pg	Picograma
pH	Potencial de hidrogênio
PolyPhen-2	<i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
PTH	Paratormônio
R.S.G	Ricardo Santiago Gomez
RAF	<i>RAF proto-oncogene serine/threonine-protein kinase</i>
RAF1	<i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
RANK	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B</i>

RANKL	<i>Receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand</i>
RAS	<i>GTPase Ras</i>
RHO	<i>Ras homologous protein</i>
SIFT	<i>Sorting Tolerant From Intolerant</i>
TRPV4	<i>Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4</i>
U	Unidade de massa atômica
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
USP6	<i>Ubiquitin specific peptidase 6</i>
VUS	<i>Variants of unknown significance</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	16
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	19
2.1 Glândulas paratireoides, paratormônio e seus efeitos nas células ósseas .....	19
2.2 Hiperparatireoidismo .....	20
2.3 Osteíte fibrosa cística .....	24
2.4 Tumor marrom do hiperparatireoidismo .....	25
2.5 Via de sinalização celular MAPK e genes <i>KRAS</i> , <i>FGFR1</i> e <i>TRPV4</i> .....	28
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	35
3.1 Objetivo geral .....	35
3.2 Objetivos específicos .....	35
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	36
4.1 Aspectos éticos .....	36
4.2 Seleção de amostras .....	37
4.3 Microdissecção manual .....	37
4.4 Extração do DNA .....	38
4.5 Reação em cadeia de polimerase (PCR) .....	38
4.6 Sequenciamento de Sanger e análise <i>in-silico</i> .....	40
4.7 Imuno-histoquímica (IHC) .....	40
<b>5 RESULTADOS</b> .....	42
5.1 Dados clínico-patológicos .....	42
5.2 Sequenciamento de Sanger e análise <i>in-silico</i> .....	44
5.3 Imuno-histoquímica (IHC) .....	47
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	49
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	56



**REFERÊNCIAS.....57**

**APÊNDICE A – Artigo científico aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*.....69**

**ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação pelo COEP.....70**

## 1 INTRODUÇÃO

Uma variedade de lesões orais que podem afetar os maxilares apresenta células gigantes multinucleadas ao exame histopatológico. Células gigantes semelhantes a osteoclastos estão presentes em uma variedade delas, tais como lesões centrais e periféricas de células gigantes, incluindo as associadas a implante dentário, cisto ósseo aneurismático, condroblastoma, fibroma não-ossificante e tumor marrom do hiperparatireoidismo. (CHRCANOVIC *et al.*, 2011; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; GOMES *et al.*, 2020). Além disso, lesões apresentando células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos podem ser componentes de diferentes síndromes, como querubismo (OMIM #118400), síndrome de Noonan (OMIM #163950), neurofibromatose tipo I (OMIM #166200), displasia osteoglofônica (OMIM #166250), síndrome cardiofaciocutânea (OMIM #115150), síndrome oculoectodérmica (OMIM #600268), síndrome de Jaffe–Campanacci e síndrome de Schimmelpenning-Feuerstein-Mims (OMIM #163200) (ERNST; QUINN; ALAWI, 2007; FRIEDRICH *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2020; NEUMANN *et al.*, 2009; PEACOCK *et al.*, 2015; STEWART *et al.*, 2014; UEKI *et al.*, 2001; WHITE *et al.*, 2005).

Dentre as lesões que apresentam células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos citadas acima, as lesões centrais e periféricas de células gigantes, o fibroma não-ossificante, o querubismo e o tumor marrom do hiperparatireoidismo compartilham fortes similaridades histopatológicas (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; WICK; MCDERMOTT; SWANSON, 2014). De maneira geral essas lesões são caracterizadas pela presença de inúmeras células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos em meio a células mononucleares ovoides e/ou fusiformes, com presença de vasos sanguíneos, hemorragia e depósitos de hemossiderina (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; RAUBENHEIMER; JORDAN, 2017). Por serem mímicas histológicas, essas lesões apresentam desafios quanto ao estabelecimento do diagnóstico final. Para que ele seja alcançado é necessário associar as informações histopatológicas, clínicas, radiológicas, além de outros exames complementares, como exames sorológicos (RAUBENHEIMER; JORDAN, 2017).

As lesões centrais de células gigantes são lesões únicas, benignas e intra-ósseas que ocorrem principalmente na mandíbula de pacientes jovens, geralmente antes dos 20 anos de idade, podendo ser agressivas ou não agressivas (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; RAUBENHEIMER; JORDAN, 2017). As lesões periféricas de células gigantes são nódulos vermelho-arroxeados normalmente relacionados a fatores irritativos locais em gengiva ou mucosa alveolar de pacientes entre a quarta e quinta décadas de vida, podendo estar associadas a implantes dentários (CHRCANOVIC; GOMEZ; GOMES, 2018; HIRSHBERG *et al.*, 2003; LESTER *et al.*, 2014). Os fibromas não-ossificantes são lesões que ocorrem principalmente na metáfise dos ossos longos em crianças, podendo raramente ocorrer nos ossos maxilares (CHRCANOVIC *et al.*, 2011; WICK; MCDERMOTT; SWANSON, 2014). O tumor marrom do hiperparatireoidismo é uma lesão intra-óssea benigna, podendo raramente ser periférica, e associada a alterações no metabolismo ósseo em decorrência do hiperparatireoidismo (EL-MOFTY, 2009; GUIMARÃES *et al.*, 2006). A patogênese molecular do tumor marrom do hiperparatireoidismo ainda não foi elucidada.

Além das lesões supracitadas que podem acometer os maxilares, o tumor de células gigantes dos ossos longos também apresenta características microscópicas semelhantes a elas, mas comportamento biológico distinto. Consistem em lesões neoplásicas agressivas que ocorrem principalmente na epífise de ossos longos e que podem sofrer metástase (COWAN; SINGH, 2013). Raramente o tumor de células gigantes pode ocorrer nos ossos gnáticos e ser erroneamente diagnosticados e tratado como lesão central de células gigantes agressiva. Em 2013, foram descritas pela primeira vez mutações *drivers* p.G34W/L recorrentes no gene *H3F3A* em 92% (49/53) dos tumores de células gigantes dos ossos longos avaliados (BEHJATI *et al.*, 2013). O gene *H3F3A* codifica uma histona cuja função pode estar relacionada ao recrutamento de osteoclastos (BEHJATI *et al.*, 2013). Devido às similaridades histopatológicas entre os tumores de células gigantes dos ossos longos e as lesões centrais de células gigantes, em 2014 foi investigado se as lesões centrais de células gigantes esporádicas dos maxilares apresentavam as mesmas mutações *drivers* no gene *H3F3A* descrita no tumor de células gigantes dos ossos longos no estudo anterior. Os resultados revelaram ausência de tais mutações em todas as nove amostras de lesões centrais de células gigantes esporádicas avaliadas, demonstrando diferenças moleculares que podem auxiliar no diagnóstico diferencial entre essas lesões (GOMES *et al.*, 2014).

Considerando a ausência da mutação *H3F3A* em lesões centrais de células gigantes, recentemente, foi realizado um estudo molecular com a análise do exoma tumoral das lesões de células gigantes dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018). No referido estudo, foram analisadas lesões centrais e periféricas de células gigantes e detectada a presença de mutações somáticas recorrentes de forma mutuamente exclusiva em 3 genes: *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*. Estes genes convergem para a ativação da via de sinalização celular MAPK/ERK (*mitogen-activated protein kinase/extracelular regulated kinases*). Logo após, mutações nos genes *KRAS* e *FGFR1* foram também descritas em fibroma não-ossificante dos ossos longos (BAUMHOER *et al.*, 2019).

Considerando então as similaridades histopatológicas entre as lesões centrais e periféricas de células gigantes, o fibroma não-ossificante dos ossos longos e o tumor marrom do hiperparatireoidismo, o presente estudo teve o objetivo de investigar a presença das mutações nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*, recentemente descritas nas lesões esporádicas de células gigantes dos maxilares e no fibroma não-ossificante dos ossos longos, em casos de tumor marrom do hiperparatireoidismo. Sabendo-se que mutações nesses genes levam à ativação da via MAPK/ERK, objetivou-se também avaliar a imunexpressão da proteína ERK1/2 fosforilada (pERK1/2) nas amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo. A relevância deste tema está principalmente relacionada ao melhor entendimento da patogênese molecular da lesão. Secundariamente, os resultados poderão auxiliar na distinção entre as entidades e no desenvolvimento de ferramentas moleculares para um diagnóstico final mais preciso e para um tratamento mais adequado, principalmente para os casos mais desafiadores e agressivos. Tendo em vista que além das lesões ricas em células gigantes, os tumores marrons podem mimetizar clinico-radiologicamente lesões ósseas malignas, ferramentas que auxiliem no diagnóstico tornam-se ainda mais relevantes.

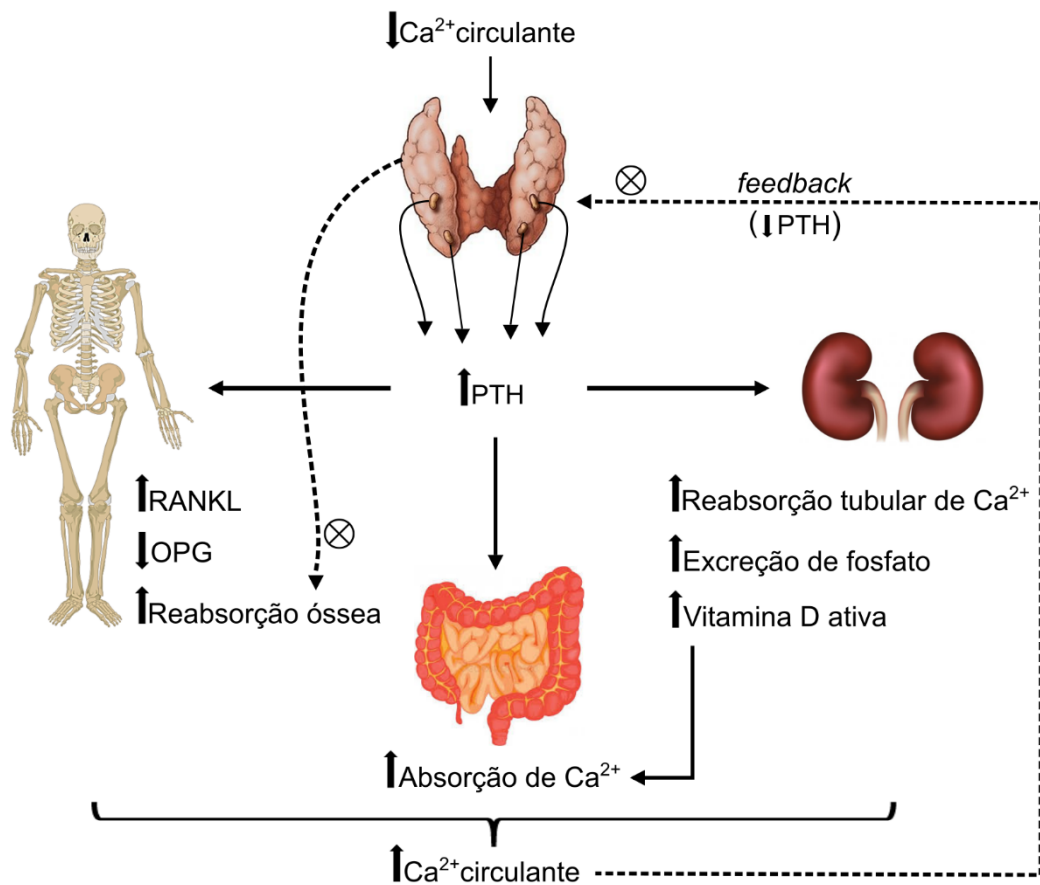
## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Glândulas paratireoides, paratormônio e seus efeitos nas células ósseas

As paratireoides são quatro glândulas localizadas mais comumente na face posterior da glândula tireoide, nas proximidades dos polos superior e inferior da mesma, podendo também ser ectópicas (ASLAN *et al.*, 2018; JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2017; MOHAN *et al.*, 2013). Conforme demonstra a Figura 1, o paratormônio é o hormônio produzido pelas paratireoides em resposta a alterações nos níveis de cálcio ionizado circulante. Ele age no tecido ósseo, nos rins e, indiretamente, no intestino com a função de garantir a homeostase do cálcio no organismo e também de regular o metabolismo do fósforo (SILVA; BILEZIKIAN, 2015). A ação indireta do paratormônio no intestino ocorre por meio da ação da vitamina D ativa. Nos rins a vitamina D é convertida da sua forma inativa 25-hidroxivitamina D (25(OH)D) para a sua forma ativa 1,25-di-hidroxivitamina D (1,25(OH)<sub>2</sub>D) após hidroxilação por ação da enzima 1 $\alpha$ -hidroxilase. A vitamina D na sua forma ativa estimula a absorção de cálcio pelo intestino (BORBA; MAÑAS; MOREIRA, 2016). Além do paratormônio e da vitamina D ativa, a calcitonina produzida pela tireoide também é um fator importante na manutenção da normocalcemia (FRASER, 2009).

No tecido ósseo, o paratormônio age por meio do sistema OPG/RANKL/RANK. Ele se liga a seus receptores nos osteoblastos e osteócitos, estimulando a produção de RANKL (*receptor activator of nuclear factor kappa-B Ligand*) e reduzindo a produção da OPG (*osteoprotegerin*) (HUANG *et al.*, 2004; KHEDR, 2018; SILVA; BILEZIKIAN, 2015). O RANKL se liga ao receptor RANK (*receptor activator of nuclear factor kappa-B*) nos precursores de osteoclastos estimulando a diferenciação dos mesmos, e nos próprios osteoclastos aumentando a atividade de reabsorção óssea, o que conseqüentemente aumenta os níveis de cálcio no sangue (HUANG *et al.*, 2004; SILVA; BILEZIKIAN, 2015; PALLA *et al.*, 2018). Este é um importante mecanismo de controle da calcemia no organismo, mas a produção excessiva do paratormônio por uma ou mais das quatro glândulas paratireoides leva a condições patológicas, como o hiperparatireoidismo.

Figura 1- Mecanismos de ação do paratormônio em normalidade



Legenda: A diminuição dos níveis de cálcio ionizado circulante estimula a produção do PTH pelas paratireoides. A ação do PTH nos ossos, nos rins e, indiretamente, no intestino ativa mecanismos que elevam os níveis séricos de cálcio. O próprio aumento desses níveis é um estímulo para a redução da produção do PTH pelas paratireoides e para a produção do hormônio calcitonina pela tireoide, o qual age reduzindo a reabsorção óssea. PTH: paratormônio.

Fonte: Produção do próprio autor.

## 2.2 Hiperparatireoidismo

O hiperparatireoidismo é um distúrbio endócrino classificado em primário, secundário e terciário, levando em consideração a causa da elevada produção do paratormônio (FRASER, 2009). Alguns autores defendem ainda a existência do hiperparatireoidismo quaternário (BRAIN; SHARMA; NUSSEY, 2004; SMITH; BRADLEY, 1987).

No hiperparatireoidismo primário, terceiro distúrbio endócrino mais comum, a produção excessiva do paratormônio se dá em decorrência da presença de adenoma nas paratireoides em cerca de 85% dos casos, de hiperplasia (15%) e de

carcinoma (<1%) (FRASER, 2009; MARCOCCI *et al.*, 2008; SALTI *et al.*, 1992). A produção autônoma do hormônio pelas glândulas resulta em aumento dos níveis de cálcio no sangue. Isso ocorre porque o paratormônio estimula a retirada de cálcio dos ossos, o aumento da reabsorção do cálcio pelos túbulos renais e a maior reabsorção do cálcio no intestino delgado por aumento na síntese da forma ativa da vitamina D (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018). Além das ações diretas no cálcio, o paratormônio também estimula o aumento da excreção de fosfato pelos rins e a diminuição dos níveis de fosfato sérico leva ao aumento dos níveis de cálcio no sangue (KUMAR; ABBAS; ASTER, 2018). O hiperparatireoidismo primário é mais frequente em mulheres e a incidência aumenta com a idade (FRASER, 2009).

A apresentação clínica do hiperparatireoidismo primário sofreu alterações ao longo dos anos, principalmente a partir dos anos 1970. Isso se deu em decorrência do desenvolvimento dos testes laboratoriais para avaliação da calcemia e da produção de paratormônio. O que antes era conhecido como a doença das “dores ósseas, pedras renais, grunhidos abdominais e gemidos psíquicos” passou a ser uma condição assintomática detectada pelas alterações nos níveis de paratormônio e cálcio (DANIELS, 2004; KHEDR, 2018). Entretanto, o diagnóstico do hiperparatireoidismo assintomático é mais comum em países desenvolvidos, nos quais a triagem bioquímica é realizada rotineiramente. Nos países em desenvolvimento, a forma sintomática do hiperparatireoidismo com manifestações ósseas ainda predomina, uma vez que a investigação das dosagens séricas de cálcio e paratormônio ainda não são tão comuns e acessíveis (BILEZIKIAN *et al.*, 2018). Especificamente no Brasil, um estudo realizado no hospital universitário da Universidade Federal de São Paulo mostrou que apesar de a maioria dos pacientes com hiperparatireoidismo primário serem sintomáticos no momento do diagnóstico, a porcentagem de indivíduos assintomáticos cresceu com o passar dos anos, devido a maior disponibilidade dos métodos diagnósticos (OHE *et al.*, 2005). Estudos conduzidos em Pernambuco mostraram que pacientes com hiperparatireoidismo primário assintomático corresponderam a quase metade e a mais da metade dos pacientes em 2006 e 2013, respectivamente (BANDEIRA *et al.*, 2006; EUFRAZINO; VERAS; BANDEIRA, 2013).

Considerando a forma sintomática, as alterações provocadas pelo hiperparatireoidismo primário podem levar a importantes consequências clínicas para os rins, como a formação de calcificações renais, e para os ossos, com elevação nos

níveis de remodelação óssea levando ao desenvolvimento de osteíte fibrosa cística, com formações de tumor marrom e ocorrência de fraturas (AHMAD; HAMMOND, 2004). O tratamento do hiperparatireoidismo primário irá depender do caso, mas na maioria deles é a paratireoidectomia, para posterior reestabelecimento dos níveis de paratormônio (AHMAD; HAMMOND, 2004; PALLA *et al.*, 2018). Excluídas outras causas secundárias para o aumento da produção do paratormônio, o diagnóstico de hiperparatireoidismo primário normocalcêmico também pode ocorrer, embora seja uma apresentação clínica recentemente descrita e, portanto, ainda pouco estudada (SCHINI *et al.*, 2020). Apesar de normalmente esporádico, o hiperparatireoidismo primário também pode raramente ocorrer em síndromes hereditárias, incluindo principalmente a neoplasia endócrina múltipla tipo 1 (OMIM #131100) ou tipo 2a (OMIM #171400), e a síndrome do hiperparatireoidismo-tumores maxilares (OMIM #145001) (BILEZIKIAN *et al.*, 2005).

O hiperparatireoidismo secundário ocorre principalmente em decorrência da doença renal crônica, mas qualquer fator que leve à hipocalcemia ou à deficiência da vitamina D pode resultar no desenvolvimento deste distúrbio endócrino (BEREKET *et al.*, 2000; FRASER, 2009). Na doença renal crônica, cuja prevalência é estimada entre 8 e 16%, o funcionamento alterado dos rins leva à diminuição dos níveis da vitamina D ativa, diminuição da excreção do fosfato e diminuição da reabsorção de cálcio pelos rins e da absorção de cálcio pelo intestino devido à carência da vitamina D. As consequências das alterações são a hiperfosfatemia e a hipocalcemia. Assim, a elevada produção do paratormônio pelas glândulas paratireoides é estimulada, com subsequente reabsorção óssea para a restauração dos níveis de cálcio sérico (JHA *et al.*, 2013). Calcificações da artéria coronária e de outros vasos menores podem ser complicações resultantes do hiperparatireoidismo relacionado à doença renal crônica, além de alterações ósseas (AHMAD; HAMMOND, 2004).

As alterações minerais e no metabolismo ósseo decorrentes da doença renal crônica levam a quadros de osteodistrofia renal, que ocorrem em grande parte dos pacientes em hemodiálise. A osteíte fibrosa cística é a manifestação mais comum da osteodistrofia renal e sua evolução leva à formação de tumores marrons, sendo essas algumas manifestações orais e maxilofaciais da doença renal crônica (BARACALDO *et al.*, 2015; PONTES *et al.*, 2018). O tratamento do hiperparatireoidismo secundário está relacionado ao tratamento da doença renal crônica por medicação, hemodiálise ou transplante renal, bem como regularização da

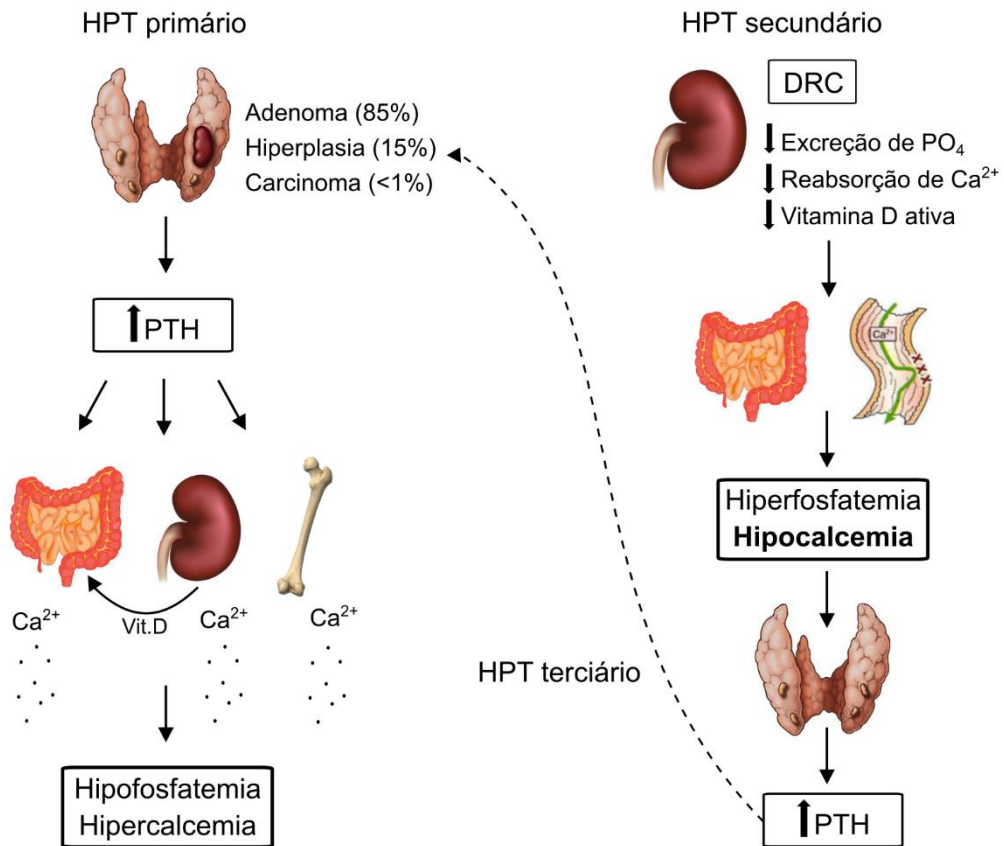


deficiência de vitamina D ou da hipocalcemia nos casos não relacionados à doença renal crônica (AHMAD; HAMMOND, 2004; BERKET *et al.*, 2000; PONTES *et al.*, 2018). Nos casos em que esses tratamentos não forem o suficiente para normalizar a produção do paratormônio, a remoção das glândulas paratireoides pode ser indicada (AHMAD; HAMMOND, 2004; PONTES *et al.*, 2018).

A ocorrência do hiperparatireidismo terciário está principalmente relacionada à hiperplasia das glândulas paratireoides em decorrência de uma doença renal crônica persistente. A hiperplasia resulta em funcionamento autônomo das glândulas com elevada produção de paratormônio (FRASER, 2009; SELVI *et al.*, 2009). A Figura 2 apresenta um esquema da ocorrência do hiperparatireoidismo primário, secundário e terciário. O hiperparatireoidismo quaternário sugerido por alguns autores foi primeiramente conceituado em 1987 como o aumento da produção do paratormônio de forma ectópica em indivíduos com doenças malignas (DANIELS, 2004; GUIMARÃES *et al.*, 2006; SMITH; BRADLEY, 1987). Entretanto, mais recentemente em 2004 foi proposto que o quarto tipo de hiperparatireoidismo é a evolução da hiperplasia glandular do hiperparatireoidismo terciário para a formação de um adenoma nas paratireoides (BRAIN; SHARMA; NUSSEY, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

Na presença do hiperparatireoidismo, o indivíduo afetado pode então apresentar sintomas sistêmicos que afetam os sistemas neurológico, renal, esquelético, digestivo e cardíaco. No sistema esquelético como um todo, o hiperparatireoidismo leva ao aumento da remodelação óssea, osteopenia e perda óssea (KHEDR, 2018). Com o foco nas manifestações orais relacionadas ao hiperparatireoidismo primário, secundário e terciário, uma revisão sistemática da literatura mostrou que de forma geral, as três formas apresentaram sintomas similares (PALLA *et al.*, 2018). Os mais comuns foram aumento de volume com assimetria facial, os quais ocorreram na grande maioria dos casos. A mandíbula foi mais afetada que a maxila. Radiograficamente, imagens radiolúcidas foram mais frequentes. A perda da lâmina dura ao redor das raízes dos dentes foi mais frequente nos casos de hiperparatireoidismo secundário (PALLA *et al.*, 2018). Outros exemplos de manifestações orais menos comuns relatadas foram dor, neuropatia, mobilidade dentária, destruição de cortical óssea, deslocamento dentário e reabsorção de raízes, as quais podem estar relacionadas à expansão causada nos ossos maxilares (PALLA *et al.*, 2018).

Figura 2 - Hiperparatireoidismo primário, secundário e terciário



Legenda: No hiperparatireoidismo (HPT) primário, a elevada produção do PTH em decorrência de uma alteração patológica nas paratireóides leva a alterações nos ossos, nos rins e no intestino, as quais resultam em diminuição dos níveis de fósforo e aumento dos níveis de cálcio sérico. Na doença renal crônica (DRC), o mau funcionamento dos rins leva a quadros de hipocalcemia e conseqüentemente ao aumento da produção do PTH pelas paratireóides, caracterizando o HPT secundário. No HPT terciário, a persistência da DRC resulta em hiperplasia e produção autônoma de PTH pelas paratireóides. PTH: paratormônio

Fonte: Produção do próprio autor.

### 2.3 Osteíte fibrosa cística

A osteíte fibrosa cística é o termo utilizado para descrever a doença óssea metabólica e as alterações esqueléticas características do hiperparatireoidismo sintomático (BILEZIKIAN *et al.*, 2018; MISIOROWSKI *et al.*, 2017). Ela consiste em um processo difuso de reabsorção óssea, o qual ocorre devido ao desequilíbrio entre a atividade osteoblástica e osteoclástica, e de proliferação de fibroblastos (EREM *et*

*al.*, 2004). Algumas manifestações da osteíte fibrosa cística são reabsorções ósseas nas falanges e clavículas, desmineralizações difusas com aspecto “*salt and pepper*” nos ossos do crânio, perda da lâmina dura ao redor das raízes dos dentes e formação de tumores marrons, os quais podem levar a fraturas patológicas na pelve e nos ossos longos (BILEZIKIAN *et al.*, 2018; EREM *et al.*, 2004; KHEDR, 2018).

Em quadros de osteodistrofia renal, a aparência de vidro despolido nos ossos gnáticos é uma característica normalmente encontrada, podendo ser visualizado também aumento de volume (BARACALDO *et al.*, 2015; PONTES *et al.*, 2018). Aumentos de volume exorbitantes na região craniofacial causados pela osteodistrofia renal/osteíte fibrosa cística/tumor marrom eram nomeados do passado como “*leontiasis ossea*” ou face leonina. Manifestações agressivas da osteíte fibrosa cística associada a osteodistrofia renal são atualmente reconhecidas como síndrome de Sagliker (BARACALDO *et al.*, 2015).

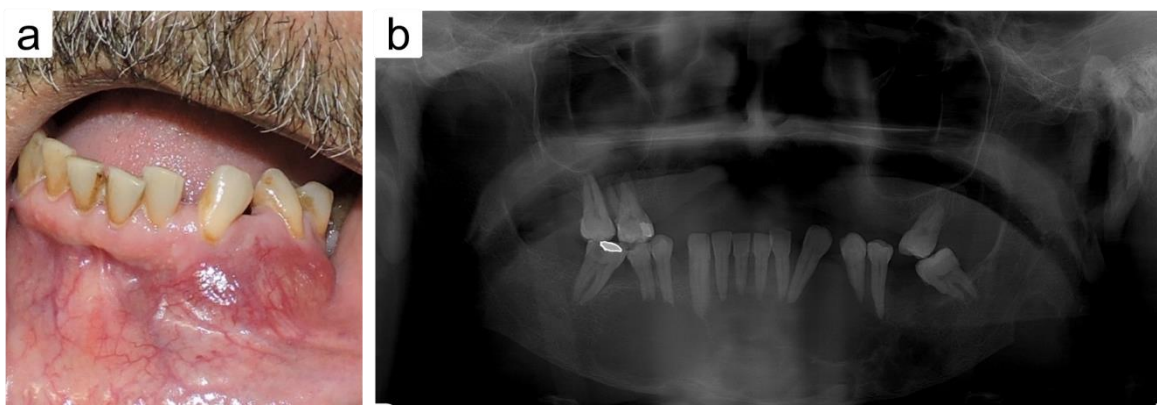
Microscopicamente a osteíte fibrosa cística apresenta-se como trabéculas ósseas com áreas de aumento da atividade de reabsorção por osteoclastos, áreas de proliferação de osteoblastos na superfície, além de proliferação de tecido fibroso entremeadado a elas (BARACALDO *et al.*, 2015; PONTES *et al.*, 2018).

#### 2.4 Tumor marrom do hiperparatireoidismo

Os tumores marrons são lesões ósseas benignas que se manifestam tardiamente no hiperparatireoidismo, como componentes da osteíte fibrosa cística (EL-MOFTY, 2009; LAJOLO *et al.*, 2020). As lesões podem ocorrer no hiperparatireoidismo primário, secundário e terciário (DANIELS, 2004; LACERDA *et al.*, 2008; SELVI *et al.*, 2009). A elevada produção de paratormônio leva ao desequilíbrio entre processos osteoblásticos e osteoclásticos. Conseqüentemente, ocorre aumento da reabsorção óssea e da remodelação fibro-óssea, com afinamento do córtex e substituição do osso medular por tecido fibroso, resultando então na formação de tumores marrons (EREM *et al.*, 2004). A incidência do tumor marrom do hiperparatireoidismo varia de 1,5% a 3% (KANAAAN *et al.*, 1998), sendo maior no hiperparatireoidismo primário e mais comum em mulheres (ALWANI *et al.*, 2019; QAISI *et al.*, 2015). Devido ao diagnóstico precoce do hiperparatireoidismo, os tumores marrons se tornaram uma entidade rara nos países desenvolvidos (DE CREA *et al.*, 2012).

As lesões podem afetar um ou mais ossos, sendo eles principalmente as costelas, clavículas, ossos pélvicos e, mais raramente, a mandíbula (LAJOLO *et al.*, 2020; ZHANG, 2010). Casos em maxila e em outros ossos craniofaciais e lesões periféricas também podem ocorrer, ainda que mais raramente (GUIMARÃES *et al.*, 2006; LAJOLO *et al.*, 2020). Na maioria das vezes os tumores marrons são assintomáticos, mas pode haver dor e fratura patológica, além de alterações na mastigação, fala e respiração quando ocorre na região craniofacial (KAR *et al.*, 2001; LAJOLO *et al.*, 2020). Radiologicamente as lesões apresentam-se como imagens radiolúcidas/hipodensas bem definidas, uniloculares ou multiloculares, únicas ou múltiplas, que podem levar a expansão e afinamento da cortical, mas normalmente não levam ao rompimento da mesma (MORI *et al.*, 2013; PONTES *et al.*, 2018). Durante o exame intraoral é possível que não se encontre nenhuma manifestação, mas caso ela esteja presente, consiste em lesões exofíticas, de coloração marrom-avermelhada, facilmente sangrantes, podendo haver ulceração (LAJOLO *et al.*, 2020). Um exemplo da apresentação clínico-radiográfica do tumor marrom é apresentado na Figura 3.

Figura 3 - Aspecto clínico-radiográfico do tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares



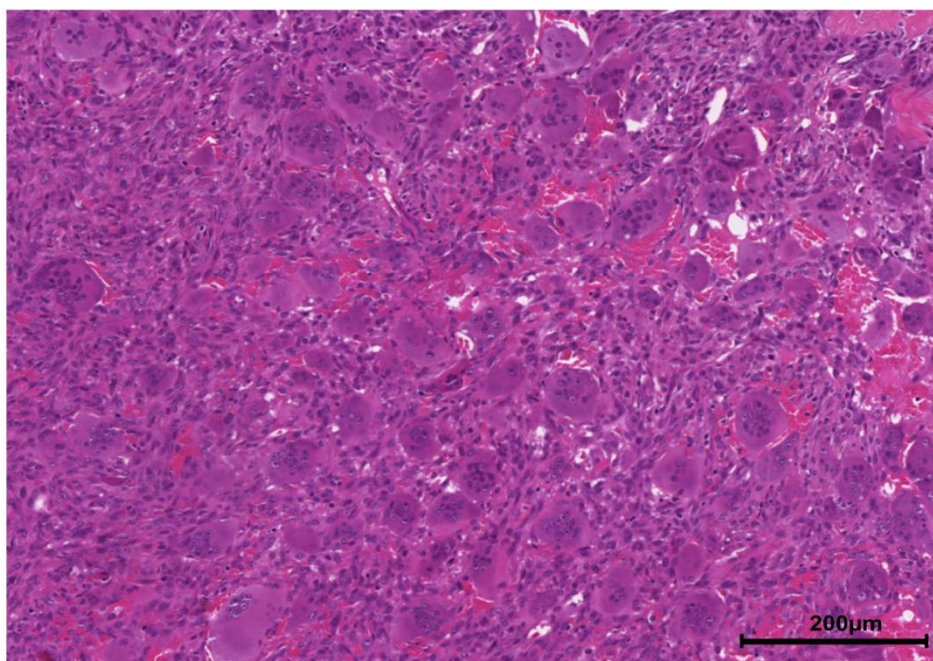
Legenda: a) Caso de tumor marrom com manifestação intraoral, mostrando aumento de volume de coloração avermelhada próximo aos dentes 33, 34 e 35.  
b) Mesmo caso da letra A, com múltiplas lesões radiolúcidas, bem delimitadas e uniloculares em corpo e ramo de mandíbula. Observa-se reabsorção das raízes dos dentes próximos às lesões.

Fonte: Cortesia do professor Hélder Antônio Rebelo Pontes

Histopatologicamente, o tumor marrom do hiperparatireoidismo é caracterizado por células mononucleares fusiformes e ovoides, entremeadas por

células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos dispersas ou arranjadas em pequenos aglomerados. Além disso observa-se tecido vascular com áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina (DUARTE *et al.*, 2011; EL-MOFTY, 2009) (FIGURA 4). A hipervascularização, o conteúdo hemorrágico e os depósitos de hemossiderina macroscopicamente dão à lesão uma coloração marrom, razão pela qual se deu a escolha do seu nome (EL-MOFTY, 2009; PALLA *et al.*, 2018).

Figura 4 - Características histopatológicas do tumor marrom do hiperparatireoidismo



Legenda: Observa-se a presença de células mononucleares ovoides e fusiformes em um estroma fibrovascularizado com áreas de hemorragia e numerosas células gigantes multinucleadas (H&E, aumento original 100X).

Fonte: Arquivo do próprio autor (*Screenshots* obtidos do aplicativo *Case Viewer 2.3*)

Para o diagnóstico do tumor marrom do hiperparatireoidismo é necessário lançar mão de correlações entre os achados histopatológicos, clínico-radiográficos e bioquímicos, como as dosagens séricas de paratormônio, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina (WICK; MCDERMOTT; SWANSON, 2014). Histopatologicamente, os tumores marrons se assemelham a diversas outras lesões ricas em células gigantes, como as lesões centrais e periféricas de células gigantes, o fibroma-não ossificante, as lesões do querubismo, o tumor de células gigantes, dentre outras (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014; WICK; MCDERMOTT; SWANSON, 2014). Clínico-radiograficamente eles

podem mimetizar inclusive lesões malignas, como por exemplo o mieloma múltiplo e metástases de câncer (MISIOROWSKI *et al.*, 2017). Assim, é imprescindível estabelecer as correlações e saber que a dosagem sérica de paratormônio é um elemento chave no estabelecimento do diagnóstico diferencial do tumor marrom do hiperparatireoidismo.

Uma vez realizado o diagnóstico de tumor marrom, o tratamento adequado para a redução dos níveis de paratormônio dependerá do tipo de hiperparatireoidismo, e as lesões tendem a regredir após o tratamento do distúrbio endócrino (SILVERMAN; WARE; GILLOOLY, 1968; SUAREZ-CUNQUEIRO *et al.*, 2004). No geral, tumores marrons apresentam bom prognóstico. Após o tratamento do hiperparatireoidismo, nos casos em que a lesão é pequena, o indivíduo é jovem e o hiperparatireoidismo é brando, a conduta de “*wait and see*” por vezes é prudentemente aplicada, uma vez que os tumores marrons podem regredir (LAJOLO *et al.*, 2020). Entretanto, como em alguns casos a lesão pode levar meses a anos para regredir totalmente, regredir apenas parcialmente ou mesmo progredir após o tratamento do hiperparatireoidismo, algumas abordagens medicamentosas e cirúrgicas têm sido relatadas em associação ao tratamento do distúrbio endócrino (DOS SANTOS *et al.*, 2018; KNEZEVIĆ *et al.*, 1991; YAMAZAKI *et al.*, 2003). Nesse sentido, corticoides intralesionais e sistêmicos e calcitonina têm sido utilizados para a redução do tamanho do tumor marrom e abordagens como excisão cirúrgica, ressecção do tumor remanescente, curetagem e osteoplastia também já foram descritas (DANIELS, 2004; DOS SANTOS *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2006; QAISI *et al.*, 2015). Em resumo, a decisão do tratamento a ser realizado dependerá da localização, tamanho e comportamento clínico da lesão, além da idade e das condições sistêmicas do paciente (LAJOLO *et al.*, 2020). Portanto, cada caso deve ser avaliado de forma individual e cuidadosa.

## 2.5 Via de sinalização celular MAPK e genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*

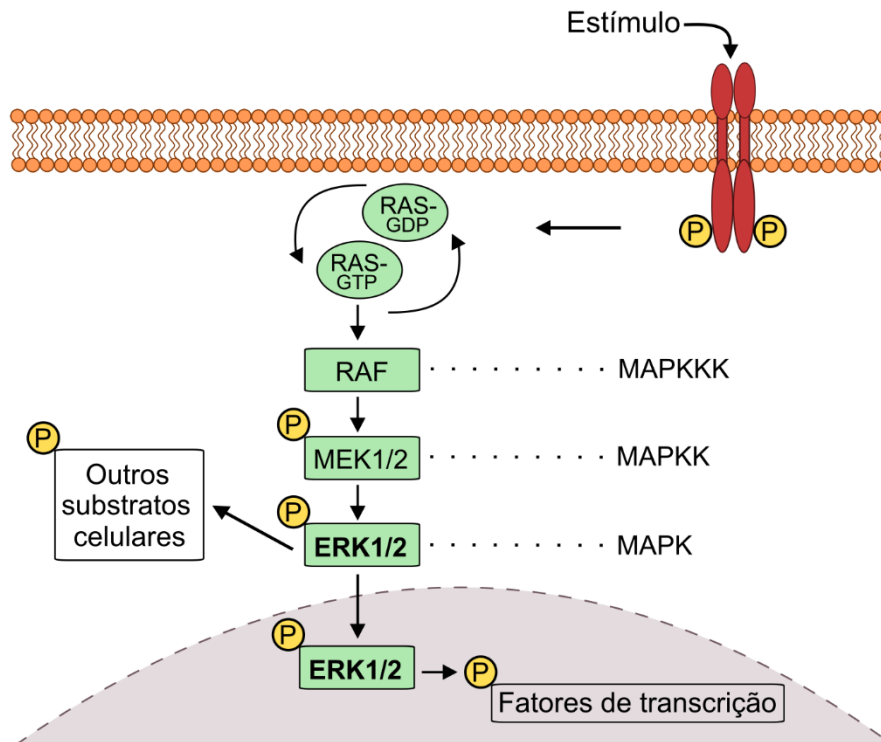
As vias de sinalização MAPK são um dos mais difundidos mecanismos de regulação das células eucarióticas. Tais vias controlam processos celulares como expressão gênica, transcrição, tradução, ciclo celular, metabolismo, proliferação, crescimento, diferenciação, motilidade, apoptose e sobrevivência celular. A regulação desses processos ocorre frente à resposta celular a uma gama de estímulos extracelulares, que incluem hormônios, fatores de crescimento, citocinas inflamatórias

e estresse ambiental. Diferentes famílias de receptores de membrana ligados às vias MAPK são responsáveis pelo reconhecimento desses estímulos e desta forma, através de cascatas de fosforilações, as vias exercem suas funções de controle dos processos celulares (KRISHNA; NARANG, 2008; SHAUL; SEGER, 2007). Diferentes vias de sinalização MAPK podem atuar na regulação celular em mamíferos, tais como as vias *extracelular regulated kinases* (ERK1/2), *Jun NH<sub>2</sub> terminal kinases* (JNK1/2/3), p38 (p38  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ ), ERK7/8, ERK3/4 e ERK5. Dentre essas vias, ERK1/2, JNKs e p38 são as mais estudadas (KRISHNA; NARANG, 2008).

A presença de três proteínas quinases conservadas evolutivamente e compondo três módulos de ativação é uma característica comum a todas as vias MAPKs. Essas proteínas são de forma geral denominadas MAPK, MAPK quinase (MAPKK) e MAPK quinase quinase (MAPKKK). Tudo se inicia quando uma MAPKKK é ativada por fosforilação ou interação com proteínas de ligação a GTP da família RAS/RHO em resposta a um estímulo externo. Posteriormente a MAPKKK é capaz de fosforilar e ativar a MAPKK que por sua vez também leva à fosforilação da MAPK. Por fim, a MAPK fosforila o seu substrato alvo, que pode ser um fator de transcrição, uma outra proteína quinase ou ainda outras proteínas como as do citoesqueleto. A partir dessa cascata de fosforilações a via exerce as suas funções de controle (KRISHNA; NARANG, 2008; YOON; SEGER, 2006). É sabido também que as vias MAPKs exercem importante papel na regulação da diferenciação de osteoclastos e na remodelação óssea (LEE *et al.*, 2018).

Na via canônica MAPK/ERK, e mais especificamente na cascata RAS-RAF-MEK-ERK (FIGURA 5), as MAPKKK correspondem às proteínas das famílias RAF, as MAPKK à proteína MEK1/2 e a MAPK à proteína ERK1/2, sendo a última a responsável pelo nome dado à via (KRISHNA; NARANG, 2008; YOON; SEGER, 2006). Sendo assim, os estímulos agirão ativando receptores da superfície celular. O sinal captado pelos receptores será transduzido para pequenas proteínas G (de ligação a GTP), as quinases da família RAS, moléculas codificadas pelos genes *KRAS*, *HRAS* ou *NRAS*. Estas pequenas GTPases irão recrutar e ativar as quinases da família RAF (as MAPKKK), codificadas por *BRAF*, *RAF1* e *ARAF*. A proteína RAF se liga e fosforila a MEK1/2 (a MAPKK), que então fosforila ERK1/2 (a MAPK), a qual atuará nos seus substratos nucleares ou citoplasmáticos e levará ao controle dos diversos processos celulares pelos quais a via é responsável (KRISHNA; NARANG, 2008).

Figura 5 - Esquema da ativação da via de sinalização MAPK/ERK



Legenda: Estímulos externos agem por meio de um receptor transmembrana, levando à ativação da proteína citoplasmática RAS. RAS ativada recruta e ativa RAF, que posteriormente fosforila e ativa MEK1/2, a qual fosforila e ativa ERK1/2. ERK1/2 ativada fosforila substratos citoplasmáticos e transloca para o núcleo, onde ativa fatores de transcrição. Tudo isso culmina com o controle de importantes processos biológicos como diferenciação, proliferação e sobrevivência celular.

Fonte: Produção do próprio autor.

Além dos processos de regulação da via MAPK/ERK por fosforilação e defosforilação, diferentes mecanismos regulam o direcionamento do efeito da via para cada função específica, ou seja, a especificidade do sinal transmitido pela via MAPK/ERK (SHAUL; SEGER, 2007). A diferença na duração e intensidade dos sinais, a interação em complexos proteicos (*scaffold proteins*), a localização das proteínas nos diferentes compartimentos celulares, o *cross-talk* com outras vias de sinalização intracelular e a presença de diferentes isoformas das proteínas integrantes da via são alguns destes mecanismos. A partir da ação de tais mecanismos, os sinais produzidos pela cascata da via são direcionados a diferentes processos celulares, que inclusive podem ser opostos, como por exemplo proliferação, sobrevivência celular e apoptose (SHAUL; SEGER, 2007).



A perda da regulação da via MAPK/ERK pode desencadear processos proliferativos que estão relacionados com a carcinogênese humana (BUROTTO *et al.*, 2014; DE LUCA *et al.*, 2012; DHILLON *et al.*, 2007; OLEA-FLORES *et al.*, 2019; SHAUL; SEGER, 2007). A perda da regulação pode ocorrer em decorrência de alterações em diferentes níveis da via, como por exemplo nos receptores transmembrana, na produção de ligantes ativadores, na amplificação ou desregulação de fatores de transcrição nucleares, no mau funcionamento dos mecanismos que regulam a especificidade da sinalização ou, principalmente, na presença de mutações ativadoras nos genes da família *RAS* ou *BRAF* (DHILLON *et al.*, 2007).

Os genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*, nos quais foram descritas mutações somáticas, heterozigotas e ativadoras em lesões de células gigantes esporádicas dos maxilares, convergem para a ativação da via MAPK/ERK (GOMES *et al.*, 2018). Nos parágrafos seguintes serão apresentadas brevemente algumas características e funções destes genes e das proteínas por eles codificadas.

O *KRAS* é um membro da família de proto-oncogenes *RAS*. Ele codifica a proteína *KRAS*, uma GTPase, que como já descrito acima possui a função de transmitir sinais extracelulares para cascatas de transdução de sinais intracelulares. Se a proteína *RAS* estará ativa ou não depende do balanço entre ligações da mesma a GTP e a GDP, sendo que no estágio ativo há maior ligação da proteína *RAS* a GTP (BOS, 2018; HAIGIS, 2017). Mutações no gene *KRAS* levam à codificação da proteína *KRAS* alterada, o que prejudica a homeostase entre ligações a GTP e a GDP favorecendo o modo ativado da proteína, ligada a GTP. Isso ocorre porque as mutações mais comuns no gene *KRAS*, aquelas que afetam os códons 12, 13, 61 e 146, levam a alterações próximas ao sítio de ligação de GTP/GDP na proteína *KRAS*, modificando funções de hidrólise de GTP ou de troca de nucleotídeos (HAIGIS, 2017). Estando ativadas, as proteínas *RAS* recrutam e ativam as proteínas *RAF* (MAPKKK), culminando com a ativação da cascata de sinais da forma como já foi descrita anteriormente. Assim, as mutações *KRAS* levam a ativação constitutiva da via MAPK/ERK (DE LUCA *et al.*, 2012). Além desta via, mutações no gene *KRAS* também levam a alterações em outras vias como PI3K/AKT/mTOR, entretanto a última não é foco do presente estudo (DE LUCA *et al.*, 2012).

Mutações somáticas heterozigotas no gene *KRAS* foram descritas em uma grande proporção de lesões de células gigantes esporádicas dos maxilares, incluindo mutações *hotspots* p.G12D/A, p.G13D, p.A146V/P e mutações envolvendo resíduos

mais raramente afetados p.V14L, p.L19F, e p.G10E (GOMES *et al.*, 2018). Fibromas não-ossificantes dos ossos longos também apresentaram frequentes mutações neste gene, com consequente ativação da via MAPK/ERK (BAUMHOER *et al.*, 2019). Mutações no gene *KRAS* são altamente frequentes em três grandes grupos de câncer: câncer em pâncreas, pulmão e intestino (HAIGIS, 2017). Além das neoplasias malignas, mutações no gene *KRAS* já foram descritas em diferentes contextos, incluindo outras lesões benignas (ANGLESIO *et al.*, 2017; COURA *et al.*, 2019; MARTINS-CHAVES *et al.*, 2019; NIKOLAEV; FISH; RADOVANOVIC, 2018; SASAKI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019) e mesmo tecido histologicamente normal (LAC *et al.*, 2019). Na discussão desta Dissertação será abordado esse tema com maior detalhamento.

O gene *TRPV4* (*Transient receptor potential cation channel subfamily V member 4*) codifica o canal polimodal e permeável ao cálcio TRPV4, o qual faz parte de uma família de canais receptores de potencial transitório. Um monômero de canal TRPV4 é formado por seis domínios transmembrana (segmentos S1-S6) com uma região formadora de poro entre os segmentos S5 e S6, além das regiões C-terminal e N-terminal intracelulares nas quais estão presentes outros importantes domínios funcionais. Quatro monômeros se agrupam e dão origem à estrutura homotetramérica do canal TRPV4 (NILIUS; VOETS, 2013). Os canais TRPV4 são estimulados por calor, aumento de volume celular, estresse mecânico, e ligantes endógenos e sintéticos e são expressos em diferentes tecidos do organismo, nos quais exercem importantes funções fisiológicas (MASUYAMA *et al.*, 2008; NILIUS; VOETS, 2013; SONKUSARE *et al.*, 2012).

Mais de 50 mutações germinativas no gene *TRPV4* foram descritas em canelopatias hereditárias, as quais apresentam grande variabilidade fenotípica. Elas incluem displasias esqueléticas, doenças causadas por defeitos do desenvolvimento ósseo, artropatias e neuropatias (NILIUS; VOETS, 2013). Além disso, mutações germinativas ativadoras no *TRPV4* também foram reportadas em osteonecrose femoral hereditária (MAH *et al.*, 2016). Mutações somáticas heterozigotas no gene *TRPV4* (p.M713V/I) foram detectadas exclusivamente na variante clínica central de casos esporádicos de lesão de células gigantes dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018). O resíduo M713 localiza-se em uma posição crítica no segmento S6, próximo ao poro do canal TRPV4. Tais mutações específicas não foram previamente descritas em

canelopatias e culminaram com maior atividade basal e estimulada do canal e consequentemente com a ativação sustentada da via MAPK/ERK (GOMES *et al.*, 2018).

Em níveis de expressão alterados, os canais TRPV4 também exercem importante papel na biologia do câncer (PARK *et al.*, 2016), com a função patológica incluindo proliferação, apoptose, migração e invasão celular (LEHEN'KYI; PREVARSKAYA, 2011). Alguns exemplos de cânceres com os quais o canal TRPV4 está relacionado são os cânceres colo-retal, de colo de útero, hepatocelular, melanoma, não melanoma de pele e câncer de mama (FUSI *et al.*, 2014; LEE *et al.*, 2016; OLIVAN-VIGUERA *et al.*, 2018; PARK *et al.*, 2016). O significado clínico dos níveis de expressão alterados do TRPV4 depende do tipo de tumor e da localização do mesmo (PARK *et al.*, 2016).

Por último, o gene *FGFR1* (*fibroblast growth factor receptor 1*) codifica o receptor transmembrana do tipo tirosina-quinase FGFR1, o qual faz parte de uma família de quatro diferentes receptores transmembrana do tipo tirosina-quinase (FGFR1-4). O receptor FGFR1 é formado por um domínio de ligação extracelular, um domínio transmembrana e dois domínios tirosina-quinase intracelulares. Fatores de crescimento de fibroblastos (FGFs) são polipeptídeos que se ligam a estes receptores iniciando uma cascata de eventos intracelulares que ativam as principais vias de sinalização proliferativa como, por exemplo, a MAPK (BABINA; TURNER, 2017; ITOH; ORNITZ, 2011). Há uma grande variedade de funções e de sinalização dos FGFs, que é explicada, em parte, pelas numerosas variantes de *splicing* alternativo que geram diferentes isoformas dos seus receptores FGFR (GONG, 2014). Os FGFs são essenciais para o desenvolvimento embrionário, incluindo a odontogênese, e para o controle de importantes mecanismos fisiológicos, funções endócrinas e reparo de lesões (ITOH; ORNITZ, 2011).

Recentemente, mutações heterozigotas somáticas p.N330I e p.C381R no gene *FGFR1* foram descritas em lesões de células gigantes esporádicas dos maxilares e em fibroma não-ossificante dos ossos longos, levando à ativação da via MAPK/ERK (BAUMHOER *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2018). Os resíduos N330 e C381 localizam-se nos domínios extracelular e transmembrana do receptor FGFR1, respectivamente (FARROW *et al.*, 2006). Essas mesmas mutações, além de outras mutações ativadoras no gene *FGFR1* também foram previamente descritas na displasia osteoglofônica, uma doença hereditária caracterizada por baixa estatura,

anormalidades craniofaciais expressivas e presença de lesões ósseas (FARROW *et al.*, 2006; WHITE *et al.*, 2005). Lesões de células gigantes dos maxilares foram também previamente observadas em pacientes diagnosticados com essa síndrome (SOW *et al.*, 2010; WHITE *et al.*, 2005). Além disso, mutações germinativas e somáticas afetando o gene *FGFR1* também foram descritas em tumores benignos cerebrais (RIVERA *et al.*, 2016).

A presença de alterações genéticas como mutações ativadoras, fusão e principalmente amplificação do gene *FGFR1* estão também relacionadas à oncogênese, progressão tumoral e resistência à terapia em vários tipos de tumor, como por exemplo cânceres de mama, de pulmão, de ovário, osteossarcoma e carcinoma de células escamosas de esôfago e de cabeça e pescoço (BABINA; TURNER, 2017; DIENSTMANN *et al.*, 2014). Amplificação do gene *FGFR1* e expressão aumentada da proteína FGFR1 foram relatadas também em lesões malignas de glândulas salivares e carcinoma de células escamosas oral e de orofaringe. Lesões benignas de glândula salivar, como adenoma pleomórfico, também apresentaram fusão e amplificação do gene *FGFR1* (MARIZ *et al.*, 2018) e a expressão de FGFR1 tem importância prognóstica para lesões odontogênicas benignas como ameloblastomas por estar associada à recorrência dos mesmos (FONSECA *et al.*, 2018).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar alterações moleculares em tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares.

#### 3.2 Objetivos específicos

Investigar mutações nos códons 10,12,13,14,19 e 146 do *KRAS* em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares.

Investigar mutações nos códons 330 e 381 do *FGFR1* em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares.

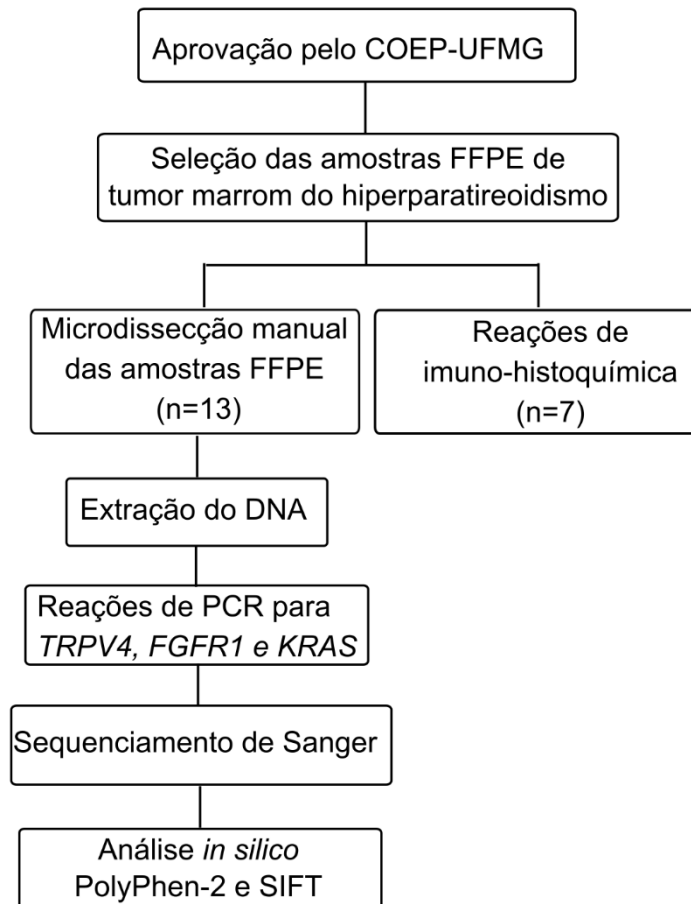
Investigar mutações no códon 713 do *TRPV4* em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares.

Verificar a ativação da via MAPK/ERK em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares.

## 4 METODOLOGIA

A Figura 6 apresenta o fluxograma da metodologia utilizada no presente trabalho, a qual é detalhada nas subseções seguintes.

Figura 6 - Fluxograma metodológico



Legenda: Esquema da sequência dos procedimentos realizados na metodologia do presente trabalho.

Fonte: Produção do próprio autor.

### 4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa para o desenvolvimento deste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 11451619.6.0000.5149; Parecer: 3.386.644) (ANEXO A).

## 4.2 Seleção de amostras

Foi utilizada uma amostra de conveniência de casos de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares fixados em formol e incluídos em parafina (*formalin fixed paraffin embedded*; FFPE). No total, 18 amostras foram obtidas do acervo do serviço de Patologia de quatro diferentes instituições brasileiras (Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal do Pará, Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic), de um serviço de patologia oral no Uruguai (Universidad de la Republica), de outro serviço de patologia no México (Universidad Autónoma Metropolitana) e também da Guatemala (Centro Clinico de Cabeza y Cuello). Cinco destas amostras apresentaram quantidade insuficiente de tecido disponível ou baixa qualidade do DNA obtido e, então, foram excluídas. Portanto, 13 amostras foram incluídas na análise final dos resultados. Os diagnósticos de todos os 13 casos foram revisados por dois patologistas bucais (R.S.G e C.C.G.), associando as características clínicas e histopatológicas em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E). Dados clínicos como sexo, idade, localização da lesão, tipo de hiperparatireoidismo, níveis séricos de paratormônio, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina foram obtidos. Para nenhum dos casos houve registro de história familiar de hiperparatireoidismo ou de diagnóstico prévio de alguma síndrome, sendo todos, portanto, casos de hiperparatireoidismo esporádico.

## 4.3 Microdissecção manual

As lâminas coradas em H&E de cada amostra de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares foram utilizadas para a seleção das áreas de interesse. As amostras que apresentaram, além de áreas da lesão, regiões de tecido normal, foram manualmente microdissecadas, obtendo-se cortes com enriquecimento de áreas de lesão. Utilizando um micrótomo, após dispensar os três primeiros cortes de cada amostra, foram realizados cerca de 8 cortes de 8µm de espessura, os quais foram depositados em microtubos de 1,5ml para posterior extração do DNA.

#### 4.4 Extração do DNA

O DNA genômico (gDNA) das amostras de tecidos FFPE foi extraído utilizando o *QIAamp DNA FFPE Tissue kit* (QIAGEN, Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras depositadas em microtubos de 1,5ml foram desparafinizadas utilizando a *Deparaffinization Solution* (QIAGEN, Hilden, Germany) e digeridas com proteinase K (QIAGEN, Hilden, Germany) a 56°C até o conteúdo se tornar homogêneo, seguido de incubação em banho seco a 90°C por 1 hora. Em seguida, o DNA foi retido na membrana da coluna *QIAamp Min Elutecolumn* (QIAampMinElute® Columns) e lavagens foram realizadas com Buffer AL e etanol absoluto (Merck), Buffer AW1 e Buffer AW2. Ao final, três eluições foram realizadas com 30µl, 20µl e 20µl de Buffer ATE, respectivamente. A análise da concentração e da qualidade do gDNA obtido de todas as amostras foi realizada por meio do espectrofotômetro *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA). Para as próximas etapas foram selecionadas as extrações com a razão de absorvância 260/280 entre 1,8 e 2,0 e a razão 260/230 entre 2,0 e 2,2.

#### 4.5 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram realizadas as reações em cadeia da polimerase (PCR) para a amplificação das regiões de interesse dos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* para as 13 amostras a fim de investigar a presença de mutações nessas regiões (GOMES *et al.*, 2018). Para o gene *KRAS* as mutações de interesse eram p.G10E, p.G12D/A, p.G13D, p.V14L e p.L19F no exon 2 e p.A146V/P no exon 4. No exon 13 do gene *TRPV4* as mutações de interesse eram p.M713V/I e nos exons 8 e 9 do *FGFR1* eram p.N330I e p.C381R, respectivamente. Para todos os genes, os demais nucleotídeos de cada amplicon analisado foram também inspecionados manualmente na busca de possíveis outras mutações. Os iniciadores utilizados foram os mesmos descritos previamente (GOMES *et al.*, 2018; Tabela 1). Foi adicionada aos iniciadores uma sequência M13 para simplificar o fluxo de trabalho e análise dos dados, com exceção do iniciador *TRPV4*. A adição desta sequência permite que todos os produtos da PCR sejam sequenciados utilizando apenas o par de iniciadores M13. A sequência M13 para os iniciadores *Forward* foi 5'GTAAACGACGGCCAGT3' e para os iniciadores *Reverse* 5'CAGGAAACAGCTATGAC3'.



Tabela 1- Iniciadores utilizados para a detecção das mutações nas regiões de interesse

Iniciador	Sequência	Códons*	Tamanho do amplicon sequenciado (pb)
KRAS Exon 2 F KRAS Exon 2 R	5'GGCCTGCTGAAAATGACTGAA3' 5'GGTCCTGCACCAGTAATATGC3'	10, 12, 13, 14, 19	197
KRAS Exon 4 F KRAS Exon 4 R	5'TGAAGATGTACCTATGGTCCTAGT3' 5'TCAGTGTTACTTACCTGTCTTGTC3'	146	181
FGFR1 Exon 9 F FGFR1 Exon 9 R	5'GTCCATTTTGCTTCCGTTGT3' 5'GCAGAGTGATGGGAGAGTCC3'	330	188
FGFR1 Exon 10 F FGFR1 Exon 10 R	5'ACTGACTCAGCCCTGGAAGA3' 5'CATCTGGCTGTGGAAGTCAC3'	381	199
TRPV4 Exon 13 F TRPV4 Exon 13 R	5'ACCTTCAGCACCTTCCTCCT3' 5'CCAGATGTGCTTGCTCCTCCT3'	713	207

Abreviações: pb: pares de base. \*Códons nos quais previamente foram descritas mutações em lesões centrais e periféricas de células gigantes. Toda a extensão de cada amplicon foi manualmente inspecionada.

Fonte: Produção do próprio autor

Para as reações da PCR foi utilizado um volume final de 25µl, contendo 100ng de gDNA, 10µM de cada iniciador e 1x de *MyTaq HS Red Mix, 2x* (Bioline Reagents Ltd, UK). Todas as reações foram realizadas na *Mastercycler Gradient thermocycler* (Eppendorf, Hamburg, Germany) e as condições para os ciclos de PCR para os alvos *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* foram ajustadas para permitirem uma melhor amplificação do gDNA de amostras FFPE. A primeira etapa foi a desnaturação inicial, que ocorreu a 95°C por 3 minutos. As três etapas seguintes se repetiram por 45 ciclos: desnaturação a 95°C por 15 segundos, anelamento à temperatura de melting (a depender da padronização de cada iniciador) por 15 segundos e extensão a 72°C por 30 segundos. Posteriormente seguiu-se a etapa de extensão final a 72°C por 10 minutos e o resfriamento a 4°C. As reações de PCR foram conduzidas utilizando controle positivo (amostra de gDNA de alta qualidade) e negativo (reação sem gDNA). Para verificar o resultado da amplificação, os produtos da PCR foram submetidos a eletroforese em gel de agarose a 1,5% marcado por fluorescência (SYBR™ Safe DNA gel stain; invitrogen by Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, USA), e visualizados em um transiluminador sob luz UV. Os produtos da PCR passaram então por um processo de purificação enzimática com a enzima ExoSAP-IT (Affymetrix, USB®, Santa Clara, CA, USA), seguindo as instruções do fabricante.

#### 4.6 Sequenciamento de Sanger e análise *in-silico*

Após a PCR foi realizado o sequenciamento de Sanger para determinar a sequência de nucleotídeos da região de interesse dos genes. As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando reagentes do kit *Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Wilmington, USA)* e a eletroforese capilar ocorreu no equipamento *ABI 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Wilmington, USA)*. Todos os produtos foram sequenciados bidirecionalmente, com os iniciadores *forward* e *reverse*. Os cromatogramas gerados foram visualizados e manualmente inspecionados no software *SnapGene* (from GSL Biotech; available at [snapgene.com](http://snapgene.com)), utilizando-se as sequências referências de cada um dos genes para comparação (*KRAS*: NM\_033360.4; *FGFR1*: NM\_023110.3; *TRPV4*: NM\_021625.5). As ferramentas online PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*; <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) e SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant*; <https://sift.bii.a-star.edu.sg>) foram utilizadas para predição *in silico* da patogenicidade da mutação a nível proteico.

#### 4.7 Imuno-histoquímica (IHC)

Para avaliar a ativação da via MAPK/ERK nas amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo foi realizada imuno-histoquímica para a proteína pERK1/2 em sete amostras, de acordo com a disponibilidade de tecido e seguindo o protocolo padrão. Inicialmente, foram realizados dois cortes de 4µm para cada amostra FFPE, os quais foram colocados em lâminas de vidro silanizadas (StarFrost, Knittel Glass, Germany). Os cortes foram então desparafinizados com xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) e hidratados utilizando álcool em concentrações graduais (álcool absoluto, 95% e 80%) (Merck). Para a recuperação antigênica foi utilizada solução TRIS-EDTA (pH 8,0) e o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com metanol e peróxido de hidrogênio na proporção 1:1. A incubação do anticorpo primário foi realizada com anticorpo monoclonal de coelho anti-pERK1/2 (1:100, Thr202/Tyr204, Cell Signaling Technology, catalog number #4376) diluído 1:100 com diluente de anticorpo, a 4°C por 18 horas. Os controles negativos não passaram por esta etapa de incubação com o anticorpo primário e em substituição a ele foi utilizada a solução Tris-HCL. Para a visualização da reação foi utilizado o Sistema a base de

polímero (EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, USA) e o cromógeno diaminobenzidina (Dako North America, Carpinteria, USA) incubados de acordo com a inspeção visual. A contra-coloração foi realizada com hematoxilina de Mayer por 3 minutos, os cortes foram desidratados com álcool em concentrações graduais (70%, 90%, álcool absoluto) (Merck), imersos em xilol e montados em lâminas com meio de montagem Entellan (Merck). Os resultados foram avaliados por três observadores (L.M.G., R.S.G. e C. C.G.) em microscópio óptico de luz de forma cega aos resultados moleculares. A marcação foi considerada positiva quando foi nuclear e citoplasmática, independente da intensidade. As lâminas foram escaneadas em um aumento de 20X, utilizando Pannoramic MIDI Digital Slide Scanner (3DHistech, Hungary) e as imagens foram visualizadas e capturadas utilizando o aplicativo Case Viewer v.2.3 (3DHISTECH).

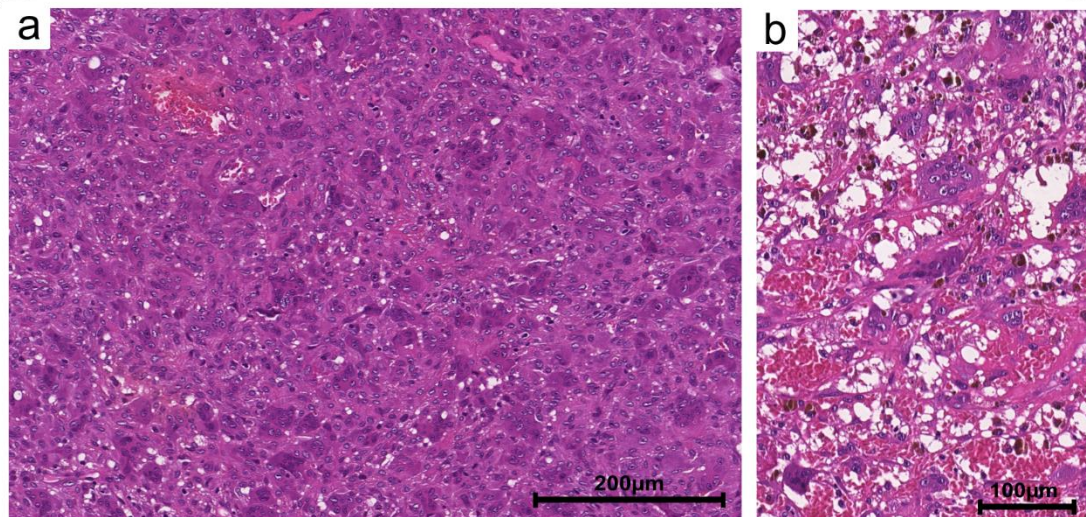
## 5 RESULTADOS

Os resultados obtidos estão descritos abaixo e foram escritos também sob forma de artigo científico, o qual está aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine* (APÊNDICE A).

### 5.1 Dados clínico-patológicos

O exame histopatológico das 13 amostras revelou a presença de células mononucleares fusiformes ou ovoides entremeadas a células gigantes multinucleadas. As células mostraram-se dispostas em um fundo contendo numerosos vasos sanguíneos, áreas de extravasamento de hemácias e depósitos de hemossiderina. O estroma da lesão é constituído por tecido fibrovascular (FIGURA 7). Em alguns casos, como nas amostras #2 e #5, foi possível observar, adjacente ao tumor marrom, áreas sugestivas do quadro de aumento da remodelação-óssea característico da osteíte fibrosa cística, conforme apresentado na Figura 8.

Figura 7 - Características histopatológicas observadas nas amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo

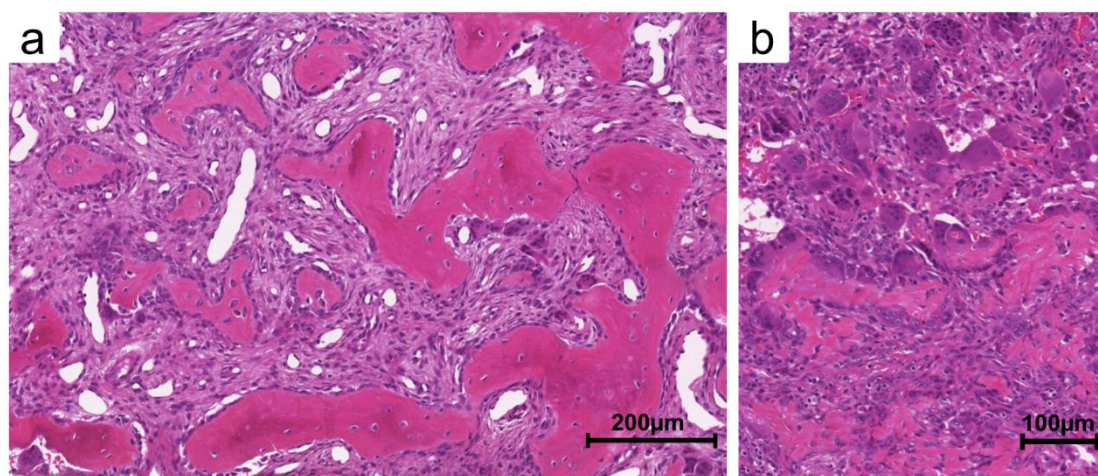


Legenda: a) Observa-se a presença de células gigantes multinucleadas e células mononucleares ovoides e fusiformes entremeadas por vasos sanguíneos hiperemiados e focos hemorrágicos (H&E, aumento original 100X).

b) Destaque para as áreas de hemorragia e depósitos de hemossiderina (H&E, aumento original 200X).

Fonte: Arquivo do próprio autor (Captura de tela obtida no aplicativo *Case Viewer 2.3*)

Figura 8 - Áreas sugestivas de osteíte fibrosa cística



Legenda: a) Em algumas amostras, observou-se adjacente à área de tumor marrom áreas com trabéculas de tecido ósseo revestidas por osteoblastos e exibindo numerosos osteoclastos ao redor, e entremeadas por tecido conjuntivo fibroso celularizado, sugerindo aumento da atividade de reabsorção e formação óssea. Observa-se também vasos sanguíneos (H&E, aumento original 100X).

b) Observa-se na fotomicrografia uma área sugestiva de osteíte fibrosa cística (abaixo) em proximidade com a área característica de tumor marrom do hiperparatireoidismo (acima) (H&E, aumento original 100X).

Fonte: Arquivo do próprio autor (Captura de tela obtida no aplicativo *Case Viewer 2.3*)

Na tabela 2 observa-se a descrição dos dados clínicos de todos os 13 indivíduos. Considerando os casos para os quais a informação pôde ser obtida, a idade dos indivíduos variou de 25 a 76 anos, com média de 46,5 anos. O número de indivíduos do sexo feminino foi de 9 e do sexo masculino 3, resultando em uma proporção sexo masculino/feminino de 1:3. Em 9 casos o tumor marrom ocorreu no contexto do hiperparatireoidismo primário, enquanto em 3 casos as lesões surgiram em decorrência do hiperparatireoidismo secundário. A mandíbula foi o osso afetado na maioria dos casos (8/12; 66,6%).

Tabela 2 - Características clínicas dos 13 indivíduos afetados por tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares incluídos no estudo

<b>Amostra #</b>	<b>Apresentação clínica</b>	<b>Tipo de HPT</b>	<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Localização</b>
1	Periférico	Secundário	53	M	Maxila, anterior e posterior
2	Central	Secundário	43	F	Mandíbula, anterior e posterior
3	Central	Primário	76	F	Mandíbula, anterior
4	Central	Primário	43	F	Maxila, posterior

5	Central	Primário	25	F	Maxila
6	Central	Primário	32	F	Mandíbula, posterior
7	Central	Primário	34	F	Maxila e mandíbula
8	Central	Secundário	63	M	Mandíbula, anterior e posterior
9	Central	Primário	ND	ND	ND
10	Central	ND	47	F	Mandíbula, posterior
11	Central	Primário	30	M	Mandíbula, anterior e posterior
12	Central	Primário	51	F	Mandíbula, posterior
13	Central	Primário	62	F	Maxila

Abreviações: HPT: hiperparatireoidismo; ND: dado não disponível; M: masculino; F: feminino.

Fonte: Produção do próprio autor

As dosagens séricas de paratormônio, cálcio, fósforo e fosfatase alcalina para cada caso são apresentados na tabela 3. Os valores de referência são 10-65 pg/ml para o paratormônio, 8,4-10,2 mg/dl para o cálcio, 2,7-4,5 mg/dl para o fósforo e 39-177 U/L para a atividade da fosfatase alcalina (MISIROWSKI *et al.*, 2017).

Tabela 3 - Dados dos exames sorológicos dos 13 indivíduos afetados por tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares incluídos no estudo

Amostra #	PTH	Cálcio	Fósforo	Fosfatase alcalina
1	223pg/ml	9,8mg/dl	3,6mg/dl	96U/L
2	ND	ND	ND	ND
3	474pg/ml	Hypercalcemia	ND	ND
4	ND	12,5mg/dl	ND	ND
5	330pg/ml	ND	ND	220U/L
6	100pg/ml	ND	ND	139U/L
7	1067pg/ml	ND	ND	889U/L
8	878pg/ml	9,9mg/dl	2,6mg/dl	765U/L
9	805pg/ml	11,17mg/dl	1,7mg/dl	ND
10	1810pg/ml	11,2mg/dl	1,4mg/dl	ND
11	705pg/ml	26,8mg/dl	1,8mg/dl	863U/L
12	640pg/ml	151mg/dl	2,53mg/dl	14U/L
13	990pg/ml	12,6mg/dl	1,85mg/dl	193U/L

Abreviações: PTH: Paratormônio; ND: dado não disponível

Fonte: Produção do próprio autor

## 5.2 Sequenciamento de Sanger e análise *in-silico*

Treze amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares foram sequenciadas para análise de mutações em regiões específicas dos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*. Foram detectadas mutações no gene *KRAS* em sete

amostras (54%) (TABELA 4). Todas as amostras apresentaram sequências selvagens para os genes *FGFR1* e *TRPV4*.

Tabela 4 - Dados moleculares dos 13 casos de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares incluídos no estudo

Amostra #	<i>TRPV4</i> e <i>FGFR1</i>	<i>KRAS</i> exon 2	<i>KRAS</i> exon 4	Predição da patogenicidade	
				PolyPhen-2	SIFT
1	WT	<b>p.G12V</b>	WT	Provavelmente patogênica	Patogênica
2	WT	WT	WT	-	-
3	WT	WT	WT	-	-
4	WT	<b>p.G12V</b>	WT	Provavelmente patogênica	Patogênica
5	WT	WT	WT	-	-
6	WT	<b>p.G12V</b>	p.A134T**	Provavelmente patogênica / Provavelmente patogênica	Patogênica /Patogênica
7	WT	WT	WT	-	-
8	WT	WT	WT	-	-
9	WT	<b>p.G13D</b>	WT	Possivelmente patogênica	Patogênica
10	WT	<b>p.G12V*</b>	WT	Provavelmente patogênica	Patogênica
11	WT	<b>p.G12D/ p.E37K**</b>	WT	Possivelmente patogênica / Possivelmente patogênica	Patogênica /Patogênica
12	WT	WT	WT	-	-
13	WT	WT	<b>p.A146T*</b>	Provavelmente patogênica	Patogênica

Abreviações: WT: *Wild-type*: sequência selvagem. \* Nestes casos, apenas o pico do alelo mutante foi detectado por sequenciamento de Sanger bidirecional;  
\*\* Variantes de significado incerto (VUS).

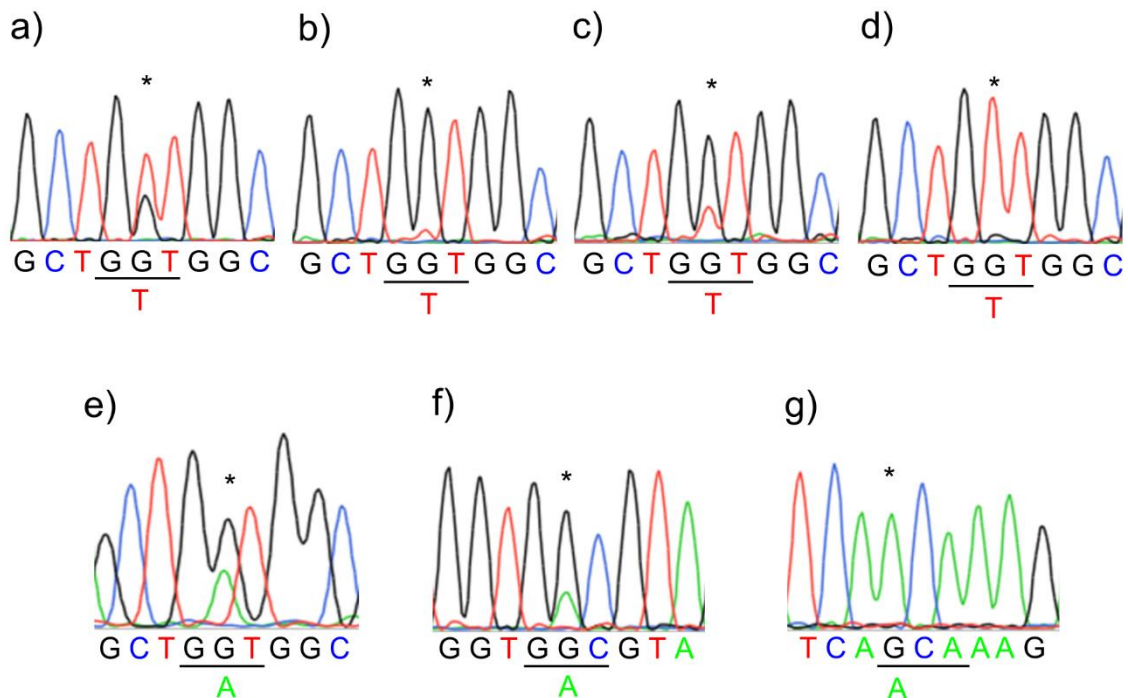
Fonte: Produção do próprio autor

Mutações *KRAS* consideradas patogênicas foram detectadas nos 7 casos, sendo elas p.G12V (n=4), p.G12D (n=1), p.G13D (n=1) e p.A146T (n=1). Os cromatogramas que ilustram cada uma das mutações patogênicas são apresentados na Figura 9. Mutações no códon 12 (p.G12V/D) foram as mais frequentes, sendo detectadas em 38% (5/13) das amostras, o que corresponde a 71% (5/7) das mutações patogênicas do gene *KRAS* identificadas nas amostras. A tabela 4 detalha as mutações detectadas em cada amostra, incluindo a predição da patogenicidade por análise *in silico* de cada uma delas. Entre os indivíduos com mutação a média de idade foi de 44,5 anos, enquanto no grupo de pacientes sem a mutação esta média foi de 48,6 anos. Dos casos com mutação, 3 ocorreram em mandíbula e 3 em maxila, em igual proporção, enquanto que a maioria dos casos sem mutação ocorreram em mandíbula.

Na amostra #1, o pico do alelo mutante da mutação p.G12V é maior do que o pico do alelo selvagem (FIGURA 9a). Em uma amostra com a mutação p.G12V (amostra #10) (FIGURA 9d) e na amostra com mutação p.A146T (amostra #13) (FIGURA 9g) apenas o pico do alelo mutante foi observado nos cromatogramas. Em

outros dois casos (amostras #6 e #11), além da mutação patogênica detectada, as variantes de significado incerto (VUS) p.A134T e p.E37K foram também identificadas (FIGURA 10). As duas últimas variantes são consideradas VUS por não haver evidências científicas suficientes que permitam concluir se tratam-se de variantes benignas ou patogênicas.

Figura 9- Captura de tela dos cromatogramas das mutações patogênicas detectadas nos códons 12, 13 e 146 do gene *KRAS* por sequenciamento de Sanger em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares

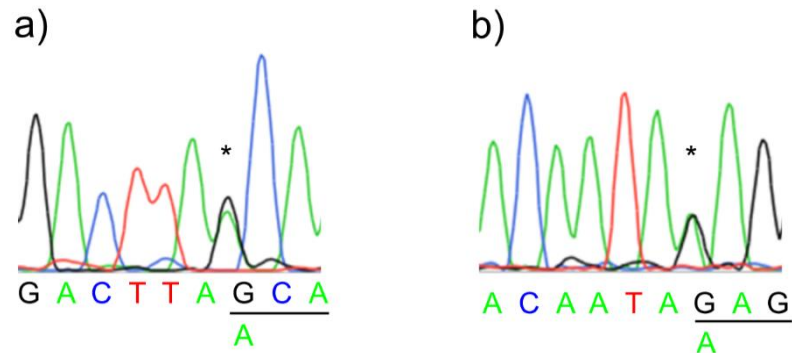


- Legenda: a-d) Observa-se a substituição c.35G>T resultando na alteração do códon 12 de GGT por GTT e, conseqüentemente, p.G12V na amostra #1 (a), #4 (b), #6 (c) e #10 (d).
- e) Observa-se a substituição c.35G>A resultando na alteração do códon 12 de GGT por GAT e, conseqüentemente, p.G12D na amostra #11.
- f) Observa-se a substituição c.38G>A resultando na alteração do códon 13 de GGC por GAC e, conseqüentemente, p.G13D na amostra #9.
- g) Observa-se a substituição c.436G>A resultando na alteração do códon 146 de GCA por ACA e, conseqüentemente, p.A146T na amostra #13.

Fonte: Produção do próprio autor (Capturas de telas obtidas do aplicativo Snap Gene® Viewer 4.3.11).



Figura 10 - Captura de tela dos cromatogramas das variantes de significado incerto detectadas no gene *KRAS* por sequenciamento de Sanger em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares



Legenda: a) Observa-se a substituição c.400G>A resultando na alteração do códon 134 de GCA por ACA e, conseqüentemente, p.A134T na amostra #6

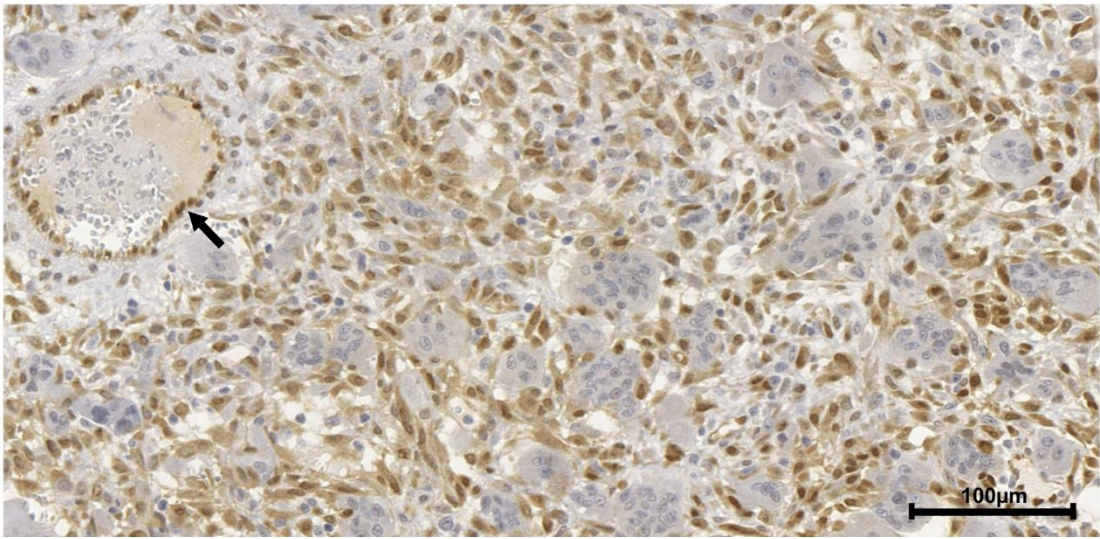
b) Observa-se a substituição c.109G>A resultando na alteração do códon 37 de GAG por AAG e, conseqüentemente, p.E37K na amostra #11

Fonte: Produção do próprio autor (Capturas de tela obtidas do aplicativo *Snap Gene® Viewer 4.3.11*)

### 5.3 Imuno-histoquímica (IHC)

A expressão imuno-histoquímica da proteína pERK1/2 foi observada em todas as sete amostras, incluindo aquelas em que não foram detectadas mutações em nenhuma das sequências avaliadas. O padrão de imunoposição da proteína foi semelhante em todas elas. Observou-se intensa imunopositividade nuclear e citoplasmática nas células mononucleares enquanto as células gigantes multinucleadas foram negativas para pERK1/2. Este padrão de expressão imuno-histoquímica para pERK1/2 pode ser observado na Figura 11.

Figura 11 - Expressão imuno-histoquímica para a proteína pERK1/2 em tumor marrom do hiperparatireoidismo dos maxilares



Legenda: Observa-se intensa positividade para pERK1/2 no núcleo e citoplasma das células mononucleares e ausência de imunoexpressão nas células gigantes multinucleadas. Nota-se também positividade das células endoteliais que revestem um vaso sanguíneo (seta) exibindo marcação positiva como controle positivo interno (Amostra #7, aumento original 200X).

Fonte: Arquivo do próprio autor (Captura de tela obtida no aplicativo *Case Viewer 2.3*)

## 6 DISCUSSÃO

A detecção de mutações genéticas em lesões que são mímicas histológicas do tumor marrom do hiperparatireoidismo instigam a investigação de tais alterações em amostras desta lesão. Rearranjos cromossômicos envolvendo o gene *USP6* são alterações frequentes em cistos ósseos aneurismáticos primários, e tais alterações estão ausentes no tumor marrom do hiperparatireoidismo (SUKOV *et al.*, 2008). Logo, esse achado ilustra o fato de que apesar de compartilharem algumas similaridades histopatológicas, essas lesões apresentam patogênese molecular distinta (OLIVEIRA *et al.*, 2004; SUKOV *et al.*, 2008).

Lesões ricas em células gigantes podem ocorrer nos maxilares no contexto de síndromes genéticas causadas por mutações nos genes *RAS*, tais como síndrome de Noonan, síndrome cardiofaciocutânea, síndrome oculoectodérmica e síndrome de Schimmelpenning-Feuerstein-Mims (ERNST; QUINN; ALAWI, 2007; GOMES *et al.*, 2020; NEUMANN *et al.*, 2009; PEACOCK *et al.*, 2015). Além disso, essas lesões também podem ocorrer na displasia osteoglofônica, a qual resulta de mutações no gene *FGFR1* (GOMES *et al.*, 2020; WHITE *et al.*, 2005). Recentemente, mutações patogênicas somáticas heterozigotas nos genes *KRAS*, *FGFR1*, e *TRPV4* foram descritas em lesões de células gigantes esporádicas dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018). Mutações nos genes *FGFR1* e *KRAS* foram também reportadas no fibroma não-ossificante dos ossos longos, adicionando evidências moleculares para o previamente proposto de que essas duas lesões podem representar na verdade a mesma entidade (BAUMHOER *et al.*, 2019; BOVÉE; HOGENDOORN, 2019; GOMES; GOMEZ, 2019). Como essas lesões ricas em células gigantes são também mímicas histológicas do tumor marrom do hiperparatireoidismo, o presente estudo investigou mutações nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4* em tumores marrons dos maxilares e mutações patogênicas no gene *KRAS* foram encontradas em 54% dos casos avaliados.

Mutações nos genes *RAS* são responsáveis por 30% das neoplasias malignas humanas (WHITWAM *et al.*, 2007; ZHOU; DER; COX, 2016). Os proto-oncogenes *RAS* estão associados a tipos particulares de cânceres humanos (KARNOUB; WEINBERG, 2008), sugerindo que a atividade oncogênica das diferentes isoformas da proteína *RAS* é contexto-dependente (WHITWAM *et al.*, 2007).

Mutações no gene *KRAS* ocorrem em grande parte dos casos de adenocarcinoma ductal de pâncreas, câncer colorretal e câncer de pulmão de células não pequenas (HAIGIS, 2017). Além das neoplasias malignas, mutações no gene *KRAS* já foram descritas em diferentes contextos, incluindo lesões benignas como endometriose, papilomas oncocíticos sinusais e escamosos de cabeça e pescoço (ANGLELIO *et al.*, 2017; SASAKI *et al.*, 2020; WANG *et al.*, 2019), tumores odontogênicos e ósseos (BAUMHOER *et al.*, 2019; COURA *et al.*, 2019; GOMES *et al.*, 2018), malformações vasculares (NIKOLAEV; FISH; RADOVANOVIC, 2018) e mesmo em tecido endometrial histologicamente normal (LAC *et al.*, 2019). Mutações no gene *KRAS* foram também previamente identificadas em outros tumores ricos em células gigantes, incluindo os tumores de células gigantes do pâncreas e fígado (WESTRA *et al.*, 1998) e o tumor tenossinovial de células gigantes (MANKUZHY *et al.*, 2019). Recentemente, foi reportada a presença de mutações *KRAS* em lesões ricas em células gigantes da cavidade oral, incluindo lesões de células gigantes dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018) e lesões de células gigantes associadas a implante dentário (MARTINS-CHAVES *et al.*, 2019), sendo a última uma lesão reativa benigna de etiologia inflamatória.

Nas amostras de tumor marrom dos maxilares analisadas, mutações patogênicas no códon 12 do gene *KRAS* foram as mais frequentes. Mutações p.G12V/D foram detectadas em 38% das amostras e correspondem a mais de 50% das mutações *KRAS* que foram detectadas. Mutações nesse códon também foram frequentes em lesões de células gigantes esporádicas dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018) e em fibroma não-ossificante dos ossos longos (BAUMHOER *et al.*, 2019). No contexto das neoplasias malignas, mutações no códon 12 do gene *KRAS* correspondem a 90% de todas as mutações nesse gene em carcinomas de pâncreas, colorretal e de pulmão (HAIGIS, 2017). Mutações nos códons 146 e 13 foram descritas em fibroma não-ossificante dos ossos longos (BAUMHOER *et al.*, 2019), em lesões de células gigantes dos maxilares (GOMES *et al.*, 2018) e em lesões de células gigantes associadas a implantes (MARTINS-CHAVES *et al.*, 2019). Essas mutações patogênicas já foram extensamente estudadas, mas os seus efeitos funcionais parecem depender especificamente do tecido e do contexto em que ocorrem (BRUBAKER *et al.*, 2019; HAIGIS, 2017; JOHNSON *et al.*, 2019; POULIN *et al.*, 2019). As VUS p.A134T (rs1565884227) e p.E37K no gene *KRAS* foram detectadas em uma

amostra cada, e já foram previamente reportadas como mutações somáticas em câncer do intestino grosso e na leucemia mielomonocítica crônica (COSMIC, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), respectivamente. Além disso, p.E37K foi também descrita na lesão de células gigantes associada a implante (MARTINS-CHAVES *et al.*, 2019).

É bem sabido que tumores marrons resultam de alterações no metabolismo ósseo devido a elevada produção de paratormônio, o qual age estimulando a reabsorção óssea por ativação de osteoclastos. Então, a compreensão da osteoclastogênese pode auxiliar no entendimento da fisiopatologia da lesão. A patogênese molecular dos tumores marrons é pouco compreendida, e poucos estudos focaram nisto. No presente estudo, a ativação da via de sinalização MAPK/ERK foi observada em tumores marrons que ocorrem nos maxilares, mesmo nos casos em que não foram detectadas mutações nos genes avaliados. Essa via exerce um importante papel na diferenciação de osteoclastos e na reabsorção óssea (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; LEE *et al.*, 2018). É possível que células com mutação *KRAS* sejam mais responsivas à ação de moléculas de sinalização relacionadas à osteoclastogênese, como RANKL, devido à super-regulação da via MAPK/ERK, levando à maior diferenciação osteoclástica e reabsorção óssea. Nos parágrafos seguintes buscou-se embasar e refletir a hipótese proposta.

Os osteoclastos são células multinucleadas que se formam a partir da linhagem monocítica/macrofágica de células da medula óssea hematopoiética (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003; LEE *et al.*, 2018). A diferenciação e função dos osteoclastos é normalmente regulada por inúmeras citocinas, hormônios e fatores de crescimento. O RANKL e o M-CSF (*macrophage colony-stimulating factor*) são exemplos de dois fatores de regulação indispensáveis para a osteoclastogênese, agindo tanto nos precursores de osteoclastos quanto nos osteoclastos maduros (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003).

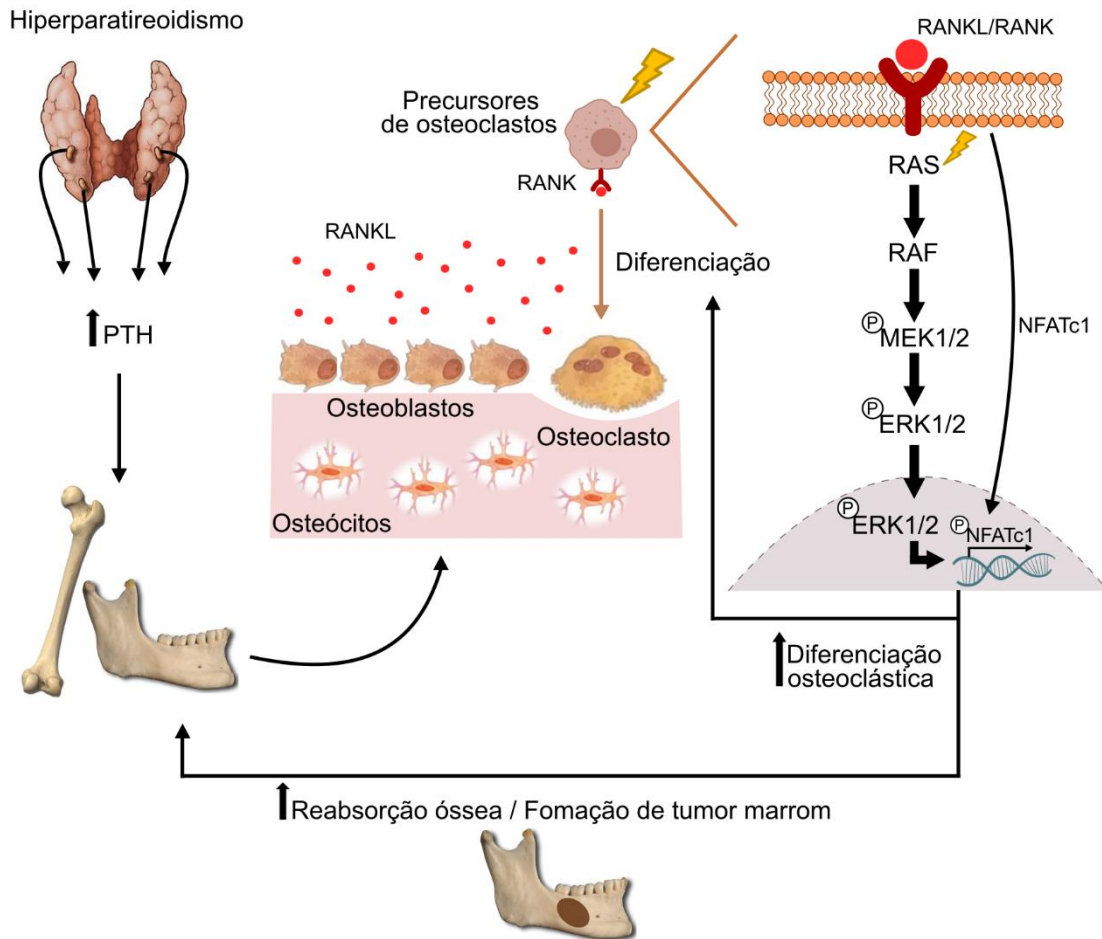
A ação do paratormônio influencia a produção de RANKL. O hormônio produzido pelas paratireoides se liga ao seu receptor em células ósseas, mesenquimais e inflamatórias, estimulando a produção de RANKL por essas células (KHEDR, 2018). Assim como em outras lesões ricas em células gigantes semelhantes a osteoclastos dos maxilares, é possível que o conjunto de células mononucleares que participam da formação da lesão do tumor marrom seja composto por fibroblastos,

osteoblastos e células monocíticas precursoras de osteoclastos (LIU; YU; LI, 2003). No tumor marrom do hiperparatireoidismo, foi demonstrado por hibridização *in situ* forte positividade para a expressão de RANKL exclusivamente em células mononucleares (STAGNER *et al.*, 2019). É possível então que o RANKL produzido por esse grupo de células mononucleares se ligue ao seu receptor RANK em outras células mononucleares correspondentes aos precursores de osteoclastos estimulando a diferenciação dos mesmos, e também nos próprios osteoclastos aumentando a atividade de reabsorção óssea (SILVA; BILEZIKIAN, 2015).

A sinalização RANKL nos precursores de osteoclastos leva à ativação da proteína NFATc1 (*nuclear factor of activated T-cells, cytoplasmic 1*), fator de transcrição que se localiza no citoplasma, mas transloca-se para o núcleo quando ativado. Uma vez no núcleo, o NFATc1 se liga ao seu próprio promotor, levando à auto amplificação e também à ativação de outros genes específicos de osteoclastos (ASAGIRI; TAKAYANAGI, 2007). A grande maioria das células gigantes do tumor marrom do hiperparatireoidismo apresenta marcação imuno-histoquímica positiva para NFATc1 nuclear (DUARTE *et al.*, 2011). Isto sugere que o acúmulo de células gigantes multinucleadas nos tumores marrons seja mediado por NFATc1 e, portanto, corrobora para a natureza osteoclástica das mesmas.

Tanto o RANKL quanto o M-CSF podem culminar na ativação das vias de sinalização MAPK/ERK, MAPK/JNK e MAPK/p38, as quais desempenham um papel importante na diferenciação dos osteoclastos e na reabsorção óssea (LEE *et al.*, 2018). M-CSF/MAPK está mais envolvido na regulação da proliferação dos precursores de osteoclastos, enquanto RANKL/MAPK está relacionado principalmente ao processo de diferenciação osteoclástica (BOYLE; SIMONET; LACEY, 2003). Na via MAPK/ERK, tanto a ligação do M-CSF ao seu receptor c-Fms quanto a ligação de RANKL ao receptor RANK desencadeiam processos que ativam as proteínas RAS/RAF e culminam com a ativação de ERK1/2. A presença das mutações patogênicas ativadoras no gene *KRAS* encontradas neste estudo podem levar à intensificação deste processo, levando à ativação constitutiva da via e culminando com maior ativação da osteoclastogênese e conseqüentemente da reabsorção óssea. A formação das lesões do tumor marrom do hiperparatireoidismo seria então sustentada por este mecanismo. A Figura 12 ilustra e sintetiza a hipótese apresentada.

Figura 12 - Hipótese para formação de tumores marrons na presença de mutação no gene *KRAS*



Legenda: O PTH produzido em excesso no hiperparatireoidismo age nas células ósseas estimulando a produção de RANKL pelas mesmas. O RANKL se liga ao seu receptor RANK nos precursores de osteoclastos levando à diferenciação dos mesmos em osteoclastos. Nas células com mutação *KRAS* (representada pelo raio amarelo) ocorre ativação constitutiva da via MAPK/ERK (ilustrada pelas setas mais espessas). Assim, a maior ativação da proteína ERK1/2 levaria à potencialização da atividade de fatores de transcrição como, por exemplo, o NFATc1, o que culminaria com maior diferenciação osteoclástica e consequentemente maior reabsorção óssea com formação de tumores marrons. Este seria então um possível mecanismo de sustentação das lesões. PTH: paratormônio.

Fonte: Produção do próprio autor.

Após o tratamento do hiperparatireoidismo, os tumores marrons tendem a regredir. Em um cenário diferente, mutações no gene *KRAS* também ocorrem em lesões ósseas que regredem com a idade, como no caso do fibroma não-ossificante dos ossos longos (BAUMHOER *et al.*, 2019). Além disso, mutações no gene *GNAS*

ocorrem nas displasias fibrosas (por meio do mosaicismo somático), e tais lesões regredem de maneira tempo-dependente (KUZNETSOV *et al.*, 2008). Assim como foi proposto para displasias fibrosas e fibromas não-ossificantes dos ossos longos, é possível que a remissão do tumor marrom mesmo nos casos em que há presença de mutações patogênicas seja devido a apoptose progressiva das células mutantes (BAUMHOER *et al.*, 2019; KUZNETSOV *et al.*, 2008).

No fibroma não-ossificante dos ossos longos a análise por hibridização *in situ* revelou transcritos mutantes apenas nas células mononucleares de amostras com mutação no gene *KRAS* (BAUMHOER *et al.*, 2019). Nas lesões de células gigantes dos maxilares as células mononucleares correspondem ao componente proliferativo, enquanto as células gigantes multinucleadas apresentam um perfil apoptótico (AMARAL *et al.*, 2011). No tumor marrom, marcação imuno-histoquímica positiva para PCNA (*proliferating cell nuclear antigen*) apenas em algumas das células mononucleares também sugere que elas sejam o componente proliferativo da lesão (OKADA; DAVIES; YAMAMOTO, 2000).

Em duas amostras de tumor marrom (amostras #10 e #13) foram observados apenas os picos correspondentes aos alelos mutantes nos cromatogramas gerados pelo sequenciamento de Sanger (mutações p.G12V e p.A146T, respectivamente). Em outra amostra (amostra #1) o pico do alelo mutante é maior do que o do alelo selvagem. Estes fatos foram anteriormente reportados para o gene *KRAS* em outras lesões e foram interpretados como desequilíbrio específico do alelo mutante (*mutant allele-specific imbalance*; MASI), e associado a um pior prognóstico (CHIOSEA *et al.*, 2011; HARTMAN *et al.*, 2012; KRASINSKAS *et al.*, 2013). É importante ressaltar que a amostra #10 parece apresentar um comportamento mais agressivo quando comparada às demais, uma vez que mostrou envolvimento significativo da mandíbula e também de ossos extra-gnáticos como ossos das costelas, da região pélvica e do joelho. A amostra #1, apesar de ser um tumor marrom periférico, apresentou envolvimento ósseo com reabsorção do osso subjacente. Para o outro caso (amostra #13), não foi possível ter acesso a mais informações clínicas.

O fato de as amostras serem FFPE é uma das limitações do presente estudo. Além disso, a utilização do sequenciamento de Sanger restringe as mutações possíveis de serem encontradas às regiões de interesse para as quais foram



desenhados os iniciadores. Embora o sequenciamento de Sanger seja o padrão ouro, ele apresenta sensibilidade reduzida se comparado às técnicas de sequenciamento paralelo massivo. Assim, é possível que algumas das lesões em que não foram detectadas mutações *KRAS* apresentem a mutação em um pequeno percentual de células, o que não tornou possível a detecção por sequenciamento de Sanger. A realização do sequenciamento em profundidade poderia auxiliar na detecção de mutações *KRAS* nestes casos. Estudos funcionais e a utilização de modelos animais de hiperparatireoidismo também poderiam auxiliar na melhor compreensão da patogênese do tumor marrom e do papel das mutações encontradas no contexto específico desta lesão.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, é possível concluir que mutações patogênicas no gene *KRAS* ocorrem nos tumores marrons do hiperparatireoidismo dos maxilares. Além disso, a ativação da via MAPK/ERK também é observada nesta lesão. Assim, nossos resultados incluem mais uma lesão de células gigantes multinucleadas ao espectro de lesões cuja patogênese molecular envolve a sinalização RAS.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, R.; HAMMOND, J. M. Primary, secondary and tertiary hyperparathyroidism. **Otolaryngol Clin North Am**. Philadelphia, v. 37, n. 4, p. 701-713, Aug. 2004.

ALWANI, M. M. *et al.* A Systematic Review of Sellar and Parasellar Brown Tumors: An Analysis of Clinical, Diagnostic, and Management Profiles. **World Neurosurg**. New York, v. 132, p. e423-e429, Aug. 2019.

AMARAL, F. R. *et al.* Quantitative Expression Analysis of Apoptotic/Antiapoptotic Genes and Association With Immunolocalization of BAX and BCL-2 in Peripheral and Central Giant Cell Lesions of the Jaws. **Tumour Biol**. Tokyo, v. 32, n. 5, p. 997-1003, Oct. 2011.

ANGLESIO, M. S. *et al.* Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. **N Engl J Med**. Boston, v. 376, n. 19, p. 1835-1848, May. 2017.

ASAGIRI, M.; TAKAYANAGI, H. The molecular understanding of osteoclast differentiation. **Bone**. New York, v. 40, n. 2, p. 251-264, Feb. 2007.

ASLAN, S. *et al.* Parathyroid adenoma presenting with multiple Brown tumors in an adolescent patient. **North Clin Istanb**. Istanbul, v. 5, n. 4, p. 361-364, Aug. 2018.

BABINA, I. S.; TURNER, N. C. Advances and challenges in targeting FGFR signaling in cancer. **Nat Rev Cancer**. London, v. 17, n. 5, p. 318-332, May. 2017.

BANDEIRA, F. *et al.* From Mild to Severe Primary Hyperparathyroidism: The Brazilian Experience. **Arq Bras Endocrinol Metabol**. Rio de Janeiro, v. 50, n. 4, p. 657-663, Aug. 2006.

BARACALDO R. M. *et al.* Facial Disfigurement Due to Osteitis Fibrosa Cystica or Brown Tumor From Secondary Hyperparathyroidism in Patients on Dialysis: A Systematic Review and an Illustrative Case Report. **Hemodial Int**. Milton, v. 19, n. 4, p. 583-592, Oct. 2015.

BAUMHOER, D. *et al.* Activating mutations in the MAP-kinase pathway define non-ossifying fibroma of bone. **J Pathol**. London, v. 248, n. 1, p. 116-122, May. 2019.

BEHJATI, S. *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. **Nat Genet.** New York, v. 45, n. 12, p. 1479-1482, Dec. 2013.

BEREKET, A. *et al.* Brown tumour as a complication of secondary hyperparathyroidism in severe long-lasting vitamin D deficiency rickets. **Eur J Pediatr.** Berlin, v. 159, n.1-2, p. 70-73, Jan/Feb. 2000.

BILEZIKIAN, J. P. *et al.* Hyperparathyroidism. **Lancet.** London, v. 391, n. 10116, p. 168-178, Jan. 2018.

BILEZIKIAN, J. P. *et al.* Primary Hyperparathyroidism: New Concepts in Clinical, Densitometric and Biochemical Features. **J Intern Med.** Oxford, v. 257, n. 1, p. 6-17, Jan. 2005.

BORBA, V. Z. C.; MAÑAS, N. C. P.; MOREIRA, C. A. Deficiência de vitamina D/Por que, quando e como tratar? In: VILAR, L. **Endocrinologia clínica.** 6ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. Cap. 89.

BOS, J. L. From Ras to Rap and Back, a Journey of 35 Years. **Cold Spring Harb Perspect Med.** Woodbury, v. 8, n. 2, pii: a031468, Feb. 2018.

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

BOYLE, W. J.; SIMONET, W. S.; LACEY, D. L. Osteoclast differentiation and activation. **Nature.** London, v. 423, n. 6937, p. 337-342, May. 2003.

BRAIN, H. P.; SHARMA, A. K.; NUSSEY, S. S. Hypothesis: the case for quaternary hyperparathyroidism. **Med Hypotheses.** Penrith, v. 62, n. 5, p. 701-703. 2004.

BRUBAKER, D. K. *et al.* Proteogenomic Network Analysis of Context-Specific KRAS Signaling in Mouse-to-Human Cross-Species Translation. **Cell Syst.** Cambridge, v. 9, n. 3, p. 258-270, Sept. 2019.

BUROTTO, M. *et al.* The MAPK pathway across different malignancies: a new perspective. **Cancer.** New York, v. 120, n. 22, p. 3446-3456, Nov. 2014.

CHIOSEA, S. I. *et al.* KRAS mutant allele-specific imbalance in lung adenocarcinoma. **Mod Pathol**. Baltimore, v. 24, n. 12, p. 1571-1577, Dec. 2011.

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

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

COURA, B. P. *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. **Mod Pathol**. Baltimore, v. 32, n. 6, p. 799-806, June. 2019.

COWAN, R. W.; SINGH, G. Giant cell tumor of bone: a basic science perspective. **Bone**. New York, v. 52, n. 1, p. 238-246, Jan. 2013.

DANIELS, J. S. Primary hyperparathyroidism presenting as a palatal brown tumor. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. St. Louis, v. 98, n. 4, p. 409-413, Oct. 2004.

DE CREA, C. *et al.* Are Brown Tumours a Forgotten Disease in Developed Countries? **Acta Otorhinolaryngol Ital**. Pisa, v. 32, n. 6, p. 410-415, Dec. 2012.

DE LUCA, A. *et al.* The RAS/RAF/ MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Expert Opin Ther Targets**. London, v. 16, n. 2, p. S17-S27, Apr. 2012.

DHILLON, A. S. *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**. Basingstoke, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, May. 2007.

DIENSTMANN, R. *et al.* Genomic aberrations in the FGFR pathway: opportunities for targeted therapies in solid tumor. **Ann Oncol**. Dordrecht, v. 25, n. 3, p. 552-563, Mar. 2014.

DOS SANTOS, B. *et al.* Brown tumor of the jaws as a manifestation of tertiary hyperparathyroidism: A literature review and case report. **Spec Care Dentist**. Chicago, v. 38, n. 3, p. 163-171, May. 2018.

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

EL-MOFTY, S. K. Bone Lesions. In: GNEPP, D. R. **Diagnostic Surgical Pathology of the head and neck.** 2 ed. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2009. p. 774.

EREM, C. *et al.* Sphenoid sinus brown tumor, a mass lesion of occipital bone and hypercalcemia: an unusual presentation of primary hyperparathyroidism. **J Endocrinol Invest.** Milano, v. 27, n. 4, p. 366-369, Apr. 2004.

ERNST, L. M.; QUINN, P. D.; ALAWI, F. Novel oral findings in Schimmelpenning syndrome. **Am J Med Genet A.** Hoboken, v.143A, n. 8, p. 881-883, Apr. 2007.

EUFRAZINO, C.; VERAS, A.; BANDEIRA, F. Epidemiology of Primary Hyperparathyroidism and Its Non-classical Manifestations in the City of Recife, Brazil. **Clin Med Insights Endocrinol Diabetes.** Auckland, v. 6, p. 69-74, Dec. 2013.

FARROW, E. G. *et al.* Extended Mutational Analyses of FGFR1 in Osteoglophonic Dysplasia. **Am J Med Genet A.** Hoboken, v. 140, n. 5, p. 537-539, March. 2006.

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

FONSECA, F. P. *et al.* Prognostic importance of FGF2 and FGFR1 expression for patients affected by ameloblastoma. **J Oral Pathol Med.** Copenhagen, v. 47, n. 4, p. 417-424, Apr. 2018.

FRASER W. D. Hyperparathyroidism. **Lancet.** London, v. 374, n. 9684, p. 145-158, July. 2009.

FRIEDRICH, R. E. *et al.* Recurrent multilocular mandibular giant cell granuloma in neurofibromatosis type 1: Evidence for second hit mutation of NF1 gene in the jaw lesion and treatment with curettage and bone substitute materials. **J Craniomaxillofac Surg.** New York, v. 44, n. 8, p. 1054-1060, Aug. 2016.

FUSI, C. *et al.* Transient receptor potential vanilloid 4 (TRPV4) is downregulated in keratinocytes in human non-melanoma skin cancer. **J Invest Dermatol.** Baltimore, v. 134, n. 9, p. 2408-2417, Sept. 2014

GUIMARÃES, A. L. S. *et al.* Peripheral brown tumour of hyperparathyroidism in the oral cavity. **Oral oncol extra**. v. 42, p. 91-93, Sept. 2006.

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

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

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

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

GONG, S. G. Isoforms of receptors of fibroblast growth factors. **J Cell Physiol**. Philadelphia, v. 229, n. 12, p. 1887-1895, Dec. 2014.

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

HARTMAN, D. J. *et al.* Mutant allele-specific imbalance modulates prognostic impact of KRAS mutations in colorectal adenocarcinoma and is associated with worse overall survival. **Int J Cancer**. Genève, v. 131, n. 8, p. 1810-1817, Oct. 2012.

HIRSHBERG, A. *et al.* Peripheral giant cell granuloma associated with dental implants. **J Periodontol**. Chicago, v. 74, n. 9, p. 1381-1384, Sept. 2003.

HUANG, J. C. *et al.* PTH differentially regulates expression of RANKL and OPG. **J Bone Miner Res**. New York, v. 19, n. 2, p. 235-244, Feb. 2004.

ITOH, N.; ORNITZ, D. M. Fibroblast growth factors: from molecular evolution to roles in development, metabolism and disease. **J. Biochem**. Tokyo, v. 149, n. 2, p. 121–130, Feb. 2011.

JHA, V. *et al.* Chronic kidney disease: global dimension and perspectives. **Lancet**. London, v. 382, n. 9888, p. 260-272, July. 2013.

JOHNSON, C. W. *et al.* Isoform-Specific Destabilization of the Active Site Reveals a Molecular Mechanism of Intrinsic Activation of KRas G13D. **Cell Rep**. Cambridge, v. 28, n. 6, p. 1538-1550, Aug. 2019.

JUNQUEIRA, L. C. U.; CARNEIRO, J. **Histologia básica: Texto e Atlas**. 13. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2017. 554 p.

KANAAN, I. *et al.* Sphenoid sinus brown tumor of secondary hyperparathyroidism: case report. **Neurosurgery**. Baltimore, v. 42, n. 6, p. 1374-1377, June. 1998.

KAR, D. K. *et al.* Brown tumor of the palate and mandible in association with primary hyperparathyroidism. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 59, n. 11, p. 1352-1354, Nov. 2001.

KRASINSKAS, A. M. *et al.* KRAS mutant allele-specific imbalance is associated with worse prognosis in pancreatic cancer and progression to undifferentiated carcinoma of the pancreas. **Mod Pathol**. Baltimore, v. 26, n.10, p. 1346-1354, Oct. 2013.

KARNOUB, A. E.; WEINBERG, R. A. Ras oncogenes: split personalities. **Nat Rev Mol Cell Biol**. London, v. 9, n. 7, p. 517-531, July. 2008.

KHEDR, A. Skeletal Manifestations of Hyperparathyroidism. In: KORHAN, O. **Anatomy, Posture, Prevalence, Pain, Treatment and Interventions of Musculoskeletal Disorders**. IntechOpen, 2018. p. 87-106.

KNEZEVIĆ, G. *et al.* Primary hyperparathyroidism: evaluation of different treatments of jaw lesions based on case reports. **Br J Oral Maxillofac Surg**. Edinburgh, v. 29, n. 3, p. 185-188, June. 1991.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. **Cell Mol Life Sci**. Basel, v.65, n. 22, p. 3525-3544, Nov. 2008.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; ASTER, J. C. **Robbins patologia básica**. 10. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2018. 952p.



KUZNETSOV, S. A. *et al.* Age-dependent demise of GNAS-mutated skeletal stem cells and "normalization" of fibrous dysplasia of bone. **J Bone Miner Res.** New York, v. 23, n. 11, p. 1731-1740, Nov. 2008.

LAC, V. *et al.* Oncogenic mutations in histologically normal endometrium: the new normal? **J Pathol.** London, v. 249, n. 2, p. 173-181, Oct. 2019.

LACERDA, J. C. T. *et al.* Osteodystrophy and brown tumour causing localized jaw enlargement. **Oral Surg.** Oxford, v. 1, n. 3, p. 149-152, Aug. 2008.

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

LEE, K. *et al.* Roles of Mitogen-Activated Protein Kinases in Osteoclast Biology. **Int J Mol Sci.** Basel, v. 19, n. 10, p. 1-20, Oct. 2018.

LEE, W. H. *et al.* TRPV4 Regulates Breast Cancer Cell Extravasation, Stiffness and Actin Cortex. **Sci Rep.** London, v. 6, p. 1-16, June. 2016.

LEHEN'KYI, V.; PREVARSKAYA, N. Oncogenic TRP channels. **Adv Exp Med Biol.** New York, v. 704, p. 929-945. 2011.

LESTER, S. R. *et al.* Peripheral Giant Cell Granulomas: A Series of 279 Cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.** New York, v. 118, n. 4, p. 475-482. 2014.

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

MAH, W. *et al.* Gain-of-function mutation in TRPV4 identified in patients with osteonecrosis of the femoral head. **J Med Genet.** London, v. 53, n. 10, p. 705-709, Oct. 2016.

MANKUZHY, N. P. *et al.* KRAS mutant tenosynovial giant cell tumor in a pediatric patient: a case report. **Transl Pediatr.** Hong Kong, v. 8, n. 5, p. 449-454, Dec. 2019.

MARCOCCI, C. *et al.* Parathyroid carcinoma. **J Bone Miner Res.** New York, v. 23, n. 12, p. 1869-1880, Dec. 2008.

MARIZ, B. A. *et al.* Expression of FGF-2/FGFR-1 in normal mucosa, salivary gland, preneoplastic, and neoplastic lesions of the oral cavity. **J Oral Pathol Med.** Copenhagen, v. 47, n. 9, p.816-822, Oct. 2018.

MARTINS-CHAVES, R. R. *et al.* KRAS mutations in implant-associated peripheral giant cell granuloma. **Oral Dis.** Houndmills, v. 26, n. 2, p. 334-340, Mar. 2020.

MASUYAMA, R. *et al.* TRPV4-mediated calcium influx regulates terminal differentiation of osteoclasts. **Cell Metab.** Cambridge, v. 8, n. 3, p. 257-265, Sept. 2008.

MISIOROWSKI, W. *et al.* Osteitis Fibrosa Cystica-A Forgotten Radiological Feature of Primary Hyperparathyroidism. **Endocrine.** Houndsmills, v. 58, n. 2, p. 380-385, Nov. 2017.

MOHAN, M. *et al.* An unusual case of brown tumor of hyperparathyroidism associated with ectopic parathyroid adenoma. **Eur J Dent.** Ankara, v. 7, n. 4, p. 500-503, Oct. 2013.

MORI, H. *et al.* A case of multiple brown tumors with primary hyperparathyroidism. **J Bone Miner Metab.** Tokyo, v. 31, n. 1, p. 123-127, Jan. 2013.

NEUMANN, T. E. *et al.* Multiple giant cell lesions in patients with Noonan syndrome and cardio-facio-cutaneous syndrome. **Eur J Hum Genet.** New York, v. 17, n. 4, p. 420-425, Apr. 2009.

NIKOLAEV, S. I.; FISH, J. E.; RADOVANOVIC, I. Somatic Activating KRAS Mutations in Arteriovenous Malformations of the Brain. **N Engl J Med.** Boston, v. 378, n. 16, p. 1561-1562, Apr. 2018.

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

OHE, M. N. *et al.* Changes in Clinical and Laboratory Findings at the Time of Diagnosis of Primary Hyperparathyroidism in a University Hospital in São Paulo From 1985 to 2002. **Braz J Med Biol Res.** São Paulo, v. 38, n. 9, p. 1383-1387, Sept. 2005.

OKADA, H.; DAVIES, J. E.; YAMAMOTO, H. Brown tumor of the maxilla in a patient with secondary hyperparathyroidism: a case study involving immunohistochemistry

and electron microscopy. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 58, n. 2, p. 233-238, Feb. 2000.

OLEA-FLORES, M. *et al*. Extracellular-Signal Regulated Kinase: A Central Molecule Driving Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer. **Int J Mol Sci**. Basel, v. 20, n. 12, p. 1-32, June. 2019.

OLIVAN-VIGUERA, A. *et al*. Pharmacological activation of TRPV4 produces immediate cell damage and induction of apoptosis in human melanoma cells and HaCaT keratinocytes. **PLoS One**. San Francisco, v. 13, n. 1, p.e0190307, Jan. 2018.

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

PALLA, B. *et al*. Systematic review of oral manifestations related to hyperparathyroidism. **Clin Oral Investig**. Berlin, v. 22, n. 1, p. 1-27, Jan. 2018.

PARK, Y. R. *et al*. Data-driven Analysis of TRP Channels in Cancer: Linking Variation in Gene Expression to Clinical Significance. **Cancer Genomics Proteomics**. Kapandriti, v. 13, n. 1, p. 83-90, Jan/Feb. 2016.

PEACOCK, J. D. *et al*. Oculoectodermal syndrome is a mosaic RASopathy associated with KRAS alterations. **Am J Med Genet A**. Hoboken, v. 167, n. 7, p. 1429-1435, July. 2015.

PINTO, L. P. *et al*. Highly Aggressive Brown Tumor in the Jaw Associated with Tertiary Hyperparathyroidism. **Pediatr Dent**. Chicago, v. 28, n. 6, p. 543-546, Nov/Dec. 2006

PONTES, F. S. C. *et al*. Oral and maxillofacial manifestations of chronic kidney disease-mineral and bone disorder: a multicenter retrospective study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. New York, v. 125, n. 1, p. 31-43, Jan. 2018.

POULIN, E. J. *et al*. Tissue-Specific Oncogenic Activity of KRAS<sup>A146T</sup>. **Cancer Discov**. Philadelphia, v. 9, n. 6, p. 738-755, June. 2019.

QAISI, M. *et al*. Mandibular Brown Tumor of Secondary Hyperparathyroidism Requiring Extensive Resection: A Forgotten Entity in the Developed World?. **Case Rep Med**. New York, v. 2015, p. 2-10, Aug. 2015

RAUBENHEIMER, E.; JORDAN, R. C. Central Giant Cell Granuloma. In: EI-NAGGAR, A. K.; CHAN, J. K.; GRANDIS, J. R.; TAKATA, T.; SLOOTWEG, P.J. **World Health Organization classification of tumours. Pathology & Genetics. Head and neck tumours**. Lyon: IARC Press, 2017. p. 256-257.

RIVERA, B. *et al.* Germline and somatic FGFR1 abnormalities in dysembryoplastic neuroepithelial tumors. **Acta Neuropathol**. Berlim, v. 131, n. 6, p. 847-863, June. 2016.

SCHINI, M. *et al.* Normocalcemic Hyperparathyroidism: Study of Its Prevalence and Natural History. **J Clin Endocrinol Metab**. Springfield, v. 105, n. 4, p. dgaa084, Apr. 2020.

SALTI, G. I. *et al.* Continuing evolution in the operative management of primary hyperparathyroidism. **Arch Surg**. Chicago, v. 127, n. 7, p. 831-836, July. 1992.

SASAKI, E. *et al.* Frequent KRAS and HRAS mutations in squamous cell papillomas of the head and neck. **J Pathol Clin Res**. Oxford, v. 6, n. 2, p. 154-159, Apr. 2020.

SELVI, F. *et al.* Brown tumour of the maxilla and mandible: a rare complication of tertiary hyperparathyroidism. **Dentomaxillofac Radiol**. Erlangen, v. 38, n. 1, p. 53-58, Jan. 2009.

SHAUL, Y. D.; SEGER, R. The MEK/ERK cascade: from signaling specificity to diverse functions. **Biochim Biophys Acta**. Amsterdam, v. 1773, n. 8, p. 1213-1226, Aug. 2007.

SILVA, B. C.; BILEZIKIAN, J. P. Parathyroid hormone: anabolic and catabolic actions on the skeleton. **Curr Opin Pharmacol**. Oxford, v. 22, p. 41-50, June. 2015.

SILVERMAN, S. JR.; WARE, W. H.; GILLOOLY, C. JR. Dental aspects of hyperparathyroidism. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. St. Louis, v. 26, n. 2, p. 184-189, Aug. 1968.

SMITH, A. C.; BRADLEY, J. C. Non-surgical Management of Hyperparathyroidism of the Jaws. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 45, n. 2, p. 176-181, Feb. 1987.

SONKUSARE, S. K. *et al.* Elementary Ca<sup>2+</sup> signals through endothelial TRPV4 channels regulate vascular function. **Science**. New York, v. 336, n. 6081, p. 597-601, May. 2012.

SOW, A. J. *et al.* Osteoglophonic Dysplasia: A 'Common' Mutation in a Rare Disease. **Clin Genet.** Copenhagen, v. 78, n. 2, p. 197-198, Aug. 2010.

STAGNER, A. M. *et al.* Giant Cell Lesions of the Maxillofacial Skeleton Express RANKL by RNA In Situ Hybridization Regardless of Histologic Pattern. **Am J Surg Pathol.** New York, v. 43, n. 6, p. 819-826, June. 2019.

STEWART, D. R. *et al.* Jaffe-Campanacci syndrome, revisited: detailed clinical and molecular analyses determine whether patients have neurofibromatosis type 1, coincidental manifestations, or a distinct disorder. **Genet Med.** Baltimore, v. 16, n. 6, p. 448-459, June. 2014.

SUAREZ-CUNQUEIRO, M. M. *et al.* Brown tumor of the mandible as first manifestation of atypical parathyroid adenoma. **J Oral Maxillofac Surg.** Philadelphia, v. 62, n. 8, p. 1024-1028, Aug. 2004.

SUKOV, W. R. *et al.* Frequency of USP6 rearrangements in myositis ossificans, brown tumor, and cherubism: molecular cytogenetic evidence that a subset of "myositis ossificans-like lesions" are the early phases in the formation of soft-tissue aneurysmal bone cyst. **Skeletal Radiol.** Berlin, v. 37, n. 4, p. 321-327, Apr. 2008.

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

WANG, H. *et al.* EGFR and KRAS mutations in Chinese patients with sinonasal inverted papilloma and oncocytic papilloma. **Histopathology.** Oxford, v. 75, n. 2, p. 274-281, Aug. 2019.

WESTRA, W. H. *et al.* K-ras oncogene mutations in osteoclast-like giant cell tumors of the pancreas and liver: genetic evidence to support origin from the duct epithelium. **Am J Surg Pathol.** New York, v. 22, n. 10, p. 1247-1254, Oct. 1998.

WHITE, K. E. *et al.* Mutations that cause osteoglophonic dysplasia define novel roles for FGFR1 in bone elongation. **Am J Hum Genet.** Baltimore, v. 76, n. 2, p. 361-367, Feb. 2005.

WHITWAM, T. *et al.* Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. **Oncogene.** Basingstoke, v. 26, n. 31, p. 4563-4570, July. 2007.

WICK M.R.; MCDERMOTT M. B.; SWANSON P. E. Proliferative, Reparative, and Reactive Benign Bone Lesions That May Be Confused Diagnostically With True Osseous Neoplasms. **Semin Diagn Pathol**. Orlando, v. 31, n. 1, p. 66-88, Jan. 2014.

YAMAZAKI, H. *et al*. Brown tumor of the maxilla and mandible: progressive mandibular brown tumor after removal of parathyroid adenoma. **J Oral Maxillofac Surg**. Philadelphia, v. 61, n. 6, p. 719-722, June. 2003.

YOON, S.; SEGER, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. **Growth Factors**. New York, v. 24, n. 1, p. 21-44, Mar. 2006.

ZHANG, H. Multiple Brown Tumors A Diagnostic Dilemma. **The Endocrinologist**. v. 20, n. 4, p. 152-154, Aug. 2010.

ZHOU, B.; DER, C. J.; COX, A. D. The role of wild type RAS isoforms in cancer. **Semin Cell Dev Biol**. London, v. 58, p. 60-69, Oct. 2016.

## APÊNDICE A – Artigo científico aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine*

Accepted: 9 April 2020

DOI: 10.1111/jop.13048

ORIGINAL ARTICLE

Journal of Oral Pathology & Medicine 

### KRAS mutations in brown tumor of the jaws in hyperparathyroidism

Letícia Martins Guimarães<sup>1</sup> | Isadora Pereira Gomes<sup>1</sup> | Thaís dos Santos Fontes Pereira<sup>1</sup> | Bruno Augusto Benevenuto de Andrade<sup>2</sup> | Mário José Romãnach<sup>2</sup> | Júlio César Tanos de Lacerda<sup>3</sup> | Hélder Antônio Rebelo Pontes<sup>4</sup> | Peter A. Brennan<sup>5</sup> | Siavash Rahimi<sup>6,7</sup> | Román Carlos<sup>8</sup> | Adalberto Mosqueda-Taylor<sup>9</sup> | Ronell Bologna-Molina<sup>10</sup> | Fabrício Passador-Santos<sup>11</sup> | Ricardo Santiago Gomez<sup>1</sup> | Carolina Cavaliéri Gomes<sup>12</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 Oral Diagnosis and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, RJ, Brazil

<sup>3</sup>Stomatology Service of Hospital Odilon Behrens, Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup>Service of Oral Pathology, Hospital Universitário João de Barros Barreto, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil

<sup>5</sup>Department of Oral and Maxillofacial Surgery, Queen Alexandra Hospital, Portsmouth, UK

<sup>6</sup>School of Pharmacy and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth, UK

<sup>7</sup>Frontier Pathology-Royal Sussex County Hospital, Brighton, UK

<sup>8</sup>Centro Clínico de Cabeza y Cuello, Guatemala City, Guatemala

<sup>9</sup>Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana, Xochimilco, Mexico

<sup>10</sup>Molecular Pathology Area, School of Dentistry, Universidad de la República (UDELAR), Montevideo, Uruguay

<sup>11</sup>Oral Pathology, São Leopoldo Mandic Institute and Research Center, Campinas, Brazil

<sup>12</sup>Department of Pathology, Institute of Biological Science, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

#### Correspondence

Carolina Cavaliéri Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG CEP: 31270-901, Brazil.  
Email: carolinacgomes@ufmg.br; gomes.carolinac@gmail.com

#### Funding information

Coordination for the Improvement of Higher Level Education Personnel (CAPES)/Brazil; Grant/Award Number: 001; National Council of Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil; Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil

#### Abstract

**Background:** Brown tumors are giant cell-rich lesions that result from abnormal bone metabolism in hyperparathyroidism, one of the most common endocrine disorders worldwide. Brown tumors occasionally affect the jaws and, despite well-known clinical and microscopic features, their molecular pathogenesis remains unclear. We investigated the presence of pathogenic activating mutations in *TRPV4*, *FGFR1*, and *KRAS* in a cohort of brown tumors since these have recently been reported in giant-cell lesions of the jaws and non-ossifying fibromas of the bones (*FGFR1* and *KRAS*), which are histologic mimics of brown tumors.

**Methods:** We target sequenced 13 brown tumors of the jaws associated with primary or secondary hyperparathyroidism. As mutations in these genes are known to activate the MAPK/ERK signaling pathway, we also assessed the immunostaining of the phosphorylated form of ERK1/2 (pERK1/2) in these lesions.

**Results:** *KRAS* pathogenic mutations were detected in seven cases (p.G12V n = 4, p.G12D n = 1, p.G13D n = 1, p.A146T n = 1). *KRAS* variants of unknown significance

© 2020 John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

*J Oral Pathol Med.* 2020;00:1–7.

wileyonlinelibrary.com/journal/jop | 1

## ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação pelo COEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** AVALIAÇÃO MOLECULAR DO TUMOR MARROM DO HIPERPARATIREOIDISMO E DO QUERUBISMO

**Pesquisador:** Carolina Cavalleri Gomes

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 11451619.6.0000.5149

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

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.386.644

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo transversal retrospectivo cuja população é composta por indivíduos com o diagnóstico histopatológico de tumor marrom do hiperparatireoidismo e querubismo que tem como objetivo investigar a presença ou ausência de mutações nos genes KRAS, TRPV4 e FGFR1 em tumor marrom do hiperparatireoidismo e querubismo. Serão obtidas amostras de lesões de tumor marrom do hiperparatireoidismo e querubismo fixadas em formol e incluídas em parafina do arquivo do Serviço de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FOUFMG). Caso essas lesões sejam diagnosticadas em pacientes da clínica de Patologia e Estomatologia da FOUFG no decorrer do estudo, as amostras serão coletadas e incluídas no mesmo, mediante assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelos pacientes. O material biológico será utilizado para análises moleculares/genéticas.

#### Objetivo da Pesquisa:

Segundo a pesquisadora:

**\*Objetivo Primário:**

Avaliar alterações moleculares em tumor marrom do hiperparatireoidismo e querubismo

**Objetivo Secundário:**

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad 31200-5  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE

E-mail: coep@prpq.ufmg.br



Continuação do Parecer: 3.386.644

Investigar a presença ou ausência das mutações previamente descritas em lesões de células gigantes dos maxilares em amostras de tumor marrom do hiperparatireoidismo. Investigar presença ou ausência de mutações hotspot no gene SH3BP2 em amostras de querubismo. Investigar a presença ou ausência das mutações previamente descritas em lesões de células gigantes dos maxilares em amostras de querubismo que não tenham mutações hotspot em SH3BP2.\*

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo a pesquisadora:

\*Riscos:

Este estudo não acarretará riscos adicionais aos participantes visto que as amostras utilizadas serão obtidas através do procedimento cirúrgico indicado e necessário para o diagnóstico e tratamento do tumor marrom do hiperparatireoidismo e do querubismo. Os dados clínicos e a identidade do paciente serão incondicionalmente preservados, evitando a perda do anonimato e sigilo.

Benefícios:

A análise dos resultados permitirá conclusões que podem auxiliar no entendimento da patogênese das lesões, permitindo a realização de diagnósticos mais precisos e estabelecimento de tratamentos mais adequados.\*

Os riscos e benefícios estão descritos nos TALEs e TCLEs

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante para a área, conforme parecer aprovado em assembleia departamental.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram apresentados os seguintes documentos:

- Informações básicas do projeto
- Parecer aprovado em assembleia departamental
- Projeto completo
- Autorização do laboratório de patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG para acesso aos materiais
- Folha de rosto devidamente preenchida e assinada
- TCLEs para adultos, TALEs para menores e TCLEs para pais dos menores
- TCUD e dispensa de TCLE, qdo não for possível obtenção do TCLE ou TALE (material arquivado)
- Termo de constituição de biorrepositório (para tecidos coletados durante a pesquisa).

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Cx 2005

Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901

UF: MG Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

Continuação do Parecer: 3.386.644

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Por atender aos preceitos éticos, SMJ, sou favorável à aprovação do projeto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, Informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1294634.pdf	27/05/2019 15:55:09		Acelto
Outros	Carta_Resposta.pdf	27/05/2019 15:53:50	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_destinado aos pais de menores de idade_tecido_fresco.pdf	27/05/2019 15:51:27	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_destinado aos pais de menores de idade_bloco_de_parafina.pdf	27/05/2019 15:51:03	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_doc_anexado.pdf	27/05/2019 15:49:03	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	TCUD_anexado.pdf	27/05/2019 15:47:21	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Justificativa_nao_TCLE_bloco_de_parafina.pdf	27/05/2019 15:44:12	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 3.386.644

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_tecido_fresco_paginado.pdf	27/05/2019 15:40:44	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_bloco_de_parafina_paginado.pdf	27/05/2019 15:40:23	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	termo_biorepositorio.pdf	27/05/2019 15:37:16	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
Parecer Anterior	Parecer_PDF_Leticia_correto.pdf	01/04/2019 09:38:10	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_correta.pdf	28/03/2019 12:09:19	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_leticia.pdf	21/02/2019 11:27:14	Carolina Cavalleri Gomes	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 12 de Junho de 2019

Assinado por:  
Ellane Cristina de Freitas Rocha  
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad. Sl 2005  
Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br