

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

**Análise molecular das alterações associadas às mutações
nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* em lesões de células
gigantes dos maxilares**

JÉSSICA GARDONE VITÓRIO

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Coorientadora: Dr^a Thaís dos Santos Fontes Pereira

BELO HORIZONTE

2021

JÉSSICA GARDONE VITÓRIO

Análise molecular das alterações associadas às mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* em lesões de células gigantes dos maxilares

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de doutor pelo programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Coorientadora: Dr^a Thais Santos Fontes Pereira

BELO HORIZONTE

2021

V845a Vitorio, Jessica Gardone.
Análise molecular das alterações associadas às mutações nos genes TRPV4, KRAS e FGFR1 em lesões de células gigantes dos maxilares [manuscrito]. / Jessica Gardone Vitorio. -- Belo Horizonte: 2021.
119f.: il.
Orientador (a): Ricardo Santiago Gomez.
Coorientador (a): Thais Santos Fontes Pereira.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Granuloma de Células Gigantes. 2. Proteômica. 3. Metabolômica. 4. Genes ras. 5. Receptor Tipo 1 de Fator de Crescimento de Fibroblastos. 6. Dissertação Acadêmica. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Pereira, Thais Santos Fontes. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QU 477



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE MOLECULAR DAS ALTERAÇÕES ASSOCIADAS ÀS MUTAÇÕES NOS GENES TRPV4, KRAS E FGFR1 EM LESÕES DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES

JÉSSICA GARDONE VITÓRIO

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia doze de novembro de dois mil vinte e um, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelos seguintes professores doutores:

Ricardo Santiago Gomez - Orientador
UFMG

Thais dos Santos Fontes Pereira - Coordenadora
Prática privada

Felipe Paiva Fonseca
UFMG

Sílvia Ferreira de Sousa
UFMG

Sara Ferreira dos Santos Costa
UNIFAL/MG

Elisa Carvalho de Siqueira
Centro Universitário UNA

Belo Horizonte, 12 de novembro de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Ferreira de Sousa**, Professora do Magistério Superior, em 16/11/2021, às 09:51, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ricardo Santiago Gomez**, Professor do Magistério Superior, em 16/11/2021, às 11:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sara Ferreira dos Santos Costa**, Usuário Externo, em 16/11/2021, às 11:05, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Paiva Fonseca**, Coordenador(a), em 16/11/2021, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Elisa Carvalho de Siqueira**, Usuária Externa, em 17/11/2021, às 09:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Thais dos Santos Fontes Pereira**, Usuária Externa, em 17/11/2021, às 19:06, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **1074699** e o código CRC **314CBE66**.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Aparecida.

À minha mãe e avó que me apoiaram incondicionalmente durante toda minha caminhada e por todas as vezes que me encorajaram a seguir. E dedico esse trabalho a memória de meu avô, maior incentivador e exemplo de vida. À minha família e amigos pelo apoio, amor e atenção durante todos esses anos.

Ao meu namorado e amigo, Guilherme, por toda paciência nos momentos de ansiedade e por todo encorajamento durante minha caminhada acadêmica.

Ao meu grande amigo Filipe Andrade, por todo apoio em todas as etapas do trabalho e pelos nossos maravilhosos anos de convivência.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez, pela confiança em mim depositada e todos os ensinamentos.

À minha coorientadora Dra. Thais Fontes dos Santos Pereira, pela paciência em todos os momentos, pela enorme ajuda nos procedimentos e por sua contribuição neste trabalho.

Aos membros da banca, prof^a Vanessa de Fátima Bernardes, prof^a Sílvia Ferreira de Sousa, prof^a Sara Ferreira dos Santos Costa, prof^a Elisa Carvalho de Siqueira, prof Felipe Paiva Fonseca e prof Fabrício Rezende do Amaral, por aceitarem participar da banca de defesa de doutorado, e pela enorme contribuição.

Ao laboratório de análise de água do Departamento de Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA) da UFMG sob supervisão da prof^a Liséte Celina Lange e prof^a Lucilaine Valéria de Souza Santos pela infraestrutura e suporte prestados na execução das análises metabômicas. Agradecimento especial aos mestres Yuri Abner e Victor por todo auxílio no manuseio do instrumento.

Ao laboratório de proteômica na *University of Southern Denmark*, e ao pesquisador Martin Røssel Larsen pela infraestrutura necessária para a realização das análises proteômicas.

Agradeço especialmente à Dr^a Marcella Nunes de Mello Braga pela imensurável contribuição nas análises proteômicas, e as nossas parceiras prof^a Gisele André Canuto e prof^a Adriana Macedo pelo desenvolvimento dos protocolos e auxílio nas análises metabolômicas.

Aos meus colegas da Patologia Molecular, pelo bom convívio ao longo desse tempo e por todos os auxílios prestados.

Ao Prof. Dr. Luiz Armando de Marco e ao Programa de Medicina Molecular, por toda assistência ao longo do meu doutorado.

À agência de fomento CNPq, pela minha atual bolsa de doutorado. E a CAPES pelo financiamento do projeto.

RESUMO

As lesões de células gigantes são lesões benignas que acometem os maxilares, microscopicamente constituídas por células gigantes multinucleadas e células mononucleadas ovóides e/ou fusiformes. Recentemente, mutações somáticas foram identificadas nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1*, com consequente ativação da via de sinalização celular MAPK/ERK em lesões centrais e periféricas de células gigantes. Apesar de avanços no campo molecular, as alterações relacionadas às mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* ainda não foram esclarecidas no contexto da lesão. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar as alterações moleculares associadas às mutações nos genes *FGFR1*, *KRAS* e *TRPV4*. Amostras parafinizadas de lesões de células gigantes, tanto centrais quanto periféricas, foram utilizadas em análises metabolômicas, proteômicas e fosfoproteômicas. Dentre elas, 5 espécimes apresentavam mutação no gene *FGFR1*, 6 em *KRAS*, 5 em *TRPV4* e 4 não apresentavam mutações em nenhum dos três genes, totalizando 21 amostras. Os protocolos das análises ômicas foram devidamente padronizados para tecidos parafinizados e demonstraram a viabilidade dessas amostras para estudos de biomoléculas. Os resultados indicaram relativa semelhança entre os grupos de diferentes status mutacional, demonstrada nos níveis metabólico, proteico e de fosfopeptídeos. Vias metabólicas relacionadas a apoptose, sinalização celular, expressão gênica, diferenciação celular e atividade eritrocítica apresentaram alterações em todos os grupos. As amostras mutadas em *KRAS* e *FGFR1* apresentam perfis proteômico e metabolômico semelhantes. Considerando o grupo que apresentava mutações em *TRPV4*, houve maior número de vias alteradas associadas à arquitetura tecidual, enquanto, no grupo sem mutações, as vias alteradas eram predominantemente relacionadas ao metabolismo de proteínas. Poucas diferenças foram observadas entre os grupos, sugerindo uma semelhança metabólica relacionada ao status mutacional, demonstrado em nível de proteína, fosfopeptídeos e metabólitos.

Palavras-chaves: Lesões de células gigantes. Proteômica. Fosfoproteômica. Tecido parafinizado. Metabolômica. *KRAS*. *FGFR1*. *TRPV4*.

ABSTRACT

Giant cell lesions are benign lesions that affect the jaws, microscopically constituted by multinucleated giant cells and ovoid and/or spindle-shaped mononuclear cells. Recently, somatic mutations were identified in *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* genes, with consequent activation of the MAPK/ERK cell signalling pathway in central and peripheral giant cell lesions. Despite advances in the molecular field, the pathogenesis of the lesion remains unclear. Therefore, the aim of this study was to evaluate the molecular changes associated with mutations in the *FGFR1*, *KRAS* and *TRPV4* genes. Paraffinized samples of giant cell lesions, both central and peripheral, were used in metabolomic, proteomic e phosphoproteomic analyses. Among them, 5 specimens had mutations in the *FGFR1* gene, 6 in *KRAS*, 5 in *TRPV4* and 4 did not show mutations in any of the three genes, totaling 21 samples. The omic analysis protocols were properly standardized for paraffinized tissues and have demonstrated the viability of these samples for studies of biomolecules. The results indicated relative similarity between the groups with different mutational status, demonstrated in the metabolic, protein and phosphopeptides levels. Metabolic pathways related to apoptosis, cell signalling, gene expression, cell differentiation and erythrocytic activity showed alterations in all groups. The samples mutated in *KRAS* and *FGFR1* have similar proteomic e metabolomic profiles. Considering the group that had mutations in *TRPV4*, there was a greater number of altered pathways associated with tissue architecture, while, in the group without mutations, the altered pathways were predominantly related to protein metabolism. Few differences were observed between groups, suggesting a metabolic similarity related to mutational status, demonstrated in protein, phosphopeptides and metabolites level.

Key words: Giant cell lesions of the jaw. Proteomics. Phosphoproteomics. Metabolomics. Formalin-Fixed Paraffin-Embedded. *KRAS*. *FGFR1*. *TRPV4*.

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Quadro 1	Relação das amostras e as <i>Tags</i> isobáricas utilizadas para a marcação por TMT10plex.....	36
Quadro 2	Padronização do protocolo de extração de metabólitos de tecidos fixados em formalina e embebido em parafina.....	41
Tabela 1	Pacientes incluídos nas análises proteômicas e metabolômicas da lesão de células gigantes.....	33
Tabela 2	Proteínas alteradas entre os grupos KRAS, FGFR1, TRPV4 e WT.....	57
Tabela 3	Fosfopeptídeos que diferem entre os grupos KRAS, FGFR1, TRPV4 e WT.....	70
Tabela 4	Parâmetros da otimização da análise de dados brutos do modo positivo e negativo.....	80
Tabela 5	Metabólitos identificados diferencialmente abundantes entre os grupos KRAS, FGFR1, TRPV4 e WT.....	86

LISTA DE FIGURAS

Figura.1	Lesão periférica de células gigantes dos maxilares.....	18
Figura.2	Imagem radiográfica de lesão central de células gigantes dos maxilares...	18
Figura.3	Aspecto microscópico da lesão de células gigantes dos maxilares.....	19
Figura.4	Análise da qualidade e eficiência da digestão de proteínas por tripsina avaliada por MALDI-TOF.....	51
Figura.5	Espectros dos peptídeos trípticos após a marcação por TMT e combinação em 3 sets de análise.....	52
Figura.6	Cromatogramas das frações do proteoma total e do fosfoproteoma do set 1.....	53
Figura.7	Cromatogramas das frações do proteoma total e do fosfoproteoma do set 2.....	54
Figura.8	Cromatogramas das frações do proteoma total e do fosfoproteoma do set 3.....	54
Figura.9	Localização celular e processos biológicos associados às proteínas identificadas em lesão de células gigantes dos maxilares.....	55
Figura.10	Análise de correlação de Pearson.....	65
Figura.11	Diagramas de Venn das proteínas alteradas entre os grupos FGFR1, KRAS, TRPV4 e WT	66
Figura. 12	Categorização por processos biológicos para as vias enriquecidas em cada grupo.....	67
Figura. 13	Sobreposição dos cromatogramas da padronização dos testes de extração de tecido parafinizado.....	72
Figura.14	Sobreposição dos cromatogramas das melhores condições da padronização dos testes de extração de tecido parafinizado.....	73
Figura.15	Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de detecção de picos dos dados modo positivo da metabolômica de LCG.....	75
Figura.16	Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de correção de tempo de retenção e agrupamento dos dados modo positivo da metabolômica de LCG.....	76
Figura.17	Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de detecção de picos dos dados modo negativo da metabolômica de LCG.....	77
Figura.18	Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de correção de tempo de retenção e agrupamento dos dados modo negativo da metabolômica de LCG.....	78

Figura.19	Sobreposição dos cromatogramas dos controles de qualidade dos dados modo positivo e negativo da metabolômica de lesão de células gigantes.....	81
Figura.20	Avaliação da qualidade do dado gerado na plataforma de LC-MS.....	82
Figura.21	Avaliação estatística multivariada de <i>molecular features</i> dos modos positivo e negativo.....	84
Figura.22	Análise integrativa dos achados moleculares em lesão de células gigantes dos maxilares.....	90

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	Graus célsius
µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometros
AKT	do inglês <i>Ak strain transforming</i> / Proteína quinase B
Bax	do inglês <i>Bcl-2 Associated X Protein</i>
Bcl-2	do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
CA II	Anidrase Carbônica II
CD11c	Integrina alfa X
CD13	Aminopeptidase N
CD31	do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i>
CD34	do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i>
cDNA	DNA complementar
CE-MS	do inglês <i>Capillary electrophoresis coupled to mass espectometry</i>
CEP	Conselho de ética em pesquisa
cm	Centímetros
CQ	Controle de qualidade
CTR	Receptor calcitonina
Da	Dalton
DDA	<i>Data Dependence Acquisition</i>
DESA	Departamento de engenharia sanitária e ambiental
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DTT	Dititreitol
ERK	<i>Extracellular Signal Regulated Kinase</i>
FC	<i>Fold Change</i>
FDR	Taxa de falsa descoberta
FGFR1	do inglês <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>
FWHM	do inglês <i>Full Width Half Maximum</i>
GC-MS	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa
GR	Receptor glicocorticoide
H3F3A	do inglês <i>Histone Family Member 3A</i>
H3F3B	do inglês <i>Histone Family Member 3B</i>
HCD	Dissociação por colisão em alta energia
HIAR	Recuperação de antígeno induzida por aquecimento
HLA DR	Antígeno leucocitário humano isotipo DR

HPLC	do inglês <i>High performance liquid chromatography</i>
INF-α	Interferon alfa
IPO	<i>Isotopologue Parameter Optimization</i>
JNK	c-Jun N-terminal Kinase.
KEGG	do inglês <i>Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes</i>
KRAS	do inglês <i>Kirsten Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
kV	Quilovolts
LCCG	Lesão central de células gigantes
LCG	Lesão de células gigantes
LC-MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa em tandem
LCPG	Lesão periférica de células gigantes
M	Molar
m/z	Razão massa/carga
MALDI-TOF	do inglês <i>Matrix-assisted laser desorption/ionization coupled to time of flight</i>
MAPK	do inglês <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Militro
mM	Milimolar
mm	Milímetros
MMP-9	Metaloproteinase de Matriz-9
MS	Espectrômetro de massas
MSI	do inglês <i>Metabolomics Steards Initiative</i>
mTOR	do inglês <i>Mammalian Target of Rapamycin</i>
NFATc1	Fator nuclear ativador de célula T
NGS	Sequenciamento de nova geração
nL	Nanolitros
OPG	Osteoprotegerina
OSTF1	Fator de estimulação de osteoclastos
p38	Proteína 38
PCA	Análise de componentes principais
pH	Potencial hidrogeniônico

PI3K	Fosfatidilinositol-3-quinase
PLS-DA	Análise supervisionada de regressão por mínimos quadrados parciais
ppm	Partes por milhão
PT	Proteoma total
qPCR	Reação em cadeia da polimerase quantitativa
RANK	Receptor ativador do fator nuclear k B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear k B
RMN	Ressonância magnética nuclear
RNA	Ácido ribonucleico
rt	do inglês <i>Retention time</i>
SH3BP2	do inglês <i>SH3 Domain-Binding Protein 2</i>
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEAB	Brometo de tetraetilamónio
TEM	Transição de epitélio mesenquimal
TFA	Ácido trifluoracético
TFE	2,2,2-Trifluoretanol
TGFβ	Fator De Crescimento Tumoral Beta
TiO2	Dióxido de titânio
TMT	do inglês <i>Tandem Mass Tag</i>
TNF-α	Fator De Necrose Tumoral Alfa
TRAP	do inglês <i>Tartrate-Resistant Acid Phosphatase</i>
TRPV4	do inglês <i>Transient Receptor Potential Cation Channel 4</i>
USP6	do inglês <i>Ubiquitin Specific Peptidase 6</i>
VEGF	Fator De Crescimento Endotelial Vascular
WT	do inglês <i>Wild type</i> (selvagem)
WWOX	Oxidoredutase contendo o domínio WW
XCMS	Plataforma para processamento de dados metabolômicos

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1	Lesão central de células gigantes dos maxilares.....	16
2.2	Lesão periférica de células gigantes dos maxilares.....	17
2.3	Diagnóstico da lesão de células gigantes dos maxilares.....	18
2.4	Tratamento da lesão de células gigantes dos maxilares.....	20
2.5	Bases moleculares da lesão de células gigantes dos maxilares.....	21
2.6	Análises ômicas.....	25
2.6.1	<i>Genômica</i>	25
2.6.2	<i>Transcriptômica</i>	26
2.6.3	<i>Proteômica</i>	26
2.6.4	<i>Metabolômica</i>	27
2.6.5	<i>Análise ômica integrativa</i>	28
3	JUSTIFICATIVA	30
4	OBJETIVOS	31
4.1	Objetivo geral.....	31
4.2	Objetivos específicos.....	31
5	MATERIAL E MÉTODOS	32
5.1	Amostras e pacientes.....	32
5.2	Análise fosfoproteômica.....	33
5.2.1	<i>Extração proteica de tecidos parafinizados</i>	33
5.2.2	<i>Digestão e dessalinização dos peptídeos</i>	34
5.2.3	<i>Marcação isobárica dos peptídeos – TMT10plex</i>	35
5.2.4	<i>Enriquecimento de fosfopeptídeos</i>	36
5.2.5	<i>Pré-fracionamento dos peptídeos do proteoma total por Cromatografia Líquida em Fase Reversa</i>	38
5.2.6	<i>Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa (LC- MS/MS)</i>	38
5.2.7	<i>Análise de dados proteômicos gerados em LC-MS/MS</i>	39
5.2.8	<i>Análise de correlação biológica</i>	40
5.3	Análise metabolômica da lesão de células gigantes.....	41
5.3.1	<i>Padronização da análise metabolômica de tecidos parafinizados</i>	41
5.3.2	<i>Análise em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa</i>	42
5.3.3	<i>Metabolômica de lesões de células gigantes</i>	43

5.3.4	<i>Análise de dados metabolômicos.....</i>	44
6.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6.1	Análise fosfoproteômica da lesão de células gigantes dos maxilares....	48
6.1.1	<i>Padronização da proteômica total e fosfoproteômica de lesão de células gigantes dos maxilares.....</i>	48
6.1.2	<i>Proteômica total de lesão de células gigantes dos maxilares.....</i>	55
6.1.3	<i>Fosfoproteômica total de lesão de células gigantes dos maxilares.....</i>	68
6.2	Metabolômica de lesão de células gigantes.....	71
6.2.1	<i>Padronização da metabolômica de lesão de células gigantes.....</i>	71
6.2.2	<i>Metabolômica da lesão de células gigantes.....</i>	83
6.3	Análise ômica integrativa.....	88
7.	CONCLUSÕES.....	92
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	93
	ANEXOS.....	104
	APÊNDICE.....	117

1 INTRODUÇÃO

As lesões de células gigantes dos maxilares (LCG) são um grupo de lesões que acometem os ossos dos maxilares e apresentam microscopicamente células gigantes multinucleadas semelhantes a osteoclastos e células mononucleares de formato ovoide e/ou fusiforme (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

As LCG dos maxilares são classificadas em dois subtipos de acordo com suas características clínicas – lesão central de células gigantes (LCCG) e lesão periférica de células gigantes (LPCG). A forma intraóssea, denominada LCCG, representa cerca de 10% de todos os tumores benignos dos maxilares, possui predileção pelo sexo feminino e se desenvolve principalmente na região anterior da mandíbula de indivíduos entre as três primeiras décadas de vida (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a).

Por outro lado, a forma extra-óssea, denominada LPCG, apresenta-se clinicamente como uma lesão de superfície usualmente ulcerada e coloração vermelho-arroxeadada (EL-NAGGAR *et al.*, 2017 CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b). Localiza-se na mucosa alveolar e/ou gengival de indivíduos preferencialmente do sexo feminino, entre a quarta e quinta décadas de vida (EL-NAGGAR *et al.*, 2017 CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b). Essa lesão corresponde a aproximadamente 10% das lesões gengivais e também pode ser associada a implante dentário (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b).

As metodologias ômicas permitem análises globais que podem refletir o perfil molecular celular (ROTROFF; MOTSINGER-REIF, 2016; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). O uso de plataformas como a de espectrometria de massa e a ressonância magnética nuclear (RMN) permitem gerar dados com alta sensibilidade e resolução tanto na análise de proteínas bem como de metabólitos (DUDZIK *et al.*, 2018). Plataformas como a cromatografia líquida (LC-MS), gasosa (GC-MS) e eletroforese capilar (CE-MS) acopladas à espectrometria de massa tem sido utilizadas para avaliação de moléculas de tamanho inferior a 1500 Da, com o objetivo de melhor entendimento dos processos metabólicos envolvidos em diversas doenças (DUDZIK *et al.*, 2018).

Adicionalmente, a cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa também possui um considerável uso nas análises proteômicas, gerando dados robustos que contribuem para elucidação de alterações proteicas de doenças e comportamento de microrganismos (MAES *et al.*, 2013; SUN; HU, 2017).

A análise genômica de amostras de LCCG e LPCG identificou mutações somáticas recorrentes em três genes: *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* (GOMES *et al.*, 2018). Portanto, diante da necessidade de um melhor entendimento dos processos moleculares envolvidos na patogênese da lesão de células gigantes, o presente estudo propôs uma análise integrativa de dados ômicos, sendo metabolômicos, proteômicos e fosfoproteômicos, utilizando amostras de tecidos parafinizados para identificar potenciais vias e processos envolvidos no desenvolvimento e manutenção LCG dos maxilares.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

As LCG dos maxilares são benignas e foram inicialmente classificadas como lesões de reparo, denominadas como granuloma reparativo de células gigantes, para distingui-las do tumor ósseo de células gigantes (JAFFE, 1952). Atualmente, a lesão foi renomeada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como LCG dos maxilares (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Tradicionalmente, tais lesões são categorizadas em duas variantes clínicas, central e periférica. As variantes clínicas da LCG possuem características histopatológicas semelhantes, no entanto diferem-se no que concerne aos padrões de agressividade. A LCCG geralmente possui um comportamento mais agressivo e tende a recorrências, enquanto a LPCG é considerada uma lesão reativa causada por irritação ou trauma crônico (CHUONG *et al.*, 1986; KRUSE-LOSLER *et al.*, 2006; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

2.1 Lesão central de células gigantes dos maxilares

A região dos maxilares é acometida por várias lesões intraósseas de características diversas, algumas das quais com etiologias e desenvolvimento pouco elucidados, como é o caso da LCCG que corresponde a 10% dos tumores benignos dos maxilares. A LCCG pode ocorrer de forma esporádica ou associada a síndromes como querubismo, neurofibromatose tipo 1, displasia osteoglofônica, síndrome cardiofaciocutânea, oculoectodérmica e Jaffe-Campanacci e Noonan (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2020). Histologicamente é caracterizada por células gigantes multinucleadas entremeadas a células ovais e fusiformes, podendo conter ocasionalmente trabéculas de tecido ósseo (AUCLAIR *et al.*, 1988; REGEZI, 2002; KRUSE-LOSLER *et al.*, 2006; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Ocorre preferencialmente em indivíduos na segunda ou terceira década de vida, de modo que aproximadamente 60% dos casos correspondem a pacientes do sexo feminino. Anatomicamente, a LCCG ocorre mais comumente na mandíbula, representando aproximadamente 70% dos casos (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a).

Dois comportamentos clínicos são observados na variante central da LCG, agressivo e não-agressivo (CHUONG *et al.*, 1986). Classifica-se como

agressiva a lesão que apresenta tamanho maior que 5 cm, com crescimento rápido, reabsorção radicular, deslocamento dentário, perfuração óssea cortical e maior taxa de recorrência após a curetagem quando comparado a não agressiva (CHUONG *et al.*, 1986). Por outro lado, lesões com tamanho menor que 3 cm, geralmente assintomáticas e indolores são classificadas como não agressivas (CHUONG *et al.*, 1986; KABAN; TROULIS, 2002; FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

As variantes clínicas de LCCG são diagnosticadas somente com base nos critérios clínicos e radiográficos pré-estabelecidos, visto que ainda não há nenhum marcador imunofenotípico ou molecular que seja confiavelmente capaz de distingui-las.

2.2 Lesão periférica de células gigantes dos maxilares

A contraparte extra-óssea das LCG é denominada LPCG. Além da semelhança histológica com a LCCG, a LPCG também é mais prevalente em indivíduos do sexo feminino e na região da mandíbula (EERSEN; FEJERSKOV; PHILIPSEN, 1973; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b). No entanto, a lesão periférica é considerada reacional, além de ser mais predominante na quinta e sexta década de vida (LESTER *et al.*, 2014; CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b). Usualmente é assintomática, podendo causar erosão de osso alveolar subjacente, e se apresentar associada a implantes dentários (LESTER *et al.*, 2014; CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b; BRIERLEY; CRANE; HUNTER, 2019) (Figura 1). A taxa de recorrência em torno de 10% pode ser relacionada à incompleta remoção da lesão (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018b).



Figura 1. Lesão periférica de células gigantes dos maxilares. Lesão nodular de coloração vermelho-arroxeadada localizado na gengiva. Fonte: imagem cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

2.3 Diagnóstico da lesão de células gigantes dos maxilares

O diagnóstico inicial da lesão de células gigantes é realizado por avaliação clínica e radiográfica em que se observa um perfil diverso, com imagem radiolúcida, unilocular ou multilocular no caso das LCCG (Figura 2). Na forma agressiva da LCCG podem ser observados deslocamentos de dentes, expansão e perfuração da cortical óssea (K. HORNER, 1989; STAVROPOULOS; KATZ, 2002; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011). Biópsia e exame microscópico são necessários para a definição do diagnóstico.

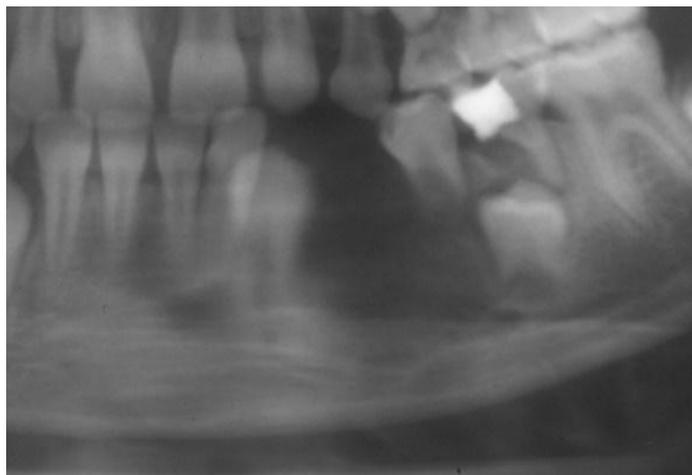


Figura 2. Imagem radiográfica de lesão central de células gigantes dos maxilares. Imagem radiolúcida, bem delimitada, associada a deslocamento de dentes. Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

Microscopicamente as lesões central e periférica são similares, apresentando células gigantes multinucleadas em meio às células mononucleares fusiformes ou ovóides, podendo apresentar focos hemorrágicos como representado na Figura 3.

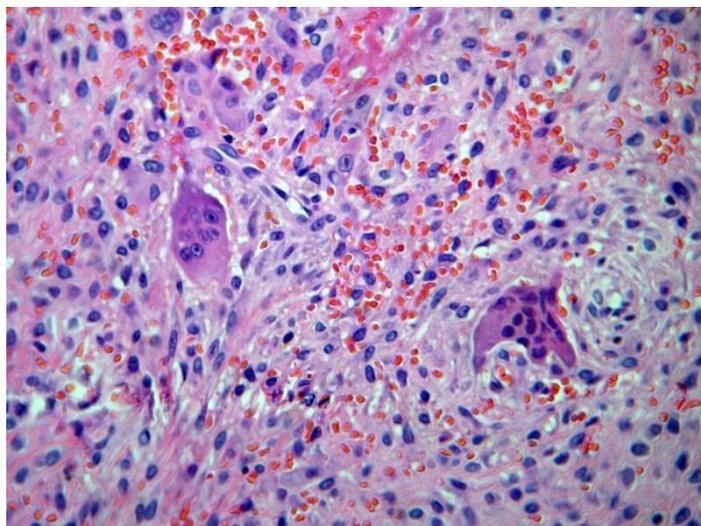


Figura 3: Aspecto microscópico da lesão de células gigantes. Observam-se células gigantes multinucleadas em meio a células mononucleadas fusiformes ou ovóides. Nota-se também a presença de hemácias (Hematoxilina & Eosina – 400x). Fonte: Imagem cedida pelo Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

A LCG e outras lesões como querubismo, tumor marrom do hiperparatireoidismo, tumor de células gigantes de ossos longos e fibroma não-ossificante, apresentam similaridade histológica devido à presença de células gigantes multinucleadas, portanto faz-se necessário um diagnóstico diferencial, levando em consideração a associação de aspectos clínicos, informações histopatológicas, radiológicas e exames laboratoriais complementares (FLANAGAN; SPEIGHT, 2014).

Dentre essas doenças destaca-se o tumor marrom do hiperparatireoidismo que apresenta semelhanças histológicas com a LCG, mas está associado à elevação dos níveis séricos de cálcio e paratormônio, enquanto na LCG esses níveis não são alterados (REGEZI, 2002; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

Adicionalmente, os fibromas não-ossificantes possuem uma prevalência pela metáfise de ossos longos em crianças, sendo raramente observado em

ossos dos maxilares (CHRCANOVIC *et al.*, 2011; WICK; MCDERMOTT; SWANSON, 2014). Diferentemente da LCG, no fibroma não-ossificante podem ser visualizados macrófagos espumosos. No entanto, a similaridade microscópica entre as duas lesões induz ao questionamento se de fato representam entidades distintas (GOMES *et al.*, 2020).

O tumor de células gigantes é uma lesão considerada neoplásica agressiva com ocorrência principalmente na epífise de ossos longos que pode sofrer metástase (COWAN; SINGH, 2013). Não menos importante, o querubismo é uma lesão de caráter autossômico hereditário que resulta em uma expansão simétrica da mandíbula e maxila nas primeiras décadas de vida (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

2.4 Tratamento da lesão de células gigantes dos maxilares

O tratamento das LCGs consiste em intervenções cirúrgicas como a curetagem e enucleação, no entanto alternativas quimioterápicas foram descritas, como o uso de glicocorticóides, calcitonina e interferon alfa (IFN- α) (KABAN; TROULIS, 2002; TRIANTAFILLIDOU *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2015). A excisão cirúrgica associada à curetagem do osso alveolar subjacente apresenta uma taxa de recorrência 16% menor do que a simples excisão da lesão e, por isso, é o tratamento de escolha (CHRCANOVIC; GOMES; GOMEZ, 2018a).

A cirurgia geralmente é considerada o melhor método de tratamento para LCCG agressivas, no entanto alguns estudos têm apresentado tratamentos alternativos. A administração de calcitonina apresentou bons resultados com redução da lesão em casos de LCCG agressivas recorrentes (TRIANAFILLIDOU *et al.*, 2011). Outros tratamentos farmacológicos como o uso de INF- α foram testadas em casos de LCCG agressivas e não foram observadas recorrências após o tratamento, porém os estudos são preliminares e necessitam de mais avaliações para serem implementados como tratamento (KABAN; TROULIS, 2002). Apesar das quimioterapias apresentarem bons resultados em alguns casos de LCCG agressivas, o uso desses medicamentos possui a desvantagem do longo tempo de tratamento em comparação à cirurgia (TRIANAFILLIDOU *et al.*, 2011).

O uso de glicocorticoides e calcitonina como tratamentos alternativos é sustentado pelo fato das células gigantes multinucleadas e as células mononucleares tanto de casos agressivos quanto não agressivos de LCCG apresentarem reatividade para os receptores GR (receptor glicocorticoide) e CTR (receptor de calcitonina) (MARTINS *et al.*, 2015). Adicionalmente, observou-se que as variantes clínicas não apresentam diferenças quanto à expressão desses receptores (MARTINS *et al.*, 2015).

2.5 Bases moleculares da patogênese da lesão de células gigantes dos maxilares

Diversas lesões compartilham características histológicas com a LCG, no entanto, já foram descritas diversas alterações que as diferem molecularmente. O tumor de células gigantes apresenta mutações no gene *H3F3A* (p.Gly34 Trp ou p.Gly34 Leu) que não são observadas na LCCG (BEHJATI *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014, 2018). Adicionalmente, outras lesões apresentam alterações genéticas exclusivas, como a mutação no gene *SH3BP2* presente no querubismo (UEKI *et al.*, 2001; LANGE *et al.*, 2007; GOMES *et al.*, 2018), o rearranjo cromossomal do gene *USP6* observado no cisto ósseo aneurismático (OLIVEIRA *et al.*, 2004; GOMES *et al.*, 2018) e a mutação p.K36M afetando o gene *H3F3B* no condroblastoma (BEHJATI *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2018).

A patogênese das LCGs, bem como a origem das células gigantes ainda não são bem elucidadas e foram objeto de estudo de trabalhos que associaram a patogênese dessas lesões com o processo de osteoclastogênese. A positividade de marcadores específicos de osteoclastos, como CD11c, CD13 e HLA DR foram observados tanto nas células mononucleadas quanto nas células gigantes multinucleadas (FLANAGAN *et al.*, 1988). De forma complementar, outro estudo incluiu outras lesões com células gigantes multinucleadas além da LCG, como querubismo e cisto ósseo aneurismático, e notou-se positividade de marcadores de osteoclastos como V-ATPase, CA II, catepsina K, MMP-9 e TRAP, evidenciando uma semelhança destas células com o fenótipo de osteoclastos (LIU; YU; LI, 2003). Adicionalmente 10-15% das células mononucleares também apresentaram positividade para estes

marcadores, indicando que tais células podem estar envolvidas no processo de formação das células gigantes multinucleadas (LIU; YU; LI, 2003).

Outras moléculas com papéis importantes no processo de osteoclastogênese também foram detectadas em LCG, querubismo, tumor marrom e cisto ósseo aneurismático, como RANKL (receptor ativador do fator nuclear kB /ligante) observado somente nas células mononucleares, e o NFATc1 (Fator nuclear ativador de célula T) que apresentou marcação nuclear e aumento da expressão predominantemente nas células gigantes multinucleadas (LIU; YU; LI, 2003; DUARTE *et al.*, 2011). As moléculas RANK (receptor funcional de RANKL) e a osteoprotegerina (OPG) foram observadas tanto em células ovais e fusiformes quanto nas células consideradas osteoclastos-*like* (LIU; YU; LI, 2003; TOBÓN-ARROYAVE *et al.*, 2005). A OPG é uma molécula inibitória do processo de osteoclastogênese via competição com o receptor para RANKL, sendo considerado um mecanismo de *feedback* negativo ao sistema de RANKL/RANK (MORI *et al.*, 2013). Estes achados corroboram com a hipótese de que as células gigantes multinucleadas podem ter uma origem baseada na osteoclastogênese com envolvimento das células mononucleares.

Alguns achados, que adicionalmente contribuem para a compreensão da patogênese da lesão, como os fatores relacionados a apoptose, foram avaliados em LCGs. As proteínas Bcl-2, Bax e caspase-3, que desempenham papéis importantes no processo de apoptose, apresentaram-se aumentadas na LCG, preferencialmente nas células gigantes em comparação as células mononucleares, sugerindo que a atividade apoptótica esteja restrita a estas células (AMARAL *et al.*, 2011).

De forma complementar, outro fator apoptótico, o gene pro-apoptótico *WWOX* (oxidoreductase contendo o domínio WW), que codifica a proteína *Wwox*, foi avaliado nas lesões central e periférica (AMARAL *et al.*, 2013). Foi observado aumento da expressão do gene, além de marcação preferencialmente no citoplasma de células gigantes em ensaio imunohistoquímico em relação a células mononucleares do sangue periférico, fortalecendo a hipótese de que as células gigantes são basicamente as células

responsáveis pelo processo de apoptose (AMARAL *et al.*, 2013). Dois casos de LCCG agressivas, associadas a expansão óssea, apresentaram redução da expressão de *WWOX* e ausência de marcação para a proteína *Wwox* na imunohistoquímica (AMARAL *et al.*, 2013). Tal fato sugere que as lesões agressivas possam representar uma lesão neoplásica, visto que tumores ósseos, como os osteossarcomas apresentam redução da expressão ou perda deste gene (KUREK *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2013).

A comparação entre lesões periféricas e centrais revelou expressão de metaloproteinase 9 da matriz (MMP-9) e do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) menos intensa nas LPCG do que nas LCCG (MATOS *et al.*, 2011). Essas citocinas estimulam a osteoclastogênese e sua baixa expressão pode estar associada ao menor potencial de reabsorção óssea na LPCG (MATOS *et al.*, 2011). Em contrapartida, as lesões periféricas exibiram uma maior quantidade de vasos sanguíneos em seu microambiente. Os fatores irritativos locais promovem uma secreção elevada de citocinas pró-angiogênicas e a presença do maior número de vasos sanguíneos é consistente com a natureza reativa da lesão (MATOS *et al.*, 2011). Interações coordenadas entre o fator de crescimento tumoral beta (TGF- β) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) são eventos críticos para a diferenciação osteoclástica (MATOS *et al.*, 2011). Na LCCG observa-se correlação positiva entre a expressão dos dois fatores, enquanto a LPCG exhibe aumento na expressão de TNF- α e uma redução na expressão de TGF- β (MATOS *et al.*, 2011). A falta da correlação entre os níveis destes dois fatores e a maior expressão de TNF- α nas lesões periféricas corrobora com sua natureza reativa, uma vez que essa citocina atua como reguladora chave do processo inflamatório originado dos fatores irritativos locais supostamente responsáveis pelo desenvolvimento da LPCG (MATOS *et al.*, 2011).

As formas clínicas da LCCG, agressiva e não agressiva, apresentam diferenças quanto aos aspectos da angiogênese, onde as lesões de comportamento agressivo apresentam aumento na expressão de marcadores angiogênicos e maior vascularização, constatada pela imunoreatividade para os marcadores endoteliais CD31 e CD34, quando comparados com as lesões não agressivas. Esses resultados sugerem que um componente vascular

proliferativo nessas lesões pode ser responsável pela agressividade clínica, porém mais ensaios são necessários para comprovar a teoria (PEACOCK; JORDAN; SCHMIDT, 2012).

Trabalho recente do nosso grupo de pesquisa identificou em 72% dos casos avaliados, mutações somáticas nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1*, ativadoras da via MAPK, tanto em lesões periféricas como centrais de células gigantes (GOMES *et al.*, 2018). As mutações em *TRPV4* (*Transient Receptor Potential Vanilloid 4 cation channel*), gene que codifica uma proteína de membrana relacionada ao transporte de cálcio, foram exclusivas para os casos de lesão central de células gigantes, 22% do total de casos. Além disso, avaliações *in silico* e *in vitro* mostraram que as mutações p.M713V e p.M713I em *TRPV4* acarretam um ganho de função do canal de cálcio (GOMES *et al.*, 2018). Adicionalmente, outra mutação no gene *TRPV4*, p.Leu619Pro foi identificada em dois pacientes que apresentaram lesões no sistema nervoso, incluindo polineuropatias progressivas, e múltiplas LCCG (RAGAMIM *et al.*, 2021).

O gene *KRAS* também foi um dos genes que apresentou mutações em lesão de células gigantes, sendo presente em 41,3% dos casos (GOMES *et al.*, 2018). Múltiplas mutações nos conhecidos *hotspots* (p.G12D/A, p.G13D, p.A146V, p.A146P) foram observadas predominantemente nos casos periféricos (GOMES *et al.*, 2018). Interessantemente, LPCG associada a implantes e fibroma não ossificante também apresentaram mutações no gene *KRAS*, compreendendo os códons, 146, 12, 13 e 14, com ativação da via MAPK (BAUMHOER *et al.*, 2019; CHAVES *et al.*, 2019).

Mutações somáticas com ganho de função foram identificadas no gene *FGFR1*, p.C381R e p.N330I, em 14% dos casos em LCG e também observadas no fibroma não ossificante (GOMES *et al.*, 2018; BAUMHOER *et al.*, 2019). Tais mutações já foram reportadas em uma doença hereditária, a displasia osteoglofônica, que foi associada em um relato de caso à presença de LCG (SOW *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2018).

A ocorrência dessas mutações nas células mononucleares da LCG foi associada à ativação da via de MAPK, importante via de sinalização celular,

responsável pelo controle de inúmeros processos celulares (GOMES *et al.*, 2018). As proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs) são proteínas serina/treonina quinases presentes nas células eucarióticas que convertem o estímulo extracelular em vários tipos de respostas celulares (ZHANG; LIU, 2002). Essas proteínas constituem múltiplas vias que, de forma coordenada, regulam a expressão gênica, a atividade mitótica, a motilidade, sobrevivência, apoptose, diferenciação e o metabolismo celular (ZHANG; LIU, 2002).

2.6 Análises ômicas

A análise de biomoléculas como, ácidos nucleicos, proteínas e metabólitos denominada “ômica” refere-se às áreas da ciência que têm por objetivo a análise acurada e global dessas moléculas (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017; ROTROFF; MOTSINGER-REIF, 2016). Tanto o desenvolvimento dos sequenciadores de nova geração, bem como dos espectrômetros de massas contribuíram para os avanços das tecnologias ômicas contribuindo para a melhoria da aquisição de dados, resolução e custo (ROTROFF; MOTSINGER-REIF, 2016; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017).

2.6.1 Genômica

A genômica fornece informações do código genético e possui a característica de relativa homogeneidade do perfil genético entre os tecidos e células de um mesmo indivíduo (SUN; HU, 2017). As análises transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas diferem-se da genômica quanto à grande heterogeneidade do perfil das moléculas em um mesmo indivíduo (SUN; HU, 2017).

Esse campo de análise visa identificar variantes genéticas associadas a uma determinada condição, como deleções e inserções, rearranjos estruturais, substituições de nucleotídeos e alterações dos números de cópias (MEYERSON; GABRIEL; GETZ, 2010; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Diversas técnicas são descritas para as análises genômicas incluindo, microarranjos de DNA, *nanosttring*, qPCR, mapeamento genético e as técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), sendo consideradas as mais amplamente utilizadas (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

2.6.2 Transcriptômica

A transcriptômica por sua vez visa avaliação de transcritos (RNAs) quanto ao perfil de expressão gênica (presença/ausência e quantificação do transcrito), variação estrutural ou na sequência nucleotídica e identificação de variantes de *splicing* (MEYERSON; GABRIEL; GETZ, 2010; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017; SUN; HU, 2017). Dentre as tecnologias, destacam-se as mais atuais que se baseiam no sequenciamento dos cDNAs obtidos a partir da transcrição reversa do RNA total, mRNAs ou outros tipos de RNAs, e as tecnologias baseadas em sondas, como microarranjos, que ainda são muito utilizadas na análise do transcriptoma (GOODWIN; MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016).

2.6.3 Proteômica

O proteoma possui uma complexidade superior ao genoma devido ao fato de que vários produtos gênicos podem ser originados de um único gene (JENSEN, 2006; MAES *et al.*, 2013; SUN; HU, 2017). Essa complexidade se deve a ocorrência de *splicing* alternativo e modificações pós traducionais (como glicosilação, fosforilação, acetilação, entre outros), e adicionalmente o momento celular/tecidual pode variar o perfil proteico (JENSEN, 2006; MAES *et al.*, 2013; SUN; HU, 2017). A proteômica destaca-se na avaliação global das proteínas e suas modificações, detecção de mutações ao nível dos aminoácidos, isoformas de peptídeos e a influência dessas sobre as funções e fisiologia celular em condições normais ou patológicas (JENSEN, 2006; SUN; HU, 2017).

Uma vertente da proteômica é a fosfoproteômica que tem por objetivo a análise de proteínas fosforiladas, que por sua vez participam de diversos processos celulares como a sinalização celular (LEE; JONES; HUBBARD, 2015). A fosforilação de proteínas implica em uma alteração temporária das proteínas dita como modificação pós traducional, que ocasiona modificações na regulação de atividades enzimáticas, interações com outras proteínas e/ou moléculas e localização celular (SHARMA *et al.*, 2014). Alterações na regulação de proteínas são frequentemente associadas a doenças (SHARMA *et al.*, 2014). Diante disso, faz-se necessário a avaliação das proteínas

modificadas para uma melhor associação das alterações moleculares com os fenótipos observados. Para isso, as plataformas de espectrometria de massa associadas a técnicas de extração de proteínas permitem a análise dessas proteínas com alta sensibilidade e especificidade (LEE; JONES; HUBBARD, 2015).

2.6.4 Metabolômica

A metabolômica é um campo em ascensão e corresponde à análise mais próxima ao fenótipo. Possui a característica metodológica de examinar produtos finais e intermediários do metabolismo, permitindo a identificação de pequenas moléculas presentes em um determinado momento do perfil metabólico de uma célula, tecido, órgãos ou organismo (SCHELTEMA; DECUYPERE; KINDT, 2010; PAGET *et al.*, 2013).

A metabolômica estuda, de forma ampla e quantitativa, o conjunto de metabólitos de uma célula, tecido, órgão, biofluido ou organismo. Conceitualmente, os metabólitos são moléculas derivadas de processos endógenos ou exógenos, cuja massa atômica seja inferior a 1.500 Da (NAZ *et al.*, 2014; DUDZIK *et al.*, 2018). Essas moléculas podem apresentar diversas propriedades químicas e físicas, pertencendo a classes bioquímicas diversas, como a dos aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, entre outros (DUDZIK *et al.*, 2018). Dentre as tecnologias ômicas, as análises metabolômicas são as que mais se correlacionam com o fenótipo, demonstrando diretamente os efeitos das modificações genéticas, expressão gênica, metabolismo intrínseco e influências ambientais (KIND *et al.*, 2009; DUDZIK *et al.*, 2018).

Os métodos analíticos mais comumente utilizados para estudo do metaboloma são as técnicas de cromatografia acopladas à espectrometria de massa e a ressonância magnética nuclear (RMN) (DUDZIK *et al.*, 2018). A RMN possui como característica dados de alta reprodutibilidade e quantificação precisa. A plataforma de RMN exige preparação mínima da amostra, porém a sensibilidade da plataforma analítica é considerada baixa em comparação à espectrometria de massa (ARMITAGE; BARBAS, 2014; NAZ *et al.*, 2014). Por outro lado, as análises baseadas em espectrometria de massa apresentam

maior sensibilidade e também capacidade de avaliar o metaboloma de forma mais ampla, trabalhando com diferentes cromatografias (ARMITAGE; BARBAS, 2014; NAZ *et al.*, 2014).

A cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC – MS) possui a técnica de cromatografia mais versátil, compreendendo vários tipos de espectrômetros de massa, além de fases estacionárias e móveis, tornando esta plataforma adequada para análise de variados compostos (ARMITAGE; BARBAS, 2014; DUDZIK *et al.*, 2018). A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS), por sua vez, é uma plataforma apropriada para avaliação de compostos de baixo peso molecular, porém é limitada a metabólitos voláteis ou volatilizáveis (DUDZIK *et al.*, 2018; NAZ *et al.*, 2014). Finalmente, a eletroforese capilar acoplada à espectrometria de massa (CE-MS) permite avaliações de compostos polares ou iônicos, mas apresenta uma menor sensibilidade e reprodutibilidade comparada a LC-MS e GC-MS (ARMITAGE; BARBAS, 2014; DUDZIK *et al.*, 2018).

2.6.5 Análises ômicas integrativas

As análises multi-ômicas compõem uma plataforma integrativa que auxilia na compreensão dos mecanismos moleculares relacionados a processos biológicos, como a patofisiologia de doenças (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017; SUN; HU, 2017). Essa integração envolve análises genômicas, epigenômicas, transcriptômicas, proteômicas e metabolômicas, fazendo uma cobertura dos processos moleculares como uma rede (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017; SUN; HU, 2017). Cada abordagem ômica possui capacidade metodológica de detectar um tipo de molécula, e o conjunto determina a funcionalidade dessas moléculas de forma integrativa em um complexo sistema biológico (SUN; HU, 2017).

Os processos relacionados ao desenvolvimento de doenças humanas envolvem um sistema celular altamente dinâmico, que sofre influências ambientais para designar o fenótipo apresentado em cada doença (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Portanto, associar metodologias que visam à integração de dados obtidos de análises de várias camadas moleculares pelas

plataformas ômicas é uma alternativa promissora e bastante interessante para o entendimento de uma ampla variedade de entidades patológicas.

3 JUSTIFICATIVA

A LCG dos maxilares é uma lesão benigna, que se apresenta em duas formas clínicas, central e periférica. A LCCG é uma lesão intraóssea, podendo ser agressiva clinicamente, com potencial de causar grandes prejuízos estéticos e funcionais aos seus portadores na falta de tratamento apropriado. Enquanto a contraparte extra-óssea é considerada uma lesão reativa e pode apresentar recorrência após tratamento.

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de caracterização da lesão. Dentre eles destaca-se a análise genômica da LCG, que ampliou o conhecimento sobre a lesão, identificando mutações em genes envolvidos em importantes processos celulares, como a cascata de sinalização. No entanto, mesmo diante deste avanço, a patogênese da doença ainda permanece sem uma elucidação mais aprofundada. Adicionalmente, as alterações associadas às mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* não são conhecidas na LCG.

Logo, compreender os processos moleculares associados a essas mutações pode facilitar o entendimento da patogênese da lesão e assim auxiliar o desenvolvimento de alvos terapêuticos e diagnósticos. Diante disso, as análises multi-ômicas e a integração dos dados genômicos prévios, utilizando amostras de tecidos parafinizados, podem identificar as vias envolvidas na patogênese da lesão.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar as alterações moleculares relacionadas às mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* na LCG.

4.2 Objetivos específicos

- Avaliar comparativamente o fosfoproteoma e proteoma total das amostras de LCG que apresentam mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* e em amostras com ausência de mutação nos três genes;
- Analisar o metaboloma das amostras de LCG que apresentam mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* e em amostras com ausência de mutação nos três genes;
- Análise integrativa dos dados baseada nos metabólitos e proteínas encontrados nas avaliações ômicas.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Amostras e pacientes

Este estudo foi executado em acordo com princípios éticos e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da UFMG, sob o número de protocolo CAAE: 99684918.0.0000.5149 (Anexo 1). As amostras foram obtidas de pacientes atendidos na Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFMG que concordaram com a sua participação e assinaram um termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Em caso de menoridade, foi solicitada a concordância e assinatura em termo de assentimento livre e esclarecido (TALE) pelo paciente, e para os responsáveis legais solicitou-se a concordância e assinatura do TCLE.

As amostras incluídas no projeto foram obtidas de indivíduos com diagnóstico confirmado de LCG, central ou periférica, que possuíam descrição clínica, exames histopatológicos e radiográficos disponíveis para confirmação e consulta.

Para a realização da análise fosfoproteômica e metabolômica, foram selecionados 21 casos de LCG dos maxilares, classificados em lesões centrais e periféricas, que apresentam as mutações nos genes, *TRPV4*, *KRAS*, *FGFR1* e casos com ausência de mutações nos três genes, denominados WT (*Wild-type*), previamente identificados em um estudo genômico (GOMES *et al.*, 2018) (Tabela 1).

Tabela 1. Pacientes incluídos nas análises proteômicas e metabolômicas da lesão de células gigantes.

Amostra	Mutação	Variante clínica	Tipo de análise	Localização	Idade	Sexo
TRPV4 - 1	TRPV4 p.M713V	Central	P/M	Maxila	40	Masculino
TRPV4 - 2	TRPV4 p.M713V	Central	P/M	Mandíbula	28	Feminino
TRPV4 - 3	TRPV4 p.M713V	Central	P/M	Mandíbula	24	Feminino
TRPV4 - 4	TRPV4 p.M713V	Central	P/M	Mandíbula	18	Feminino
TRPV4 - 5	TRPV4 p.M713V	Central	P/M	Maxila	15	Feminino
KRAS - 1	KRAS p.A146V	Periférica	P/M	Mandíbula	65	Feminino
KRAS - 2	KRAS p.A146V	Periférica	P/M	Maxila	74	Masculino
KRAS - 3	KRAS p.A146V	Periférica	P/M	Mandíbula	10	Feminino
KRAS - 4	KRAS p.G12D	Periférica	P/M	Mandíbula	36	Masculino
KRAS - 5	KRAS p.G12D	Central	P/M	Mandíbula	8	Masculino
KRAS - 6	KRAS p.G12D	Central	P/M	Mandíbula	35	Feminino
FGFR -1	FGFR1 p.C381R	Periférica	P/M	Mandíbula	18	Masculino
FGFR -2	FGFR1 p.C381R	Central	P/M	ND		ND
FGFR -3	FGFR1 p.C381R	Central	P/M	Mandíbula	7	Feminino
FGFR -4	FGFR1 p.N330I	Central	P/M	Maxila	27	Feminino
FGFR -5	FGFR1 p.N330I	Periférica	P/M	Mandíbula	65	Feminino
WT - 1	WT	Central	P/M	Maxilar	17	Masculino
WT - 2	WT	Periférica	P/M	ND	ND	ND
WT - 3*	WT	Central	P	ND	ND	ND
WT- 3.1	WT	Central	M	Maxila	6	Feminino
WT - 4	WT	Central	P/M	Maxila	15	Masculino

* WT-3 somente foi utilizado na análise proteômica/fosfoproteômica devido à presença de áreas com mineralização, o que impossibilitava o uso na análise metabolômica. O protocolo de extração dos metabólitos utilizado no estudo não contempla etapas capazes de reter os íons provenientes da área mineralizada, o que poderia interferir na análise. P: proteômica; M: metabolômica. ND: não disponível.

5.2 Análise fosfoproteômica

5.2.1 Extração proteica de tecidos parafinizados

Para a realização da análise fosfoproteômica, foram selecionados 20 casos de LCG (Tabela 1). A extração de proteínas para fosfoproteômica a partir de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina foi adaptada de Piehowski e colaboradores (2018) (PIEHOWSKI *et al.*, 2018). Foram utilizados cortes de 10 µm de espessura de tecidos parafinizados. Os dois primeiros cortes foram desprezados a fim de minimizar efeitos como oxidação de

moléculas da superfície dos blocos. Os tecidos foram desparafinizados em 3 banhos de 1 mL de xilol e hidratados em banhos de etanol 100%, 80% e 70% sucessivamente. Posteriormente, foram adicionados aos tecidos 200 µl da solução de extração (1:1) TFE (2,2,2-Trifluoretanol) (Sigma Aldrich, San Luis, Missouri, EUA) e Tris (600 mM) (Sigma), acrescidos de 200 µL de bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7.8) (Sigma) e coquetéis inibidores de proteases (Sigma) e fosfatases (Sigma). As amostras foram incubadas nessa solução por 90 minutos a 95°C, com periódica agitação. Após a incubação o extrato foi submetido à sonicação em gelo por 2 ciclos de 20 segundos, potência mediana, com intervalos de 30 segundos. O extrato foi centrifugado a 15000 xg, 4°C por 5 minutos e o sobrenadante dosado em *Qubit protein assay* (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

5.2.2 Digestão e dessalinização dos peptídeos

Para a digestão das proteínas utilizou-se 120 µg de extrato total de cada amostra, e prosseguiu-se com as etapas de redução e alquilação das proteínas. Para a redução foram adicionados 5 mM de DTT (GE Healthcare, Chicago, Illinois, EUA) e incubou-se por 1 hora a 37°C. Após a incubação, o extrato foi resfriado em gelo e, então adicionados 40 mM de iodoacetamida (Sigma) para o processo de alquilação das proteínas. O extrato foi incubado por 30 minutos à temperatura ambiente, sob proteção da luz. Posteriormente as amostras foram diluídas a 1:5 em bicarbonato de amônio (50 mM, pH 7.8), com o propósito de reduzir a quantidade do solvente orgânico na amostra, TFE, para em torno de 5%.

Todas as amostras tiveram o seu pH verificado, utilizando tiras universais de pH (escala de pH de 0 a 14) (Kasvi, São José dos Pinhais, Paraná, Brasil) para garantir a eficácia da digestão triptica, visto que a tripsina é uma enzima que possui uma máxima eficiência no intervalo de pH 7-8. Finalmente a tripsina (Promega, Madison, Wisconsin, EUA) foi adicionada às amostras na proporção de 1:50 enzima:substrato (m/m), e incubou-se por 16 horas à 37°C. A reação de tripsinização foi paralisada com adição de ácido trifluoracético (TFA) (Sigma) na concentração final de 0.4%, para redução do pH (aproximadamente pH 2), com consequente inativação da tripsina.

O processo de dessalinização dos peptídeos foi realizado nas colunas SepPak C18 (Waters, Milford, Massachusetts, USA). Brevemente, a coluna foi ativada com 2 mL de 100% acetonitrila (JTBaker, USA) e posteriormente condicionada com 4 mL da solução de 0.1% de TFA. A amostra foi então adicionada a coluna e duas lavagens de 2 mL, com 0,1% de TFA foram realizadas na coluna. Os peptídeos dessalinizados foram eluídos em duas etapas; sendo a primeira com 600 µL da solução de 60% de acetonitrila e 0.1% de TFA, e a segunda com 600 µL 70% de acetonitrila e 0.1% de TFA. Os eluatos foram completamente secos em *SpeedVac* e ressuspensos em 50 µL de 0.1% de TFA. Novamente as amostras foram dosadas para normalização da quantidade de peptídeos necessária para prosseguir com a marcação com as *Tags* Isobáricas.

A plataforma de MALDI-TOF (*Matrix-assisted laser desorption/ionization coupled to time of flight*) foi utilizada para verificar a qualidade e eficácia do processo de tripsinização. Foram selecionadas 4 amostras para representar o processo de preparo de amostra até a etapa de dessalinização. A seleção de 4 amostras foi baseada na concentração dos peptídeos, visto que para a análise em MALDI-TOF faz-se necessário uma concentração mínima de 1 µg/µL e apenas as 4 selecionadas apresentaram este requisito. As amostras KRAS 3 e 5, TRPV4 3 e WT 3 foram as selecionadas. A matriz utilizada foi a α-cyano, indicada para avaliação de peptídeos tripticos.

5.2.3 Marcação isobárica dos peptídeos – TMT10plex

Para uma quantificação relativa dos peptídeos foram utilizados 25 µg de cada amostra, além da produção de um controle de qualidade, que consistiu em um conjunto de todas as amostras a serem analisadas, também com a quantidade de 25 µg para cada set de análise. A marcação foi realizada com o kit TMT10plex (Thermo Scientific) de acordo com as instruções do fabricante. Brevemente, todos os reagentes e os peptídeos foram mantidos à temperatura ambiente. Posteriormente, as 10 *Tags* foram solubilizadas em 41 µL de acetonitrila, e cada amostra peptídica ressuspensa em 34 µL de brometo de tetraetilamônio (TEAB) (Sigma) (100 mM, pH 8,3). Todas as amostras tiveram seu pH verificado (ideal acima de 8) utilizando tiras universais de pH (escala de

pH de 0 a 14) para garantir a eficiência da marcação com o TMT. Para a marcação, seguiu-se com uma proporção de 1:14 μL (v/v) de mistura peptídica para de *Tag* isobárica (Quadro 1). Incubou-se a mistura por 1 hora à temperatura ambiente e verificou-se a eficiência de marcação em MALDI-TOF, utilizando a matriz α -cyano.

Após a verificação da presença da marcação nos peptídeos de cada amostra, estas foram combinadas em três conjuntos e completamente secas em centrífuga a vácuo para posterior análise em cromatografia líquida (Quadro 1).

Quadro 1. Relação das amostras e as *Tags* isobáricas utilizadas para a marcação por TMT10plex.

<i>Tags</i>	Set 1	Set 2	Set 3
126	KRAS 1	WT 1	FGFR4
127N	KRAS 2	WT 2	FGFR 5
127C	KRAS 3	WT 3	-
128N	KRAS 4	WT 4	-
128C	KRAS 5	TRPV4 1	-
129N	KRAS 6	TRPV4 2	-
129C	FGFR 1	TRPV4 3	-
130N	FGFR 2	TRPV4 4	-
130C	FGFR 3	TRPV4 5	-
131	CONTROLE 1	CONTROLE 2	CONTROLE 3

5.2.4 Enriquecimento de fosfopeptídeos

Após a marcação com TMT, os três *sets* de amostras prosseguiram para o enriquecimento de fosfopeptídeos com dióxido de titânio (TiO_2), conforme descrito por Melo-Braga et al. 2015 (MELO-BRAGA et al. 2015). Para o enriquecimento dos fosfopeptídeos, foi utilizado uma proporção de 0,6 mg de resina de TiO_2 para 100 μg de peptídeos dessalinizados e marcados com TMT, em cada *set* de amostras. Os peptídeos dos 3 *sets* foram ressuspensos em uma solução contendo 80% de acetonitrila, 5% TFA e 1 M ácido glicólico (Sigma) e as respectivas quantidades de resina de TiO_2 foram adicionadas para cada *set* de amostras, e, posteriormente, incubou-se a mistura por 10 minutos em agitação constante. Após a centrifugação de 15 segundos, à temperatura ambiente, os sobrenadantes foram transferidos para novos tubos, contendo a metade da quantidade de TiO_2 utilizada na primeira incubação e repetiu-se o processo de incubação e centrifugação. Esta etapa foi realizada

para aumentar a eficiência do enriquecimento dos fosfopeptídeos. Os sobrenadantes foram novamente coletados e nomeou-se essa fração de proteoma total (PT), correspondente aos peptídeos não modificados. Novamente, foram adicionados 100 µL de 80% de acetonitrila, 5% TFA e ácido glicólico 1 M às resinas de TiO₂ das duas incubações. As misturas foram vortexadas e centrifugadas por 15 segundos, à temperatura ambiente. Os sobrenadantes removidos foram adicionados aos seus respectivos PTs. As resinas contendo os peptídeos fosforilados foram submetidas a dois processos de lavagens. No primeiro, adicionou-se 100 µL de tampão de lavagem 1 (80% de acetonitrila, 1% TFA) para garantir a remoção de peptídeos hidrofóbicos não modificados. No segundo, adicionou-se 100 µL de tampão de lavagem 2 (10% acetonitrila, 0,1% TFA) para remoção de peptídeos hidrofílicos não modificados e glicopeptídeos neutros. As amostras foram vortexadas e centrifugadas por 15 segundos, e os sobrenadantes coletados foram adicionados aos respectivos PTs em cada etapa.

Posteriormente, as resinas foram completamente secas em centrífuga a vácuo por aproximadamente 10 minutos. Os fosfopeptídeos foram eluídos em 100-150 µL de 1,5% de hidróxido de amônio (pH ≥ 11,3) com vortexação e incubação sob agitação constante por 10 minutos, para uma eluição eficiente. Em seguida, as soluções foram centrifugadas por 1 minuto e o sobrenadante foi transferido para uma ponteira contendo um *plug* de C18 para garantir que toda a resina de TiO₂ fosse removida da amostra.

Os peptídeos fosforilados foram acidificados enquanto os peptídeos não modificados correspondentes ao PT foram secos em centrífuga a vácuo. Todos os peptídeos foram submetidos novamente ao processo de dessalinização em colunas SepPak C18 para os do proteoma total e coluna contendo R3 para os fosfopeptídeos. Brevemente, a coluna foi ativada com 100% acetonitrila e posteriormente condicionada com 0.1% de ácido fórmico. A amostra foi então adicionada à coluna e duas lavagens com 0,1% de ácido fórmico foram realizadas na coluna. Os peptídeos dessalinizados foram eluídos em duas etapas: (1) com 500 µL da solução de 60% de acetonitrila e 0.1% de ácido fórmico e na etapa (2) com 500 µL 70% de acetonitrila e 0.1% de ácido fórmico.

Os eluatos foram completamente secos em *SpeedVac* e armazenados em -20°C até o momento das análises por LC-MS/MS.

5.2.5 Pré-fracionamento dos peptídeos do proteoma total por Cromatografia Líquida em Fase Reversa

Os peptídeos do proteoma total foram pré-fracionados para redução da complexidade da amostra e melhoria da etapa de identificação das proteínas. As frações do proteoma total foram inicialmente reconstituídas em 200 mM de formato de amônio de pH 9,3 (Solução A) e submetidas ao pré-fracionamento realizado em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) (Ultimate 3000 HPLC, (Dionex, EUA)), contendo uma coluna de C18 (C18 Acquity UPLC M-Class Peptide CSH (Waters, EUA)). A separação dos peptídeos foi realizada a um fluxo de 10 µL/min, utilizando o gradiente do solvente B (acetonitrila 80% / 20% da solução A): 2-40% durante 27 min; 40-50% por 4 min; 50-70% por 4 min e 70-95% por 5 min. Foram obtidas 15 frações de peptídeos, que foram automaticamente concentradas em apenas cinco, em adição a fração que não interagiu com a coluna cromatográfica. Posteriormente, todas as porções foram secas em uma centrífuga a vácuo e armazenadas a -20°C até o momento da aquisição dos dados.

5.2.6 Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa (LC-MS/MS)

Os peptídeos marcados com TMT, tanto os pré-fracionados (proteoma total) quanto os peptídeos fosforilados foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1% e injetados no HPLC de nanofluxo EASYnLC (Thermo Scientific). Foi utilizado um sistema composto por duas colunas, sendo uma pré-coluna de C18 (coluna de sílica, 2 cm de comprimento, 100 nm de diâmetro interno e 5 µm de diâmetro das partículas) e uma coluna também de C18 (17 cm de comprimento, 75 nm de diâmetro interno, diâmetro das partículas iguais a 3 µm). O solvente A foi composto por 0,1% de ácido fórmico e o solvente B foi formado por 90% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico. O gradiente cromatográfico utilizado para separar as amostras pré-fracionadas do proteoma total foi (em porcentagem do solvente B): 1-7% por 3 min; 7-28% em 50 min;

28-45% em 10 min; 45-100% em 3 min, sendo o fluxo mantido em 250 nL/min. Já o gradiente utilizado para separar os peptídeos fosforilados foi: 1-3% por 3 min; 3-22% em 120 min; 22-40% em 20 min; 40-95% em 3 min.

Os peptídeos eluídos da coluna analítica foram ionizados por *nanoelectrospray* e direcionados para o espectrômetro de massa Q-Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher). Foi utilizado o modo Aquisição Dependente de Dados (do inglês *Data Dependent Acquisition, DDA*). Os íons de peptídeos do proteoma total e do fosfoproteoma foram resolvidos no Orbitrap, na faixa entre 400 a 1600 m/z e 350 a 1400 m/z, respectivamente, ambos com uma resolução de 120.000 FWHM. A cada espectro de massa, os 15 íons mais intensos (Top 15) para o proteoma total e os Top 10 do fosfoproteoma foram selecionados no quadrupolo, usando uma janela de isolamento igual a 1,2 m/z, para fragmentação por dissociação por colisão em alta energia (HCD), com uma energia de colisão normalizada de 34. Os fragmentos originados foram resolvidos no Orbitrap, em uma faixa entre 110 e 2000 m/z, e com uma resolução de 60.000 (PT) e 45.000 (fosfo) FWHM.

5.2.7 Análise de dados proteômicos gerados em LC-MS/MS

As análises de dados prosseguiram com o processamento dos dados brutos no Proteome Discoverer 2.4 (Thermo Scientific) e com a busca contra as proteínas revisadas do banco de dados de *Homo sapiens* do UniProt (20.302 entradas). Foi utilizado o servidor Sequest para a realização da busca e comparação dos espectros preditos/experimentais, utilizando os seguintes parâmetros de busca: i) máximo de duas ausências de sítios de clivagens de tripsina; ii) carbamidometilação de cisteína como modificação fixa, iii) oxidação de metionina e acetilação de N-terminal da proteína como modificações variáveis, iv) tolerância de massa do precursor e dos fragmentos de 10 ppm e 0,02 Da, respectivamente, v) 1% de *false discovery rate* (FDR). Adicionalmente, na busca do fosfoproteoma foi utilizado como modificação variável a fosforilação nos resíduos de serina, treonina e tirosina.

Somente as proteínas que apresentaram sinal no controle de qualidade foram incluídas no estudo. Os dados foram filtrados quanto à presença de

leitura nas amostras, considerando 70% de valores válidos no total de amostras utilizando o Perseus (versão 1.6.14.0). A estratégia de utilizar vários *sets* na análise por TMT implica na geração de vieses no dado induzidos durante a corrida, como alterações na abundância que não correspondem ao real, por isso uma adequada normalização desses *sets* garante a correta avaliação dos dados (BRENES *et al.*, 2019). Portanto, tanto os dados proteômicos quanto os fosfoproteômicos foram normalizados pela razão entre as intensidades das amostras e as intensidades dos CQ dos respectivos *sets*. Posteriormente, os dados foram transformados em \log_2 , seguidos da normalização por subtração da mediana por coluna e da subtração pela média das linhas. Os peptídeos fosforilados foram normalizados pelo nível de suas respectivas proteínas.

Os dados foram avaliados por LIMMA teste, realizado na plataforma NormalyzerDE (Willforss, Chawade, Leveer, 2019). Foram utilizados p -valor $<0,05$ e \log_2 *fold change* $\geq 0,58$ ou $\leq -0,58$ para selecionar as proteínas alteradas.

5.2.8 Análise de correlação biológica

As proteínas totais identificadas foram avaliadas quanto à localização celular e ao processo biológico na plataforma Panther DB.

Os dados gerados na avaliação do proteoma total e fosfoproteoma foram avaliados quanto ao grau da correlação entre as amostras pelo método de correlação de Pearson, analisados na plataforma do MetaboAnalyst 5.0.

Devido à alta complexidade dos dados gerados, filtraram-se as proteínas alteradas (p -valor $<0,05$ e \log_2 *fold change* $\geq 0,58$ ou $\leq -0,58$) em cada grupo para a construção do perfil proteico relacionado a cada gene. As proteínas foram selecionadas de acordo com a abundância apresentada em cada grupo e foram construídos diagramas de Venn individuais para cada gene. As interseções observadas nos diagramas de Venn de cada grupo foram selecionadas como as proteínas que compõem o perfil proteico de cada gene.

Para o enriquecimento de vias das proteínas correspondentes ao perfil proteico selecionado para cada grupo, utilizou-se a plataforma PathDIP 4, usando o conjunto completo de base de dados, exceto para SMPDB e PharmGKB. Somente as vias que apresentaram FDR<0,05 foram consideradas para as avaliações posteriores.

Os fosfopeptídeos alterados foram avaliados na plataforma PhosphoSite Plus (HORNEBECK *et al.*, 2012) quanto a sua atividade biológica e quinases envolvidas.

5.3 Análise metabolômica da lesão de células gigantes dos maxilares

5.3.1 Padronização da análise metabolômica de tecidos parafinizados

Inicialmente as análises em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa foram padronizadas conforme metodologias adaptadas (Quadro 2) (DUARTE-ERADE *et al.*, 2019; T'KINDT *et al.*, 2010; YUAN *et al.*, 2012).

Quadro 2. Padronização do protocolo de extração de metabólitos de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina

Teste	Solvente	Proporção mg tecido: uL de solvente	Referência
1	CH ₃ OH:CHCl ₃ : H ₂ O (3:1:1)	1:20 1:40	T'Kindt et al., 2010
2	80% CH ₃ OH	1:20 1:40	Yuan et al., 2012
3	Polar - CH ₃ OH:H ₂ O (1:1) Apolar - CH ₂ Cl ₂ :CH ₃ OH (3:1)	1:20 1:40	Duarte-Andrade et al., 2019

Para todos os três testes seguiu-se o mesmo preparo de amostra. Dois cortes de 20 µm foram desprezados a fim de reduzir a contaminação contida na superfície dos blocos (KELLY *et al.*, 2011). Posteriormente, cortes de 20 µm foram coletados para se alcançar o peso de no mínimo 5 mg para cada amostra após a desparafinização dos tecidos. Com objetivo de facilitar o processo de cortes dos blocos de parafina e também evitar o desperdício de

tecido dos blocos parafinizados, foi desenvolvida uma fórmula que considera a densidade de cada corte e a área de cada bloco para mensurar aproximadamente quantos cortes seriam necessários para atingir 5 mg de tecido. O cálculo foi baseado na densidade ($d=m/v$). Para determinar o volume, foi considerada a área do tecido parafinado a partir da delimitação no programa ImageJ. A altura do tecido consistiu na espessura dos cortes multiplicado pelo número de cortes. Inicialmente, foram utilizados tecidos parafinizados como teste, para obtenção da densidade média. Posteriormente, essa densidade média foi utilizada para o cálculo da previsão do número de cortes necessários para obterem-se 10 mg, através da fórmula: Número de cortes = peso / (densidade x espessura x área).

O processo de desparafinização consistiu em quatro lavagens com 1 mL de xileno (Sigma), por centrifugação a 15000 xg, por 5 minutos a 4°C. As amostras foram completamente secas em banho seco a 37°C. Após a mensuração das massas de cada amostra adicionou-se os três tipos de solvente de extração (Quadro 2), sempre mantendo as proporções de 1:20 ou 1:40 mg de tecido por μL de solvente de extração. As amostras foram vortexadas, incubadas em gelo por 10 minutos, novamente vortexadas e submetidas à sonicação em banho ultrassônico por 10 minutos. Os extratos foram centrifugados a 15000 xg por 15 minutos, 4°C e o sobrenadante foi filtrado em filtro de 0,22 μm , com 13 mm de diâmetro. Posteriormente, as amostras foram adicionadas a insertos contidos em *vials* de vidro, fechados, e armazenados a -70°C até o momento da análise em LC-MS.

5.3.2 Análise em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa

As análises em LC-MS foram realizadas no laboratório de espectrometria de massa, do Departamento Engenharia Sanitária e Ambiental (DESA), da Escola de Engenharia da UFMG, sob supervisão das professoras Dr^a Liséte Celina Lange e Dr^a Lucilaine Valéria de Souza Santos. Foi utilizado um HPLC (Shimadzu, Co.Japão) acoplado a um espectrômetro de massa do tipo quadrupolo *time-of-flight* (QTOF) com fonte de ionização do tipo *electronic spray ionization* (ESI) (ESI-micro QTOF II, Bruker). O método de separação

testado foi em coluna de fase reversa, TITAN C18 (5 cm X 2.1 mm, partícula 1.9 µm, Discovery, Supelco), mantida a 40°C. As fases móveis para a análise em modo positivo foram compostas de A: água ultrapura + 0,1% de ácido fórmico, e B: acetonitrila + 0,1% ácido fórmico. Enquanto que para o modo negativo utilizou-se, A: água ultrapura e B: acetonitrila, sem a adição de 0,1% ácido fórmico.

Foram injetados 10µL de amostra em cada injeção. O gradiente de eluição aplicado foi: 25-95% de fase móvel B por 20 minutos (separação dos compostos), 95% de B por 3 minutos (remoção dos compostos mais retidos), 95-20% B por 2 minutos (retorno às condições iniciais da corrida) e 20% de B por 5 minutos (condicionamento da coluna), com um fluxo de 0,3 mL/min.

O espectrômetro de massa foi operado em modo positivo e negativo. A voltagem da interface ESI foi de 4,5 kV no modo positivo e 3,5 kV no modo negativo. Os espectros foram obtidos na faixa de 90 a 1200 m/z. O *software* de aquisição de dados foi o *Bruker Compass*.

5.3.3 Metabolômica de lesões de células gigantes dos maxilares

Avaliação do metaboloma das lesões de células gigantes com mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS*, *FGFR1* foi realizada em 20 casos (Tabela 1). Prosseguiu-se a extração dos metabólitos de tecidos fixados em formalina e emblocados em parafina utilizando o protocolo do teste 1, seguindo os mesmos processos descritos no item 5.3.1. Brevemente, após os cortes e a desparafinização dos tecidos, a mistura de solvente de extração, metanol, clorofórmio e água (3:1:1) foi adicionada a cada amostra em uma proporção de 1 mg de tecido: 20 µL de solvente. Seguiu-se com os processos de incubação no gelo, sonicação e clarificação do extrato de metabólitos. Após a filtragem em 0,22 µm, 10 µL de cada amostra foram coletados para a produção de um controle de qualidade (CQ), que posteriormente foi utilizado durante a corrida cromatográfica, para avaliar a estabilidade da plataforma analítica.

Tanto os CQs quanto as amostras foram adicionados a insertos contidos em *vials* de vidro que foram hermeticamente fechados, e armazenados a -70°C até o momento da análise em LC-MS.

A análise das amostras de LCG em LC-MS foi realizada seguindo os mesmos parâmetros do item 5.3.2.

5.3.4 Análise de dados metabolômicos

Os dados de LC-MS obtidos na análise dos casos de LCG em extensão *.d foram convertidos em *mzXML no software ProteoWizard (versão 3.0.20020) (CHAMBERS *et al.*, 2012). A conversão foi necessária para adequação da extensão dos dados para análise na plataforma do XCMS (versão 3.8.2) em R (versão 3.6.2) (SMITH *et al.*, 2006).

As análises dos dados no modo positivo e negativo foram otimizadas utilizando o pacote do R chamado IPO (em inglês *Isotopologue Parameter Optimization*) (versão 1.12.0) (LIBISELLER *et al.*, 2015). A otimização ocorreu em duas etapas consecutivas, utilizando os controles de qualidade da metabolômica de LCG. A primeira etapa consistiu em uma otimização com base nos parâmetros *default* do IPO. Para a primeira rodada de otimização apenas alguns parâmetros foram considerados para a otimização, devido à programação padrão do pacote, tais como o ppm, *peakwidth*, *mzdiff* para a detecção de picos (*peak picking*) e alinhamento e tempo de retenção (*retcor*). Após a análise dos resultados dessa primeira otimização, determinaram-se quais seriam os intervalos de valores de cada parâmetro a ser otimizado. Com base nos resultados após a detecção de picos, alinhamento e correção do tempo de retenção dos melhores parâmetros das otimizações 1 e 2, selecionou-se o otimizado 2 como o melhor protocolo para a análise dos dados gerados por LC-MS.

Para o processamento dos dados de LC-MS no modo positivo utilizou-se o método de “*centWave*” com os seguintes parâmetros: *snthresh*: 5.92; *peakwidth*: 22,6 e 62,5; ppm: 31; *mzdiff*: 0.0023; *prefilter*: 6 e 420; *noise*: 1. O método de *obiwarp* foi o utilizado na correção do tempo de retenção com os parâmetros de *gapInit*: 0.2; *gapExtend*: 2.3; *bw*: 2; *profStep*: 0.8; *minfrac*: 0.7 e

mzwid: 0.06. Para o modo negativo foram considerados os seguintes parâmetros no método de *centWave*: *snthresh*: 8.1; *peakwidth*: 14 e 155; ppm: 45.5; *mzdiff*: 0.002; *prefilter*: 3.7; *noise*: 800. O método de *obiwarp* foi o utilizado na correção do tempo de retenção com os parâmetros de *gapInIt*: 0.525; *gapExtend*: 1.91; *bw*: 2.5; *profStep*: 0.59; *minfrac*: 0.94; *mzwid*: 0.015. Em todos os dados, foi aplicada a ferramenta de *fillpeaks* durante o processamento, com o objetivo de eliminar os *missing values*.

Após o processamento dos dados no XCMS aplicou-se aos dados brutos do modo negativo e positivo um filtro manual de faixa de tempo de análise, compreendendo o tempo de retenção de 2,5 a 20 minutos, não sendo considerados o volume morto da corrida e a etapa de lavagem e condicionamento da coluna respectivamente. Durante o processamento dos dados, alguns picos verdadeiros podem ser divididos, gerando dois ou mais picos com massas e tempo de retenção muito próximos e são considerados uma duplicidade. Tal fato acontece devido à incorreta adequação dos parâmetros de detecção de picos. Por isso, avaliou-se a geração de duplicidade de *molecular features*, utilizando filtros manuais de tolerância de 5 ppm para os valores de *m/z* e 2,5 minutos de tempo de retenção. Para verificar se realmente os *features* selecionados se tratavam de duplicidades, aplicou-se um teste de correlação de Pearson no Excel considerando as intensidades de todas as amostras para cada *feature*. Adotou-se um valor maior ou igual a 0,7 na correlação de Pearson para determinar se realmente ocorreu uma duplicidade, pois, se as intensidades apresentam uma alta correlação, provavelmente se tratam de duplicidades. Os *features* que apresentaram essa característica foram eliminados da análise.

Posteriormente à filtragem do tempo de retenção e avaliação de duplicidades, os dados do modo positivo e negativo foram avaliados quanto a porcentagem de *missing values*, filtrados quanto ao desvio padrão relativo dos controles de qualidade, ao *interquantile range*, normalizados pela mediana, transformados em log e centralizados pela média, na plataforma do MetaboAnalyst 4.0 (CHONG et al., 2018). No que concerne à avaliação de *missing values* foi obtido um valor menor que 1% tanto no modo positivo

quanto no negativo de ausência de valores considerando todas as leituras. Os *features* que apresentaram uma porcentagem igual ou maior que 20% de *missing values*, considerando todas as amostras, foram eliminados da análise (GUIDA *et al.*, 2016), e então aplicou-se a estratégia de imputação de *missing values* de substituição pelo menor valor positivo da matriz de dados (*replace by a small value*). Os *features* foram filtrados quanto ao desvio padrão relativo dos controles de qualidade que apresentavam porcentagem maior ou igual 25%.

Os dados normalizados e transformados foram então submetidos à análise multivariada não supervisionada de componentes principais (PCA) e supervisionada de regressão por mínimos quadrados parciais (PLS-DA). As análises multivariadas, bem como a avaliação de *outliers* de todas as amostras, foram realizadas no SIMCA-P+ (versão 14.1) (Umetrics). Avaliações por estatísticas univariadas também foram empregadas, como o teste de Komolgorov Smirnov com correção de Lilliefors, para avaliar a normalidade dos dados; o Teste-T, avaliando grupos de 2 a 2, juntamente com o teste não paramétrico Mann-Whitney U, realizados no *software* SPSS (versão 26). Apenas os *molecular features* significativos que apresentaram um *fold change* (FC) maior ou igual a 2 foram encaminhados para a identificação.

A identificação dos *molecular features* significativos foi realizada por meio de buscas dos m/z em base de dados públicas como Ceu Mass Mediator (versão 3.0), utilizando os seguintes adutos para o modo positivo: [M+H], [M+2H], [M+Na], [M+ACN+H] e [M+CH₃OH+H]; e para o modo negativo: [M+Cl], [M-H] e [M-H-H₂O], considerando um erro de massa máximo de 30 ppm (GIL DE LA FUENTE *et al.*, 2018). Outras bases de dados como *Human Metabolome Database* – HMDB, Pubchem e *Kyoto Encyclopedia of Genes e Genomes* – KEGG foram utilizadas para auxiliar na identificação dos dados (KANEHISA *et al.*, 2006; WISHART *et al.*, 2007).

Considerando a complexidade da etapa de identificação dos metabólitos, foi necessário adotar estratégias como a avaliação de padrão isotópico dos possíveis metabólitos em comparação com os *features* detectados na análise. Para isso, a ferramenta *online*, calculadora de padrão isotópico, enviPat web 2.4 (<https://www.envipat.eawag.ch/index.php>) foi

utilizada para gerar os padrões correspondentes aos possíveis metabólitos, enquanto para os *features* detectados na análise, os padrões foram avaliados no *software* EL-MAVEN (versão 0.9.1). Os *features* que apresentaram padrão isotópico teórico semelhante ao padrão experimental foram considerados identificados.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1 Análise proteômica e fosfoproteômica da lesão de células gigantes dos maxilares

6.1.1 *Padronização da proteômica total e fosfoproteômica em tecidos parafinizados*

A fosfoproteômica é uma técnica de análise de fosfopéptidos, baseada em espectrometria de massa, em ascensão nas áreas ômicas. Diversas matrizes biológicas podem ser utilizadas como amostras para extração de proteínas e posterior análise dos fosfopéptidos, como tecido, cultura celular, microrganismos, biofluidos e tecidos parafinizados (MANN; JENSEN, 2003). Embora a disponibilidade de tecidos parafinizados seja grande, ainda há poucos estudos que utilizam estes tecidos como fonte para a extração de proteínas, visando análises pós traducionais (GÁMEZ-POZO *et al.*, 2011; OSTASIEWICZ *et al.*, 2010; WAKABAYASHI *et al.*, 2014; PIEHOWSKI *et al.*, 2018;). Dentro deste contexto, vale ressaltar as vantagens da utilização dos materiais parafinizados, como a já mencionada disponibilidade, além da preservação da estrutura do tecido, facilidade e baixo custo de armazenagem (GUSTAFSSON; ARENTZ; HOFFMANN, 2015).

Por outro lado, o processo de fixação gera modificações nas moléculas, como a formação de *crosslinks* entre proteínas-proteínas e proteínas-outras moléculas, dificultando a análise proteômica e identificação por espectrometria de massas (MAES *et al.*, 2013; GUSTAFSSON; ARENTZ; HOFFMANN, 2015). Esses *crosslinks* são mantidos por pontes de metileno formadas entre aminoácidos modificados pela formalina, principalmente lisina, arginina, histidina e cisteína, e proteínas/outras biomoléculas (MAES *et al.*, 2013; GUSTAFSSON; ARENTZ; HOFFMANN, 2015). Modificações em lisina causam uma implicação em particular com a técnica de quantificação relativa utilizada no estudo, a marcação por TMT. Devido ao fato da marcação por TMT ocorrer em amins livres, como no N-terminal de proteínas e na cadeia lateral de lisina a ocorrência de modificações na lisina pode reduzir a eficiência de marcação (ROURKE; PADULA, 2016).

Para contornar os efeitos causados pela formação de *cross-links* algumas abordagens podem ser realizadas para quebrar essas ligações e expor as proteínas e outras moléculas para as análises. A abordagem mais utilizada é a recuperação antigênica por indução de calor (em inglês *heat-induced antigen retrieval* – HIAR), amplamente utilizada na avaliação imunohistoquímica (GUSTAFSSON; ARENTZ; HOFFMANN, 2015). Com o aquecimento, ocorre a liberação das moléculas ligadas por clivagem das pontes de metileno formadas durante o processo de fixação. Diante do fato que o aquecimento pode ocasionar a desnaturação proteica, soluções tamponantes são utilizadas para estabilização das proteínas durante o processo de aquecimento (GUSTAFSSON; ARENTZ; HOFFMANN, 2015; ROURKE; PADULA, 2016).

Protocolos direcionados para estudos proteômicos utilizam diversos métodos de extração de proteínas que variam de acordo com a amostra utilizada. É comum o uso de surfactantes e detergentes como ureia, Ditiotreitól (DTT), bem como a associação de tampões e de lises físicas como a sonicação (COX; EMILI, 2006). A ureia tem um amplo uso para extração de proteínas em análises proteômicas e possui vantagens, como solubilização e eficiência de extração de proteínas. Entretanto, a ureia, se aquecida, causa interferências em outros processos, como a marcação por *tags* isobáricas, devido a modificações nas aminas primárias das proteínas, impedindo a marcação (KOLLIPARA; ZAHEDI, 2013; SOLARI *et al.*, 2015). Visto que grande parte dos protocolos de extração utiliza ureia e, no caso de utilização de tecidos parafinizados, faz-se necessário a etapa de aquecimento para quebra dos *cross-links*, o presente estudo buscou a utilização de processos de extração de proteínas em que se pudesse garantir a eficiência de extração, utilizando o aquecimento das amostras.

Diante disso, a extração de proteínas de blocos de tecidos parafinizados para a análise das amostras de LCG foi realizada com adaptações que permitiram a análise dos fosfopeptídeos. Com base no estudo de Piewoski 2018, adaptou-se um protocolo utilizando TFE para extração que permitiu um rendimento considerável na extração proteica: em torno de 120 µg de proteínas

totais para cada amostra (PIEHOWSKI *et al.*, 2018). A extração consistiu na utilização de TFE, em um tampão para proteção das proteínas. O TFE vem sendo utilizado para extração de proteínas de tecidos parafinizados e tem se mostrado bastante eficaz quando comparado, por exemplo, com a extração com SDS (Dodecil Sulfato de Sódio), (WANG *et al.*, 2005; PIEHOWSKI *et al.*, 2018; COSCIA *et al.*, 2020).

A qualidade da digestão das proteínas foi avaliada em MALDI-TOF, onde se verificou que a tripsinização gerou peptídeos de tamanhos variados de 700 a 3000 Da (Figura 4.A). Na mesma análise, a eficiência do processo triptico foi demonstrada devido à ausência de picos de pesos moleculares acima de 7000 Da. Tal resultado corresponde à eficiente digestão proteica, visto que moléculas com tamanhos maiores que 10000 Da correspondem a proteínas (Figura 4.B).

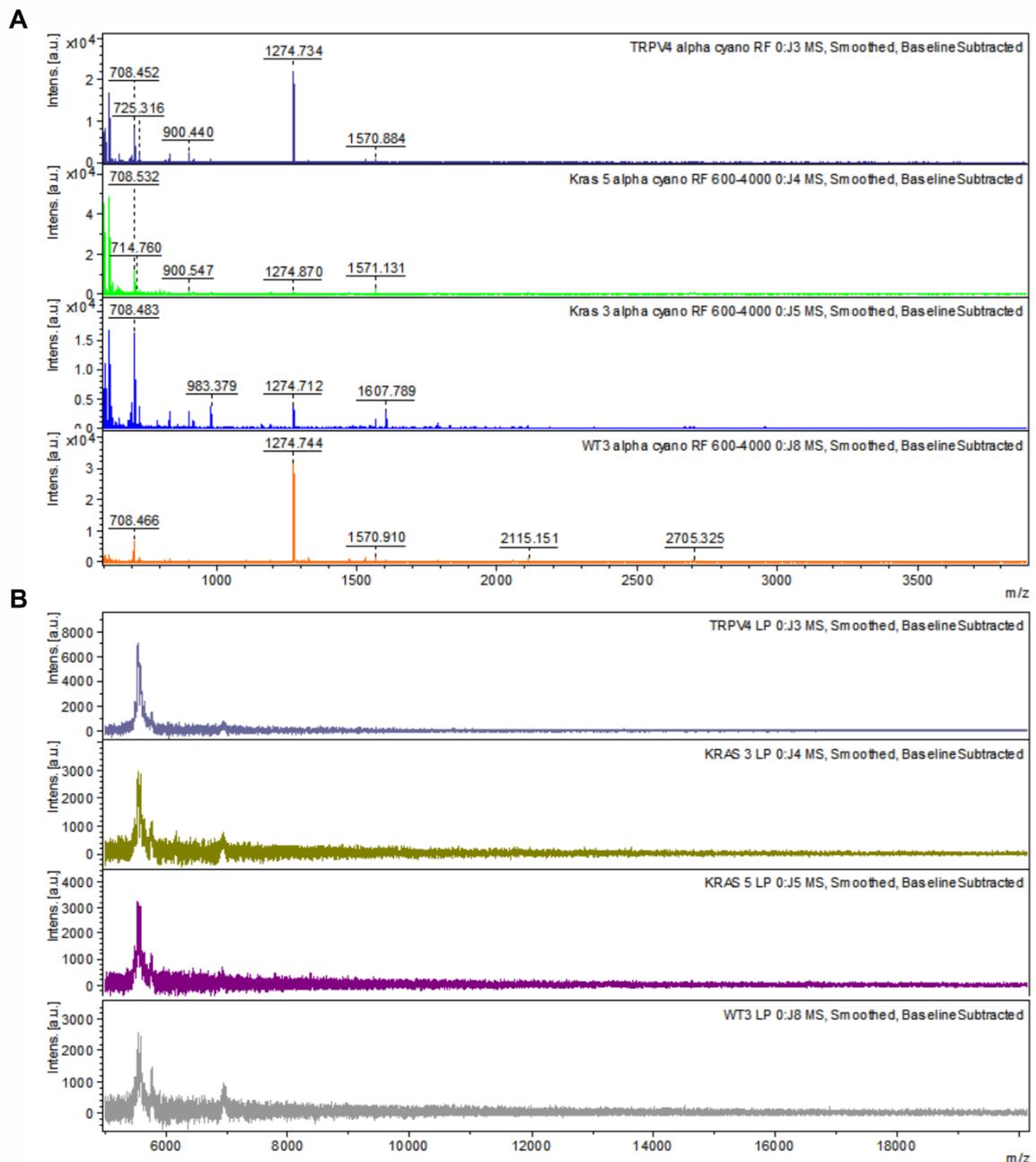


Figura 4. Análise da qualidade e eficiência da digestão de proteínas por tripsina avaliada por MALDI-TOF. A. Espectro correspondente a moléculas de tamanhos menores de 500 a 4000 Da provenientes das proteínas digeridas por tripsina. Perfil compatível com peptídeos tripticos.

Após o processo de tripsinização, prosseguiu-se com a marcação por TMT, onde novamente a eficiência do processo foi avaliada por MALDI-TOF. Os três sets avaliados apresentam os picos correspondentes às marcações isobáricas por TMT (Figura 5). Destaca-se que cada set apresentou o número

de picos correspondente a quantidade de marcação utilizada, além do m/z de cada pico confirmar a identificação das marcações mencionadas no quadro 1.

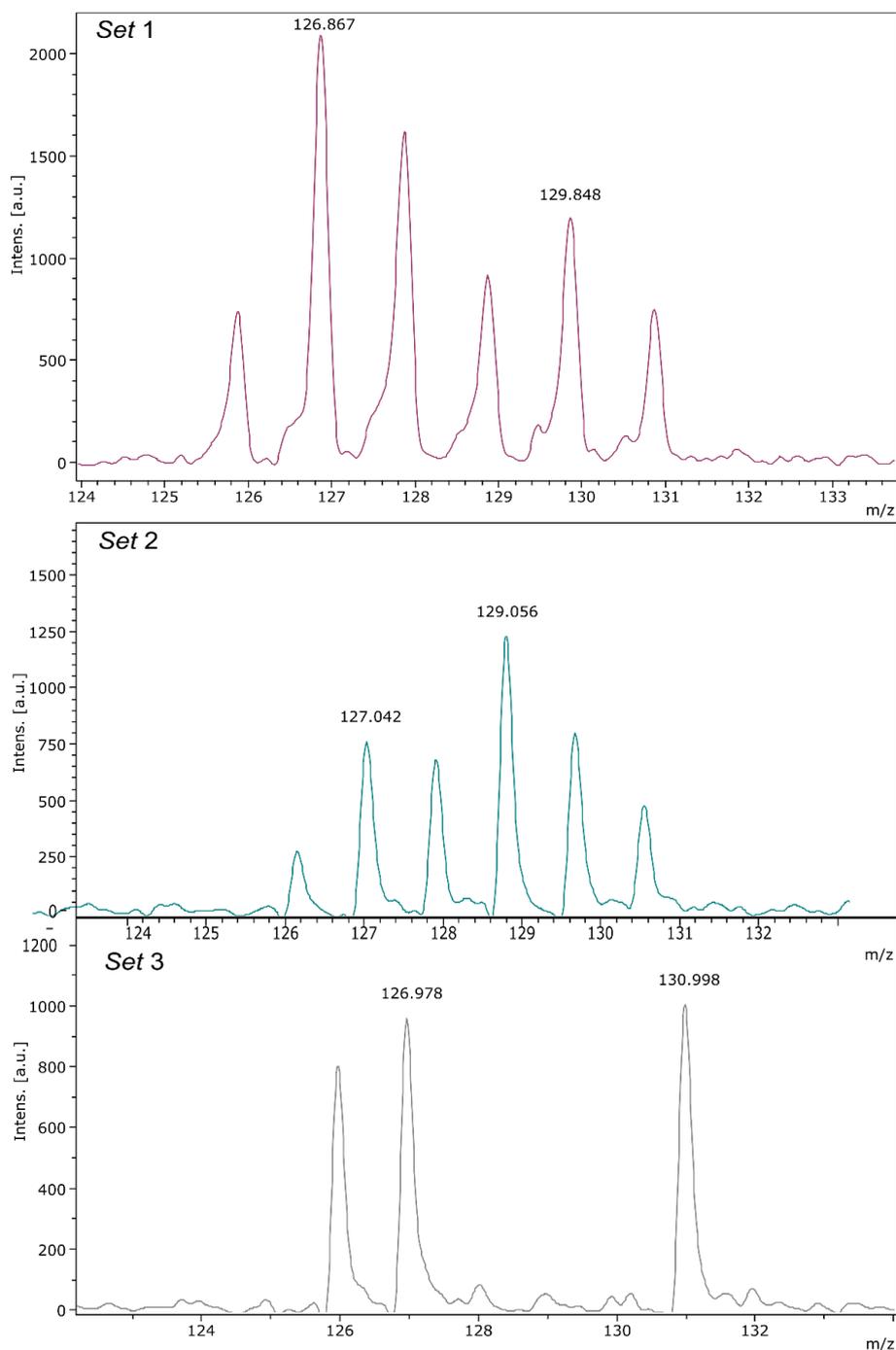


Figura 5. Espectros dos peptídeos tripticos após a marcação por TMT e combinação em 3 sets de análise. Para os sets 1 e 2 utilizou-se as marcações 126, 127 C e N, 128 C e N, 129 C e N, 130 C e N e 131. No set 3 somente as marcações 126, 127 C e N e 131 foram utilizadas. No espectro gerado as marcações que possuem tanto C ou N são visualizadas no mesmo pico, somente uma fragmentação MS2 possibilita a visualização das duas marcações.

Após a verificação das etapas da qualidade e eficácia do preparo de amostra, prosseguiu-se com a análise dos peptídeos do proteoma total e fosfoproteoma. Para a análise do proteoma total, os sets 1, 2 e 3 foram fracionados em 5 frações e avaliados em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massa, bem como os sets com os peptídeos fosforilados. Os cromatogramas de cada fração do proteoma total e dos fosfopeptídeos de cada set de análise apresentaram sinais do início ao fim da corrida, demonstrando que as condições de corrida cromatográfica foram adequadas para separação de peptídeos de pequenos a grandes tamanhos (Figuras 6,7 e 8).

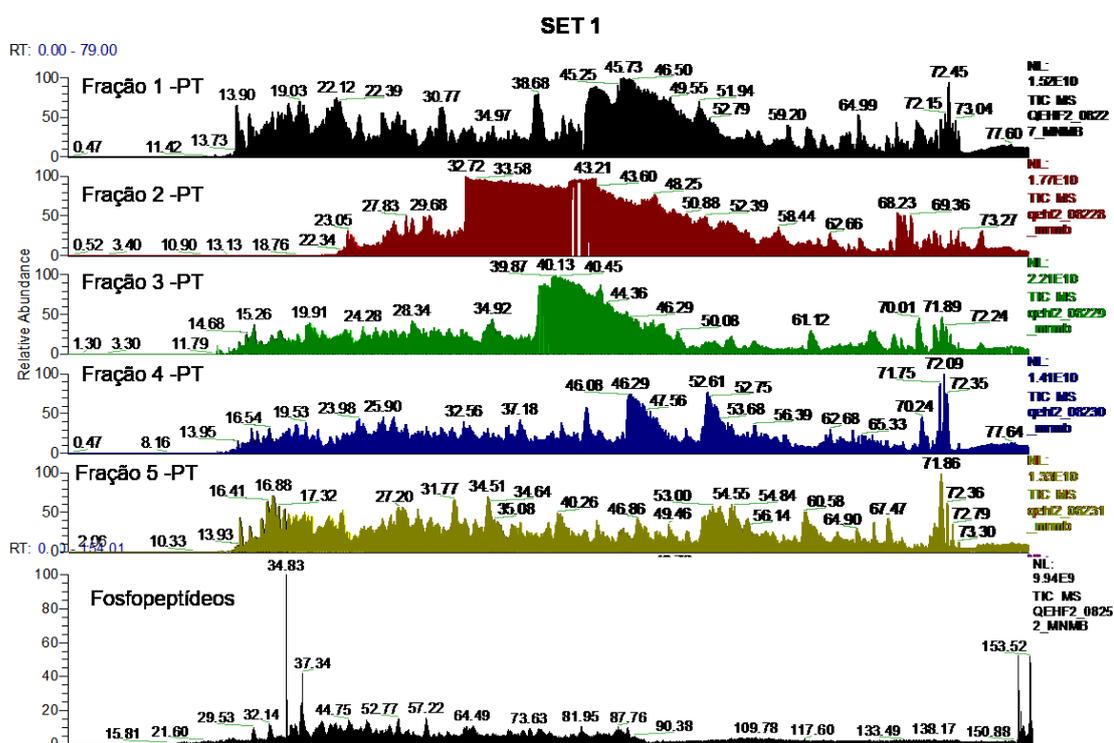


Figura 6. Cromatogramas das frações do proteoma total e do fosfoproteoma do set 1

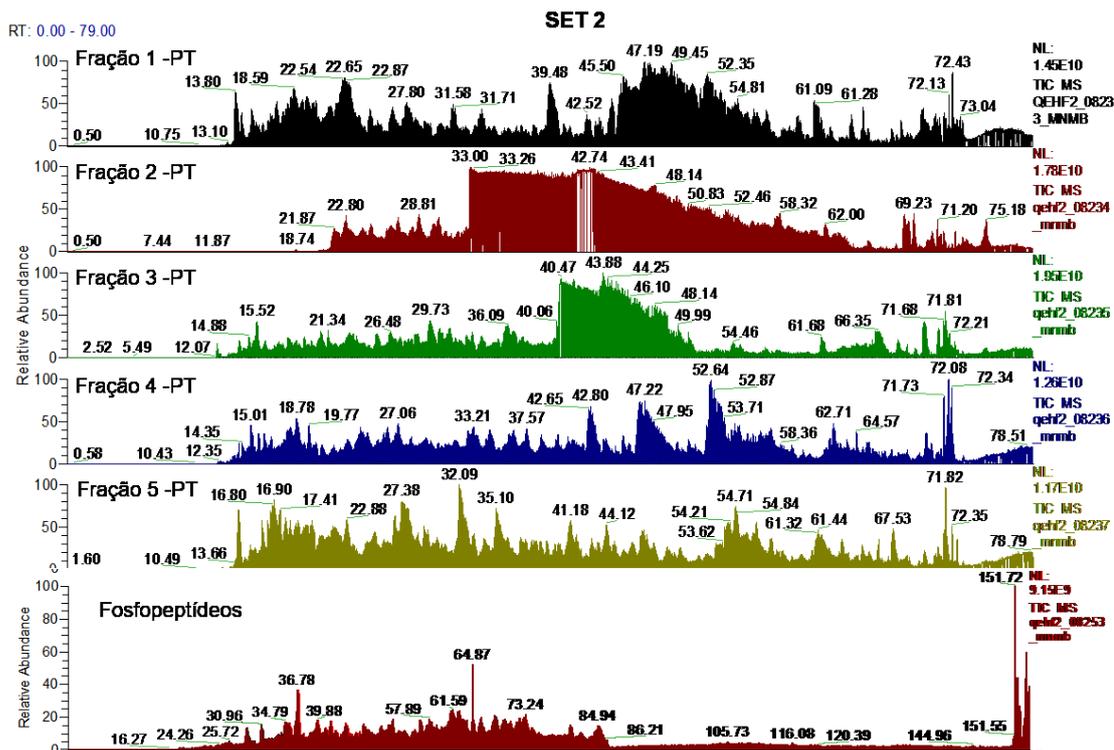


Figura 7. Cromatogramas das frações do proteoma total e do fosfoproteoma do set 2.

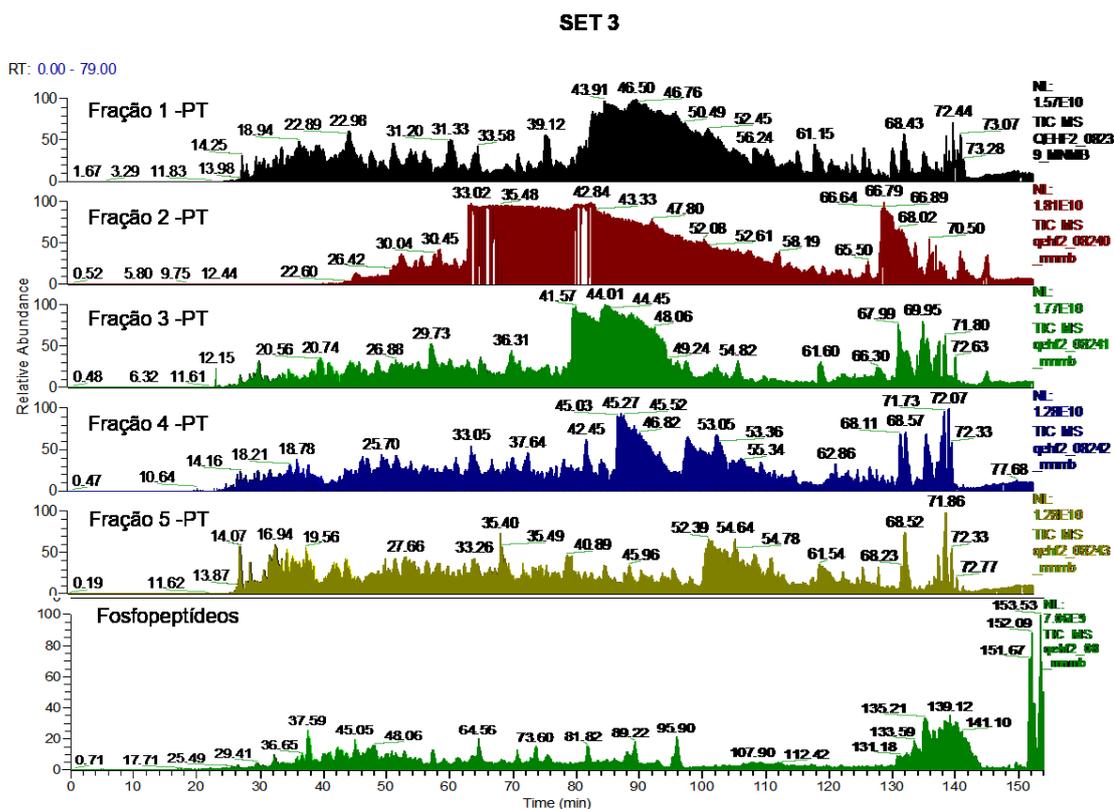


Figura 8. Cromatogramas das frações do proteoma total e do fosfoproteoma do set 3

Todas as etapas descritas de análise de dados foram padronizadas e ajustadas para os parâmetros mais adequados aos dados gerados. A partir disso a avaliação estatística e as demais análises foram realizadas a fim de obter um resultado com confiabilidade.

6.1.2 Proteômica total de lesão de células gigantes dos maxilares

A análise dos dados brutos gerados por LC-MS/MS apontou 46 fosfopéptidos e 928 proteínas. A interferência da quantidade de proteínas identificadas em análises de tecidos parafinizados já é um evento descrito, e alguns fatores estão associados como a formação de *crosslinks* com outras moléculas e até mesmo com proteínas, impossibilitando sua identificação e bloqueando o sítio de clivagem da tripsina (SINZ, 2010). A tripsina é uma enzima que atua na clivagem de proteínas e possui especificidade na clivagem entre os aminoácidos lisina e arginina. Como o processo de fixação pode alterar a amina livre na cadeia lateral de lisina, a etapa de clivagem pode ser afetada, reduzindo o número de identificações (OLSEN; ONG; MANN, 2004; GUSTAFSSON; ARENTZ; HOFFMANN, 2015).

Apesar das diversas limitações associadas a tecidos parafinizados, as proteínas identificadas foram associadas a vários compartimentos celulares e processos biológicos como regiões intra e extracelulares, membrana e organelas, além de envolvimento em ligação, transporte, atividade regulatória, catalítica e estrutural, dentre outros (Figura 9).

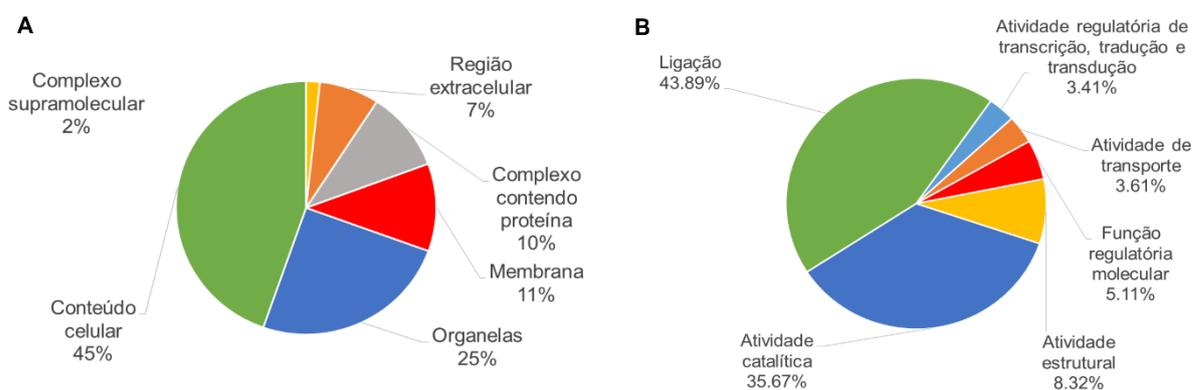


Figura 9. Localização celular e processos biológicos associados às proteínas identificadas em lesão de células gigantes dos maxilares. A. Localização celular das

proteínas identificadas. B. Processos biológicos associados às proteínas identificadas.

Para a análise foram consideradas todas as 928 proteínas identificadas no proteoma total.

Visto a diversidade de proteínas identificadas, cobrindo diferentes compartimentos celulares além de proteínas que desempenham funções distintas, a utilização de tecidos parafinizados pode ser considerada uma fonte viável de acesso ao proteoma celular.

Para identificar alterações no perfil proteômico em amostras LCG mutadas, foram analisadas as proteínas e fosfopeptídeos extraídos de amostras FFPE. Cento e noventa e oito proteínas (valor de $p < 0,05$ e $\log_2 FC \geq 0,58$ ou $\leq -0,58$) (Tabela 2) apresentaram níveis de abundância alterados.

Tabela 2. Proteínas que diferiram entre os grupos FGFR1, KRAS, TRPV4 e WT

Gene Symbol	KRAS x FGFR1		KRAS x WT		KRAS x TRPV4		FGFR x WT		FGFR x TRPV4		TRPV4 x WT	
	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC
TGM2	0.0032	-0.77	0.2985	-0.26	0.9653	-0.01	0.0597	0.51	0.0049	0.76	0.3353	-0.25
PDLIM3	0.0037	-0.64	0.0800	-0.38	0.0015	-0.72	0.2455	0.26	0.7092	-0.08	0.1361	0.34
ANXA5	0.0063	0.48	0.0004	0.71	0.0001	0.80	0.1970	0.23	0.0607	0.32	0.5950	-0.09
S100A7	0.0147	0.85	0.0006	1.38	0.0001	1.54	0.1483	0.53	0.0518	0.69	0.6596	-0.16
HP	0.0309	-0.80	0.9120	-0.04	0.2215	-0.43	0.0606	0.76	0.3216	0.36	0.3147	0.39
COL6A3	0.0324	0.37	0.3604	-0.16	0.0142	-0.43	0.0075	-0.53	0.0001	-0.80	0.1427	0.27
EIF5A	0.0352	0.48	0.0003	1.01	0.0068	0.64	0.0380	0.52	0.4741	0.16	0.1404	0.36
FMOD	0.0430	0.59	0.1754	0.41	0.2932	0.29	0.5553	-0.18	0.3122	-0.29	0.7096	0.11
GPX3	0.0432	-0.52	0.0081	-0.76	0.3354	-0.24	0.3880	-0.24	0.2748	0.28	0.0666	-0.52
LGALS3	0.0489	0.40	0.0009	0.79	0.0133	0.52	0.0790	0.39	0.5605	0.12	0.2106	0.27
IGHM	0.0517	-0.51	0.0252	-0.64	0.0250	-0.60	0.6497	-0.13	0.7373	-0.09	0.8897	-0.04
TXN	0.0588	0.67	0.0034	1.19	0.0062	1.03	0.1800	0.52	0.3231	0.36	0.6686	0.16
CPQ	0.0613	0.27	0.2644	-0.16	0.0145	-0.36	0.0090	-0.43	0.0002	-0.63	0.2042	0.20
EPB41L2	0.0662	-0.28	0.0044	-0.50	2.46E-05	-0.80	0.1955	-0.22	0.0031	-0.52	0.0806	0.30
NDRG1	0.0746	0.35	0.0013	0.73	2.15E-05	1.01	0.0725	0.39	0.0023	0.67	0.1786	-0.28
TCEAL3	0.0749	-0.43	0.3942	0.21	0.1844	-0.31	0.0198	0.64	0.6342	0.11	0.0508	0.52
ARHGDIB	0.0754	-0.31	0.1852	0.24	0.0594	0.33	0.0069	0.54	0.0014	0.63	0.6330	-0.09
CFH	0.0793	-0.41	0.0520	-0.49	0.0007	-0.89	0.7526	-0.08	0.0496	-0.48	0.1143	0.40
FBLN2	0.0802	-0.41	0.0491	-0.50	0.0094	-0.65	0.7276	-0.09	0.3344	-0.23	0.5687	0.14
DECR1	0.0868	-0.18	1.57E-05	-0.59	0.0003	-0.44	0.0011	-0.42	0.0199	-0.26	0.1653	-0.16
AK1	0.0897	0.25	0.6648	-0.07	0.0102	-0.40	0.0556	-0.32	0.0003	-0.65	0.0448	0.33
OSTF1	0.0908	0.32	0.0057	0.60	0.0009	0.71	0.1839	0.28	0.0544	0.39	0.5877	-0.11
FBN1	0.0909	-0.59	0.0294	-0.84	0.0436	-0.72	0.5200	-0.24	0.7207	-0.13	0.7575	-0.12
LTBP2	0.0947	-0.55	0.0919	-0.59	0.0066	-0.95	0.9055	-0.04	0.2354	-0.40	0.3137	0.36

TAF15	0.1025	0.48	0.9222	-0.03	0.1878	-0.39	0.1167	-0.51	0.0081	-0.87	0.2694	0.36
HLA-B	0.1064	-0.37	0.0039	-0.76	0.0120	-0.60	0.1213	-0.39	0.3163	-0.23	0.5235	-0.16
JUP	0.1081	0.49	0.0855	0.56	0.0217	0.72	0.8260	0.07	0.4481	0.23	0.6178	-0.16
ACP1	0.1163	-0.28	0.0001	-0.86	0.0004	-0.74	0.0062	-0.58	0.0192	-0.46	0.5159	-0.13
SND1	0.1193	-0.26	0.0018	-0.62	0.0006	-0.65	0.0598	-0.35	0.0292	-0.39	0.8279	0.04
TUBA4A	0.1253	0.29	0.0151	0.51	0.0013	0.67	0.2784	0.22	0.0547	0.38	0.4273	-0.16
MRC2	0.1264	-0.29	0.0111	-0.54	0.0010	-0.70	0.2234	-0.25	0.0427	-0.41	0.4418	0.16
RPS16	0.1286	-0.42	0.0224	-0.69	0.0222	-0.65	0.3529	-0.28	0.4015	-0.24	0.8878	-0.04
RRBP1	0.1366	-0.30	0.0163	-0.53	0.0009	-0.74	0.2732	-0.24	0.0360	-0.45	0.3324	0.21
RPLP2	0.1420	0.28	0.2955	0.21	0.0013	0.69	0.7324	-0.07	0.0472	0.41	0.0297	-0.48
RPS6	0.1496	-0.31	0.0015	-0.82	0.0217	-0.52	0.0418	-0.50	0.3537	-0.21	0.2148	-0.30
ANXA1	0.1574	0.33	0.0008	0.94	0.0016	0.81	0.0231	0.61	0.0493	0.49	0.6304	0.12
DCD	0.1586	0.41	0.6213	-0.15	0.0127	-0.77	0.0862	-0.56	0.0007	-1.18	0.0605	0.62
LGALS7;LGALS7B	0.1597	0.61	0.0004	1.89	6.28E-06	2.55	0.0128	1.27	0.0003	1.94	0.1656	-0.67
FABP5	0.1637	0.57	0.0014	1.56	0.0002	1.78	0.0358	0.99	0.0085	1.21	0.6204	-0.22
SFN	0.1676	0.58	6.97E-06	2.61	1.26E-06	2.78	0.0002	2.03	4.66E-05	2.20	0.7157	-0.17
VIM	0.1856	0.45	0.0480	0.73	0.3113	0.34	0.4386	0.29	0.7536	-0.11	0.2885	0.39
TGFBI	0.1920	0.39	0.4510	-0.24	0.0260	-0.70	0.0643	-0.63	0.0018	-1.09	0.1676	0.46
PSAP	0.1960	0.35	0.0110	0.77	0.0003	1.14	0.1512	0.43	0.0078	0.80	0.2088	-0.37
A2M	0.1972	-0.30	0.0089	-0.70	0.0188	-0.58	0.1283	-0.40	0.2551	-0.28	0.6350	-0.12
RPL13	0.2003	-0.40	0.0328	-0.74	0.0431	-0.65	0.3236	-0.34	0.4325	-0.25	0.7999	-0.09
ARPC3	0.2022	0.24	0.0123	0.53	0.0026	0.62	0.1597	0.29	0.0560	0.38	0.6555	-0.09
BANF1	0.2121	0.26	0.0039	0.71	0.0084	0.60	0.0622	0.45	0.1333	0.33	0.6224	0.11
OLFML3	0.2136	0.23	0.7216	-0.07	0.0028	-0.62	0.1474	-0.30	0.0002	-0.85	0.0130	0.55
EIF1AX; LOC101060318; LOC107984923	0.2201	0.24	0.0258	0.49	0.0002	0.85	0.2535	0.25	0.0062	0.61	0.1033	-0.36

S100A2	0.2294	0.64	0.0064	1.68	0.0006	2.11	0.0848	1.04	0.0136	1.47	0.4690	-0.42
CLTB	0.2319	0.27	0.0021	0.82	0.0836	0.40	0.0330	0.55	0.5792	0.13	0.0937	0.42
FTH1	0.2366	0.45	0.2405	0.48	0.0030	1.25	0.9507	0.03	0.0524	0.80	0.0744	-0.77
HMG4	0.2427	-0.30	0.2430	0.32	0.6604	-0.11	0.0364	0.63	0.4763	0.19	0.1345	0.44
ACBD3	0.2443	-0.24	0.1163	-0.35	0.0005	-0.84	0.6245	-0.11	0.0102	-0.60	0.0416	0.49
RPL23	0.2455	-0.27	0.0036	-0.78	0.2149	-0.28	0.0485	-0.52	0.9363	-0.02	0.0564	-0.50
PGAM1;LOC643576	0.2516	0.34	0.0234	0.75	0.0165	0.75	0.2093	0.41	0.1835	0.41	0.9987	0.00
RPL7A	0.2552	-0.28	0.0149	-0.67	0.0382	-0.53	0.1471	-0.40	0.3270	-0.25	0.5807	-0.15
RPL15	0.2572	-0.29	0.0025	-0.92	0.0703	-0.47	0.0342	-0.63	0.4832	-0.19	0.1253	-0.44
RPS13	0.2585	-0.26	0.0024	-0.84	0.0218	-0.57	0.0323	-0.58	0.2187	-0.30	0.2825	-0.28
YWHAG	0.2593	0.19	0.0004	0.75	0.0007	0.66	0.0059	0.56	0.0125	0.47	0.6251	0.09
RPL35A	0.2634	-0.41	0.0097	-1.09	0.0715	-0.68	0.1020	-0.68	0.4794	-0.27	0.3130	-0.41
CA1	0.2694	0.40	0.1370	-0.59	0.4905	-0.25	0.0206	-0.99	0.0938	-0.65	0.4016	-0.34
LMAN1	0.2718	-0.12	0.0025	-0.41	6.57E-06	-0.67	0.0322	-0.28	0.0001	-0.55	0.0439	0.26
RPS11	0.2721	-0.31	0.0061	-0.91	0.0459	-0.59	0.0671	-0.59	0.3495	-0.28	0.3135	-0.32
KCTD12	0.2808	0.21	0.4709	-0.15	0.0429	-0.41	0.1033	-0.36	0.0053	-0.62	0.2275	0.26
H2AFV	0.2880	-0.22	0.0006	-0.89	0.0102	-0.59	0.0087	-0.66	0.1096	-0.36	0.1985	-0.30
PDLIM1	0.2924	0.23	0.0128	0.62	0.1058	0.36	0.1130	0.39	0.5639	0.13	0.2824	0.26
SET	0.2945	0.22	0.0152	0.58	0.0003	0.90	0.1290	0.36	0.0051	0.68	0.1808	-0.32
RUVBL2	0.2960	-0.17	0.0795	-0.32	0.0004	-0.68	0.4274	-0.14	0.0063	-0.51	0.0515	0.37
COL1A2	0.2979	0.40	0.4725	-0.29	0.0085	-1.08	0.1107	-0.69	0.0011	-1.48	0.0675	0.79
IMMT	0.2981	-0.22	0.1997	-0.30	0.0079	-0.62	0.7583	-0.07	0.0863	-0.40	0.1800	0.32
RPL35	0.3130	-0.39	0.0188	-1.02	0.2324	-0.46	0.1425	-0.63	0.8527	-0.07	0.1922	-0.56
ACP5	0.3234	-0.30	0.5998	0.17	0.1001	0.51	0.1691	0.47	0.0165	0.81	0.3091	-0.34
ABRACL	0.3275	0.27	0.1797	0.39	0.0274	0.63	0.6702	0.13	0.2022	0.37	0.4268	-0.24
HNRNPAB	0.3276	0.22	0.0103	0.66	0.5347	0.14	0.0836	0.44	0.7256	-0.08	0.0435	0.52
RPL27	0.3352	-0.38	0.0163	-1.08	0.1599	-0.56	0.1177	-0.70	0.6558	-0.18	0.2409	-0.52

S100A14	0.3352	0.45	0.0175	1.26	0.0013	1.71	0.1245	0.81	0.0156	1.26	0.3842	-0.45
MTDH	0.3369	-0.24	0.1999	-0.34	0.0043	-0.77	0.7023	-0.10	0.0443	-0.54	0.1174	0.43
CLEC11A	0.3381	0.21	0.2500	-0.27	0.0036	-0.70	0.0564	-0.48	0.0006	-0.91	0.0811	0.43
CAPNS1	0.3413	0.24	0.0035	0.86	0.0021	0.86	0.0319	0.62	0.0236	0.62	0.9960	0.00
GOLIM4	0.3444	-0.16	0.1435	-0.27	0.0010	-0.65	0.5608	-0.11	0.0116	-0.49	0.0559	0.38
SBSN	0.3512	0.45	0.0175	1.31	0.0035	1.57	0.1185	0.86	0.0354	1.12	0.6243	-0.26
RPS23	0.3523	-0.29	0.0037	-1.07	0.0647	-0.60	0.0321	-0.78	0.3483	-0.31	0.1770	-0.47
HSPG2	0.3545	-0.16	0.0145	-0.48	0.0002	-0.75	0.1006	-0.32	0.0031	-0.59	0.1629	0.27
CTSG	0.3648	0.38	0.4446	-0.34	0.1696	-0.59	0.1282	-0.72	0.0358	-0.97	0.5978	0.24
SLC4A1	0.3798	-0.28	0.0015	-1.23	0.0010	-1.21	0.0129	-0.95	0.0104	-0.93	0.9494	-0.02
CLTA	0.3841	0.21	0.0113	0.69	0.2815	0.26	0.0745	0.48	0.8375	0.05	0.1073	0.43
HSPB1	0.3885	0.27	0.0024	1.12	0.0001	1.42	0.0191	0.86	0.0016	1.16	0.3852	-0.30
RPL29	0.3994	-0.19	0.0122	-0.65	0.2422	-0.27	0.0756	-0.46	0.7452	-0.08	0.1335	-0.39
CRYAB	0.4139	0.36	0.0098	1.32	0.0373	0.97	0.0599	0.96	0.1960	0.61	0.4711	0.35
RPS7	0.4165	-0.20	0.0348	-0.58	0.3998	-0.21	0.1678	-0.38	0.9768	-0.01	0.1758	-0.37
LONP1	0.4302	-0.12	0.0020	-0.56	0.0008	-0.59	0.0140	-0.44	0.0066	-0.47	0.8678	0.03
YWHAQ	0.4312	0.21	0.0019	1.00	0.0014	0.98	0.0135	0.79	0.0116	0.77	0.9299	0.03
LSM7	0.4318	0.13	0.0017	0.62	0.0011	0.61	0.0119	0.49	0.0093	0.48	0.9584	0.01
DYNC1H1	0.4384	-0.18	0.0137	-0.64	0.0008	-0.87	0.0734	-0.47	0.0071	-0.70	0.3580	0.23
S100A9	0.4430	0.35	0.1616	0.70	0.0060	1.39	0.4967	0.35	0.0399	1.04	0.1826	-0.69
RPS4X	0.4452	-0.20	0.0208	-0.68	0.0976	-0.44	0.1022	-0.48	0.3690	-0.24	0.4070	-0.24
RPS10	0.4715	-0.20	0.0371	-0.64	0.0856	-0.49	0.1523	-0.44	0.3157	-0.29	0.6100	-0.15
S100A8	0.4722	0.38	0.0213	1.40	0.0008	2.08	0.0967	1.01	0.0059	1.69	0.2580	-0.68
RPL8	0.4733	-0.20	0.0080	-0.86	0.2649	-0.31	0.0419	-0.66	0.6945	-0.11	0.0871	-0.54
SLC25A3	0.4766	-0.22	0.1693	-0.46	0.0231	-0.75	0.4812	-0.24	0.1121	-0.53	0.4056	0.29
S100A11	0.4796	0.24	0.0162	0.94	0.0001	1.65	0.0753	0.70	0.0007	1.41	0.0712	-0.71
TNC	0.5012	0.21	0.1147	-0.54	0.0014	-1.14	0.0394	-0.75	0.0004	-1.35	0.0937	0.60

PTMA	0.5072	0.16	0.0377	0.58	0.0003	1.08	0.1409	0.41	0.0018	0.91	0.0758	-0.50
TIMM8A	0.5175	-0.13	0.0485	0.45	0.8248	-0.05	0.0166	0.58	0.6818	0.09	0.0379	0.50
EPHX1	0.5229	-0.14	0.0086	-0.67	0.0024	-0.75	0.0381	-0.53	0.0134	-0.61	0.7386	0.08
CAPG	0.5284	0.13	0.0005	0.92	0.0005	0.85	0.0027	0.79	0.0034	0.72	0.7696	0.07
MYL12B;MYL12A	0.5299	-0.16	0.0812	0.50	0.0318	0.59	0.0296	0.66	0.0106	0.75	0.7543	-0.09
DIABLO	0.5317	0.18	0.5015	-0.21	0.0585	-0.57	0.2319	-0.39	0.0199	-0.75	0.2623	0.36
CALML3	0.5327	0.23	0.0051	1.19	0.0005	1.49	0.0235	0.97	0.0029	1.26	0.4680	-0.29
GSTP1	0.5351	0.14	0.0122	0.67	0.0040	0.74	0.0503	0.53	0.0207	0.60	0.7775	-0.07
ATP6V1G1	0.5373	0.15	0.0072	0.75	0.0434	0.50	0.0313	0.60	0.1585	0.36	0.3603	0.24
CCT7	0.5480	-0.12	0.1542	-0.30	0.0056	-0.59	0.3927	-0.18	0.0271	-0.48	0.1841	0.29
RPL18	0.5548	-0.16	0.0240	-0.70	0.1075	-0.45	0.0854	-0.54	0.3114	-0.29	0.4159	-0.25
CA2	0.5638	0.15	0.0070	0.80	0.0019	0.89	0.0285	0.65	0.0098	0.74	0.7451	-0.09
PPIA	0.5683	0.16	0.0212	0.75	0.0071	0.84	0.0742	0.59	0.0313	0.68	0.7673	-0.09
S100A6	0.5697	0.19	0.0135	0.96	0.0005	1.40	0.0501	0.77	0.0025	1.20	0.2540	-0.43
COX5A	0.5824	0.11	0.1918	0.28	0.0073	0.59	0.4356	0.17	0.0308	0.48	0.1779	-0.31
CDV3	0.5933	0.10	0.0221	0.50	0.0011	0.72	0.0721	0.40	0.0055	0.62	0.3112	-0.22
RPL31	0.5949	-0.16	0.0095	-0.90	0.2007	-0.39	0.0343	-0.74	0.4621	-0.23	0.1330	-0.51
COPG1	0.5997	-0.11	0.1150	-0.37	0.0107	-0.60	0.2824	-0.26	0.0409	-0.49	0.3498	0.23
CALR	0.6025	0.12	0.0160	0.62	0.0072	0.66	0.0531	0.50	0.0286	0.54	0.8673	-0.04
TMSB4X	0.6055	-0.29	0.0666	1.14	0.0267	1.32	0.0298	1.43	0.0113	1.61	0.7726	-0.18
PEA15	0.6098	0.12	0.0131	0.66	0.0942	0.40	0.0436	0.54	0.2493	0.28	0.3121	0.26
LAMC1	0.6103	0.08	0.0040	-0.51	0.0259	-0.36	0.0018	-0.59	0.0111	-0.43	0.3520	-0.16
TMSB10	0.6271	-0.18	0.0121	1.06	0.0085	1.05	0.0056	1.24	0.0039	1.23	0.9818	0.01
PFDN2	0.6375	0.09	0.0055	0.60	0.7120	0.07	0.0186	0.51	0.9217	-0.02	0.0152	0.53
CLIC1	0.6379	0.09	0.0261	0.49	0.0028	0.66	0.0746	0.40	0.0107	0.57	0.4484	-0.17
YWHAZ	0.6530	0.10	0.0078	0.71	0.0032	0.75	0.0243	0.60	0.0117	0.65	0.8582	-0.04
CUTA	0.6618	-0.12	0.3520	0.26	0.0377	0.58	0.2026	0.38	0.0189	0.70	0.2873	-0.32

SKP1	0.6639	0.09	0.0108	0.59	0.0499	0.41	0.0319	0.51	0.1307	0.33	0.4209	0.18
CKB	0.6640	0.10	0.2184	0.32	0.0086	0.69	0.4191	0.22	0.0279	0.59	0.1735	-0.37
ATP1A1	0.6647	-0.08	0.5902	-0.11	0.0026	-0.67	0.8982	-0.03	0.0093	-0.58	0.0177	0.55
KRT13	0.6720	-0.28	0.1309	1.10	0.0154	1.74	0.0715	1.39	0.0080	2.02	0.3908	-0.64
ALDOA	0.6761	0.06	0.0004	0.66	0.0006	0.60	0.0014	0.60	0.0023	0.53	0.6815	0.07
S100A4	0.6821	0.17	0.0675	0.84	0.0009	1.59	0.1531	0.67	0.0032	1.42	0.1097	-0.75
RPL34	0.6827	-0.13	0.0057	-1.07	0.1645	-0.47	0.0169	-0.94	0.3366	-0.33	0.1086	-0.60
AHSG	0.6938	-0.21	0.3401	-0.54	0.0477	-1.10	0.5685	-0.33	0.1170	-0.89	0.3460	0.56
ATP5J	0.6988	0.10	0.0029	0.90	0.0154	0.66	0.0087	0.81	0.0430	0.56	0.3946	0.24
CALM3; CALM2; CALM1	0.7147	0.15	0.0238	1.05	0.0296	0.94	0.0569	0.90	0.0736	0.79	0.8122	0.11
COL4A2	0.7332	0.12	0.5808	-0.22	0.0208	-0.91	0.4042	-0.34	0.0128	-1.03	0.0999	0.69
RPS8	0.7349	-0.08	0.0062	-0.75	0.0653	-0.45	0.0159	-0.67	0.1394	-0.37	0.2495	-0.30
CTSK	0.7409	0.13	0.5501	0.24	0.0411	0.82	0.7806	0.12	0.0920	0.70	0.1808	-0.58
RPS28	0.7444	-0.10	0.8183	0.07	0.0636	0.59	0.6071	0.17	0.0400	0.69	0.1371	-0.51
TALDO1	0.7461	-0.07	0.1625	0.31	0.0160	0.53	0.1063	0.38	0.0102	0.59	0.3375	-0.22
RPL23A	0.7556	0.07	0.0282	-0.59	0.3798	-0.21	0.0187	-0.66	0.2589	-0.28	0.1581	-0.38
RPL27A	0.7565	-0.08	0.0431	-0.61	0.5581	-0.16	0.0877	-0.52	0.7904	-0.07	0.1388	-0.45
ADK	0.7569	0.04	0.0400	-0.27	3.53E-06	-0.74	0.0264	-0.31	3.31E-06	-0.78	0.0017	0.47
RPL17	0.7727	-0.07	0.0315	-0.59	0.9017	-0.03	0.0638	-0.52	0.8741	0.04	0.0473	-0.56
BLVRB	0.7755	0.05	0.1501	-0.25	0.0024	-0.55	0.1044	-0.30	0.0018	-0.60	0.1050	0.30
ATP5D	0.7774	-0.06	0.3593	0.19	0.0011	0.73	0.2592	0.25	0.0009	0.79	0.0203	-0.54
C1QBP	0.7983	0.06	0.0388	0.57	0.0030	0.82	0.0726	0.51	0.0073	0.76	0.3681	-0.25
HBA2;HBA1	0.8000	0.11	0.0053	-1.41	0.2400	-0.51	0.0041	-1.52	0.1753	-0.62	0.0696	-0.90
MIF	0.8003	0.12	0.3298	0.49	0.0183	1.19	0.4739	0.37	0.0385	1.07	0.1892	-0.70
SH3BGRL	0.8010	-0.06	0.1066	0.43	0.0094	0.69	0.0782	0.49	0.0072	0.75	0.3442	-0.26
CRABP2	0.8166	0.07	0.0817	0.59	0.0100	0.85	0.1362	0.52	0.0213	0.78	0.4300	-0.27

MYL6	0.8176	-0.06	0.0885	0.46	0.0419	0.53	0.0674	0.52	0.0321	0.58	0.8133	-0.06
TAGLN2	0.8195	0.07	0.0498	0.66	0.2824	0.33	0.0869	0.59	0.4128	0.26	0.3233	0.33
CFL1	0.8440	0.05	0.0042	0.90	0.0098	0.75	0.0083	0.85	0.0193	0.70	0.6022	0.15
PCNP	0.8504	-0.05	0.0301	0.71	0.0769	0.53	0.0252	0.77	0.0631	0.59	0.5790	0.18
DBI	0.8822	0.05	0.0742	0.68	0.0354	0.76	0.1089	0.63	0.0574	0.71	0.8253	-0.08
DCTPP1	0.8895	0.05	0.1648	-0.52	0.0151	-0.90	0.1456	-0.57	0.0145	-0.95	0.3234	0.38
CAPZA1	0.8900	0.02	0.0206	0.41	0.0007	0.61	0.0328	0.39	0.0015	0.59	0.2495	-0.20
PRKAR1A	0.9135	0.02	0.4162	-0.15	0.0010	-0.66	0.3798	-0.17	0.0011	-0.68	0.0140	0.51
THBS1	0.9260	-0.03	0.5370	-0.20	0.0122	-0.81	0.6090	-0.17	0.0191	-0.78	0.0740	0.61
CTSD	0.9300	0.02	0.6737	0.11	0.0135	0.64	0.7441	0.09	0.0208	0.62	0.0552	-0.53
RPL37	0.9396	0.02	0.0286	-0.79	0.0578	-0.64	0.0298	-0.82	0.0592	-0.66	0.6552	-0.16
RPL7	0.9441	-0.02	0.0050	-0.89	0.0983	-0.46	0.0076	-0.87	0.1270	-0.44	0.1568	-0.43
ERH	0.9560	0.02	0.0944	0.62	0.0359	0.75	0.1168	0.60	0.0485	0.73	0.7359	-0.13
TPSAB1; TPSB2	0.9636	0.01	0.2284	-0.40	0.0322	-0.70	0.2303	-0.42	0.0360	-0.71	0.3873	0.30
ADIRF; C10orf116	0.9641	0.02	0.0076	1.14	0.1808	0.50	0.0107	1.13	0.2138	0.48	0.1243	0.64
ALPL	0.9751	0.01	0.0923	-0.53	0.0021	-1.00	0.0991	-0.54	0.0027	-1.01	0.1511	0.47
NDUFA13	0.9776	-0.01	0.4703	-0.37	0.0178	-1.23	0.5027	-0.36	0.0238	-1.22	0.1199	0.86
HBD	0.9820	0.01	0.0038	-1.11	0.0468	-0.67	0.0048	-1.12	0.0536	-0.68	0.2300	-0.44
COL15A1	0.0885	-0.30	0.0073	-0.54	0.5340	0.11	0.2228	-0.24	0.0311	0.41	0.0026	-0.65
OMD	0.0906	0.54	0.2356	0.40	0.2690	-0.35	0.6726	-0.14	0.0113	-0.89	0.0396	0.74
TPPP3	0.1223	0.45	0.2373	0.36	0.2570	-0.32	0.7792	-0.09	0.0150	-0.77	0.0378	0.68
SH3BGRL3	0.1857	0.39	0.0207	0.77	3.35E-05	1.53	0.2510	0.38	0.0012	1.14	0.0268	-0.76
COL1A1	0.2072	0.52	0.9792	0.01	0.0259	-0.97	0.2632	-0.51	0.0020	-1.49	0.0400	0.98
CSTB	0.2097	0.24	0.0083	0.58	3.28E-06	1.19	0.1145	0.34	0.0001	0.95	0.0080	-0.61
RPL38	0.2301	-0.30	0.0855	-0.47	0.2883	0.27	0.5395	-0.17	0.0375	0.57	0.0131	-0.74
HLA-DRA	0.2467	-0.33	0.0107	-0.83	0.8495	0.05	0.1183	-0.50	0.1996	0.38	0.0092	-0.89
COL12A1	0.2793	0.28	0.8221	-0.06	0.0034	-0.85	0.2356	-0.35	0.0004	-1.14	0.0115	0.79

CDH13	0.3755	0.19	0.0435	0.47	0.0667	-0.40	0.2233	0.29	0.0131	-0.58	0.0011	0.87
HMG2	0.6372	-0.12	0.0376	0.58	0.5377	-0.15	0.0181	0.69	0.8886	-0.04	0.0136	0.73
FARSA	0.6400	-0.07	0.0034	-0.53	0.1156	0.24	0.0117	-0.46	0.0560	0.32	0.0001	-0.77
MXRA7	0.6674	-0.13	0.1903	0.43	0.0751	-0.56	0.1050	0.56	0.1827	-0.43	0.0071	0.99
SCRN1	0.6887	-0.08	0.9668	-0.01	0.0028	-0.71	0.7475	0.08	0.0095	-0.63	0.0066	0.70
HNRNPUL1	0.6981	0.09	0.5343	0.15	0.0436	-0.48	0.8026	0.06	0.0242	-0.57	0.0190	0.63
GPNMB	0.7012	-0.08	0.2222	-0.27	0.1276	0.32	0.3993	-0.19	0.0728	0.40	0.0155	-0.59
DAP	0.7974	0.05	0.0725	0.39	0.2971	-0.20	0.1275	0.34	0.2173	-0.25	0.0113	0.59
IGLV3-25	0.8249	-0.05	0.3858	-0.20	0.0011	-0.80	0.5225	-0.15	0.0026	-0.75	0.0174	0.60
FGA	0.8512	-0.07	0.3762	-0.33	0.0028	-1.17	0.4923	-0.27	0.0058	-1.11	0.0386	0.84
CSDA;YBX3	0.8679	-0.03	0.2290	0.26	0.0668	-0.38	0.1934	0.29	0.1056	-0.34	0.0081	0.63
HBB	0.8796	0.07	0.0041	-1.68	0.3622	-0.45	0.0039	-1.75	0.3110	-0.53	0.0337	-1.23
DPYSL3	0.8944	-0.02	0.0388	0.36	0.1074	-0.26	0.0359	0.38	0.1530	-0.23	0.0016	0.61
FTL	0.9210	-0.06	0.6053	-0.34	0.0484	1.28	0.6829	-0.28	0.0477	1.34	0.0261	-1.62
RPLP1	0.9928	0.00	0.3629	0.32	0.0023	1.14	0.3766	0.33	0.0031	1.15	0.0347	-0.82

FC: *fold change*. Em negrito estão os valores de $p < 0,05$. A cor vermelha representa aumento de abundância ($\log_2 FC > 0,58$), e azul redução de abundância das proteínas ($\log_2 FC < -0,58$).

Devido à grande complexidade dos dados, e da característica de alguns grupos apresentarem poucas proteínas diferindo entre eles, foi realizada uma avaliação de correlação de Pearson, visando uma melhor descrição dos dados. A correlação de Pearson é um método estatístico descritivo, que mede o grau da correlação entre variáveis (KIRCH, 2008). Este coeficiente, representado por r , assume apenas valores entre -1 e 1, sendo -1 pouco correlacionado, e 1 muito correlacionado. Após a avaliação estatística dos dados pelo Limma test, as proteínas alteradas foram avaliadas por correlação de Pearson. Os achados da proteômica sugerem semelhança entre os grupos KRAS e FGFR1, e TRPV4 e WT devido ao $r > 0,5$ na correlação de Pearson entre algumas das amostras destes grupos (Figura 10).

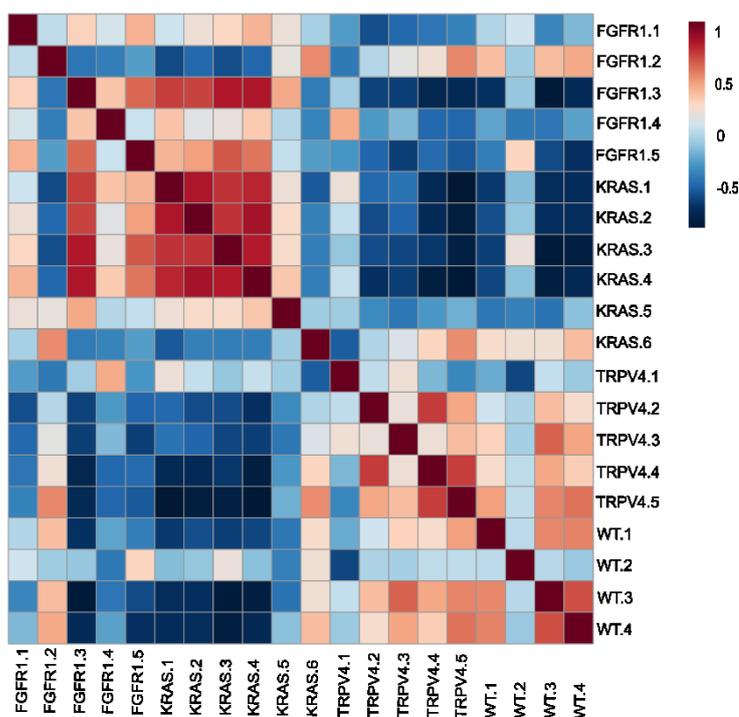


Figura 10. Análise de correlação de Pearson. Análise realizada com as proteínas alteradas entre os grupos FGFR1, KRAS, TRPV4 e WT. Valor de r assume apenas valores entre -1 e 1, sendo -1 pouco correlacionado, e 1 muito correlacionado.

Para determinar as vias metabólicas relacionadas às mutações nos genes *KRAS*, *FGFR1* e *TRPV4*, as proteínas que apresentaram aumento ou redução em um grupo, quando comparado a todos os outros, foram categorizadas como perfil proteico associado ao gene. Diagramas de Venn foram construídos para auxiliar na seleção dessas proteínas (Figura 11).

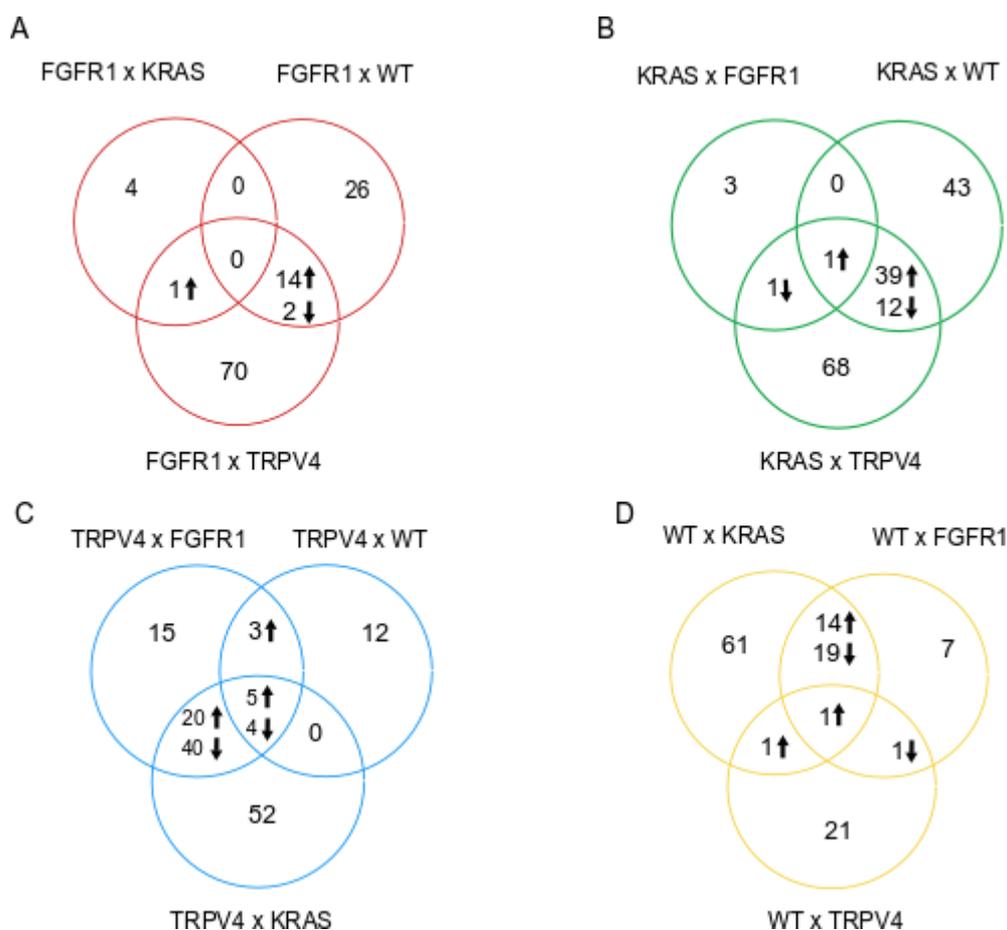


Figura 11. Diagramas de Venn das proteínas alteradas entre os grupos FGFR1, KRAS, TRPV4 e WT. Os diagramas foram construídos com as proteínas ($p < 0,05$ e $\log_2 FC \geq 0,58$ ou $\leq -0,58$) que apresentaram aumento ou redução em um grupo quando comparado a todos os outros. As setas para cima indicam aumento da abundância e as para baixo redução da abundância de proteínas.

A avaliação dos dados por diagrama de Venn corroborou com o perfil proteico observado na avaliação de correlação de Pearson, em que poucas proteínas diferiram entre os grupos. Como exemplo, os grupos KRAS e FGFR1 apresentaram apenas 5 proteínas diferentes entre eles (Figura 11 A e B). Esses achados sugerem que mutações em *KRAS* e *FGFR1* podem induzir as mesmas alterações moleculares no contexto da LCG.

Dentre as 5 proteínas que diferem os grupos KRAS e FGFR1 observadas na análise por diagrama de Venn, estão TGM2, PDLIM3 e HP, que apresentaram redução, e S100A7 e FMOD apresentaram aumento de abundância no grupo KRAS em comparação ao FGFR1.

O proto-oncogene *KRAS* codifica uma GTPase que regula a sinalização celular via MAPK/ERK ativando RAS por ligação ao GTP (BOS, 2018; HAIGIS, 2017). As mutações que afetam os códons 12, 13, 61 e 146, levam a alterações próximas ao sítio de ligação de GTP/GDP na proteína *KRAS*, favorecendo o modo ativado da proteína, que acarreta em uma ativação constitutiva da via MAPK/ERK (DE LUCA *et al.*, 2012; HAIGIS, 2017). A proteína A7 de ligação ao cálcio S100 (S100A7) foi associada à regulação das vias de MAPK, p38 e JNK em carcinoma oral de células escamosas e câncer de ovário (DEY *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2018). Tendo em vista o aumento da abundância dessa proteína no grupo *KRAS* em comparação ao *FGFR1*, e seu papel na regulação da sinalização celular, sugere-se que as amostras com mutação no gene *KRAS* possuem outras fontes de ativação da via MAPK além das mutações A146V, e G12D no gene *KRAS*.

Após a construção dos diagramas e determinação do perfil proteico de cada grupo, foi realizado um enriquecimento de vias com as proteínas encontradas nas interseções de cada diagrama de Venn (Apêndice 1). As vias enriquecidas foram posteriormente categorizadas em processos biológicos (Figura 12).

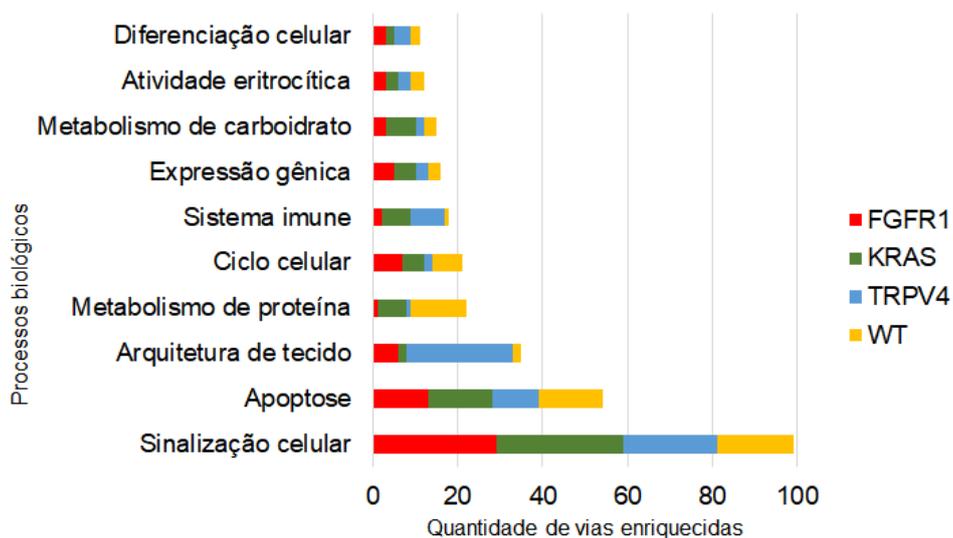


Figura 12. Categorização por processos biológicos para as vias enriquecidas em cada grupo. O enriquecimento de vias foi realizado no PathDiP, utilizando as proteínas selecionadas em cada grupo por meio dos diagramas de Venn. Cada via foi manualmente avaliada nos bancos de dados e categorizadas em processos biológicos.

Todos os grupos apresentaram uma grande similaridade quanto à quantidade de vias enriquecidas para a maioria dos processos biológicos, exceto os casos com mutação em *TRPV4* que apresentaram maior quantidade de vias para o processo de arquitetura de tecidos, em comparação aos demais grupos de mutações. Similarmente, o grupo WT também apresentou uma maior quantidade de vias enriquecidas para o metabolismo de proteínas.

O potencial receptor transiente vaniloide tipo 4 (TRPV4) é um canal de cálcio envolvido na regulação intracelular de cálcio e desempenha um papel importante na diferenciação de osteoclastos, homeostase óssea, modulação da função vascular e na remodelação da matriz extracelular (MEC) (JI; MCCULLOCH, 2020). O TRPV4 quando ativado regula a remodelação do colágeno fibrilar, alterando assim as propriedades mecânicas da MEC (SUNKSARE *et al.*, 2012). Diversas vias envolvidas nos processos de arquitetura tecidual, como colágeno e MEC, foram observadas em maior quantidade nas amostras mutadas em *TRPV4*, sugerindo que há influência do *TRPV4* nesses processos no contexto da LCG.

O grupo WT é composto por amostras de LCG que não apresentaram mutações nos genes *FGFR1*, *TRPV4* e *KRAS* (GOMES *et al.*, 2018). Apesar de não apresentar nenhuma mutação, as amostras possuem o mesmo perfil histológico e clínico das demais (GOMES *et al.*, 2018). Uma maior quantidade de vias relacionadas ao metabolismo de proteínas foi observada nas amostras WT. Todas as proteínas que enriqueceram vias relacionadas ao processo de metabolismo de proteínas apresentaram aumento da abundância nas amostras WT em comparação aos grupos *KRAS* e *FGFR1*, sugerindo que as amostras que não apresentam mutação possuem um metabolismo de proteínas mais ativo que as demais.

6.1.3 Fosfoproteômica total de lesão de células gigantes dos maxilares

As mutações nos genes *KRAS*, *TRPV4* e *FGFR1* em LCG foram identificadas como ativadoras da via MAPK/ERK, com aumento da marcação de ERK nas amostras mutadas (GOMES *et al.*, 2018). Tendo em vista a ativação observada e a relação desses genes com outras vias de sinalização celular, como PI3K/AKT/mTOR (DE LUCA *et al.*, 2012), analisou-se o

fosfoproteoma das amostras com o intuito de identificar mais vias de sinalização celular envolvidas na patogênese da lesão.

O fosfoproteoma das amostras de tecido parafinizado apresentou 14 fosfopeptídeos, de 14 proteínas distintas, alterados entre os grupos (p valor < 0,05) (Tabela 3). Diante do fato da fosforilação ser uma modificação pós traducional intimamente relacionada à sinalização celular e transdução de sinal, e da baixa quantidade de peptídeos fosforilados diferindo entre os grupos, sugere-se uma similaridade desses grupos quanto ao perfil de fosforilação de proteínas e conseqüentemente ativação da cascata de sinalização celular.

Tabela 3. Fosfopeptídeos que diferem entre os grupos KRAS, FGFR1, TRPV4 e WT.

Sequência anotada	Sítio modificado	Gene	KRAS x FGFR1		KRAS x WT		KRAS x TRPV4		FGFR x WT		FGFR x TRPV4		TRPV4 x WT	
			p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC
[R].aQGEPVAGH EsPkIPYEK.[Q]	S11	SEC31A	0.0483	-0.36	0.0357	0.42	NS	-	0.0006	0.78	0.0314	0.42	NS	-
[K].nDksEEEQSS SSVk.[K]	S4	HNRNPC	0.0234	-0.49	NS	-	NS	-	0.0118	0.61	NS	-	NS	-
[R].aGETRFtDTR. [K]	T7	EEF2	0.0445	-0.47	NS	-	NS	-	0.0045	0.77	NS	-	0.0337	-0.47
[R].gsVSDEEmm ELR.[E]	S2	LCP1	NS	-	0.0268	0.51	NS	-	0.0020	0.78	NS	-	NS	-
[R].IELQGPRGsP NAR.[S]	S9	NCL	NS	-	NS	-	NS	-	0.0025	0.69	NS	-	NS	-
[K].eSLKEEEDsD DDNm.[-]	S9	PSMA3	NS	-	NS	-	NS	-	0.0017	0.83	NS	-	NS	-
[K].tDSsPNQAR.[A]	S4	PTBP1	NS	-	NS	-	NS	-	0.0366	0.52	NS	-	NS	-
[K].qSHGAAPcSG GsQ.[-]	S12	S100A7	0.0080	-0.75	NS	-	NS	-	0.0077	0.83	NS	-	NS	-
[K].hTGPNsPDTE GFVR.[L]	S6	HNRNPH1	NS	-	0.0427	0.46	NS	-	0.0090	0.63	NS	-	NS	-
[R].sSGsPYGGG YGSGGGSGGGY SR.[R]	S4	HNRNPA3	NS	-	NS	-	NS	-	0.0282	0.66	NS	-	0.0278	-0.21
[K].qEkPAEkPAE TPVATsPTATDS TSGDSSR.[S]	S16	RAD23B	0.0017	-1.18	NS	-	0.0180	-0.84	NS	-	NS	-	NS	-
[K].aQRlsQETEA LGR.[S]	S5	NUCB1	NS	-	0.0497	0.44	NS	-	0.0138	0.58	NS	-	NS	-
[K].hSDskEDDGQ EIA.[-]	S4	CD276	NS	-	0.0398	0.44	NS	-	0.0103	0.59	NS	-	NS	-
[R].tLSNAEDYLD DEDsD.[-]	S14	OSTF1	NS	-	NS	-	NS	-	0.0256	0.51	NS	-	NS	-

† Todos os fosfopeptídeos foram normalizados pelos níveis de suas respectivas proteínas. NS: Não significativo ($p > 0,05$). FC: *foldchange*

O peptídeo fosforilado da proteína S100A7 apresentou redução da abundância no grupo KRAS em comparação ao FGFR1, divergindo do observado no proteoma total. O impacto da fosforilação no sítio identificado ainda não foi avaliado, mas diante do seu papel na regulação das vias de sinalização (DEY *et al.*, 2016; LIN *et al.*, 2018), a fosforilação pode estar relacionada à inibição da atividade da proteína, contudo mais estudos são necessários.

Fator de estimulação de osteoclastos 1 (OSTF1) é uma proteína contendo domínio SH3 e foi associada à ativação de osteoclastos com aumento de massa trabecular em ossos longos de camundongos, confirmando o papel do OSTF1 no desenvolvimento ósseo (VERMEREN *et al.*, 2017). O grupo FGFR1 apresentou aumento da abundância dessa proteína em comparação ao WT. No entanto, o impacto da fosforilação no sítio S14 identificado no estudo não possui função predita em bancos de dados, sendo necessárias mais avaliações para identificar o papel da modificação nesse sítio.

6.2 Metabolômica de lesão de células gigantes

6.2.1 Padronização da metabolômica de lesão de células gigantes

Assim como a proteômica, a metabolômica também está em constante melhoria das plataformas analíticas e das metodologias de extração de metabólitos de diferentes tipos de amostras (DUDZIK *et al.*, 2018). Como é o caso da análise de moléculas extraídas de tecidos parafinizados, para a qual plataformas como LC-MS e GC-MS, recentemente passaram a ser utilizadas (KELLY *et al.*, 2011; YUAN *et al.*, 2012; NG *et al.*, 2014; WOJAKOWSKA *et al.*, 2015; CACCIATORE *et al.*, 2017; KIM *et al.*, 2017; CRUZ *et al.*, 2019; DUARTE-ERADE *et al.*, 2019; FENG *et al.*, 2019).

Para a avaliação do metaboloma de tecidos parafinizados neste trabalho, foi necessário a padronização das metodologias de extração de compostos. Iniciou-se a padronização pela avaliação da quantidade de material proveniente do bloco de parafina utilizado para a extração. Visando manter a qualidade dos dados gerados, utilizou-se uma normalização pela biomassa dos tecidos, considerando a mesma proporção de biomassa e solvente para todas as amostras analisadas.

Os três testes realizados foram desenvolvidos com base em protocolos descritos na literatura. Durante o preparo das amostras, verificou-se que o teste 3

(CH₃OH, H₂O e CH₂Cl₂) apresentava rápida volatilização e conseqüente diferença de volume entre as amostras. A rápida volatilização foi atribuída ao solvente diclorometano utilizado na mistura do teste 3, portanto não foi possível prosseguir com o teste 3 para as análises em LC-MS. Os testes 1 e 2 prosseguiram normalmente e foram submetidos às mesmas condições de cromatografia e espectrometria de massa. Os cromatogramas gerados foram verificados e comparados entre os testes de solventes e entre as proporções de quantidade, em miligramas de amostras analisadas (Figura 13). A partir desta análise observou-se que, no teste 1, a proporção mais adequada de amostra para solvente de extração seria 1:20 (Figura 13.A), bem como no teste 2 (Figura 13.B).

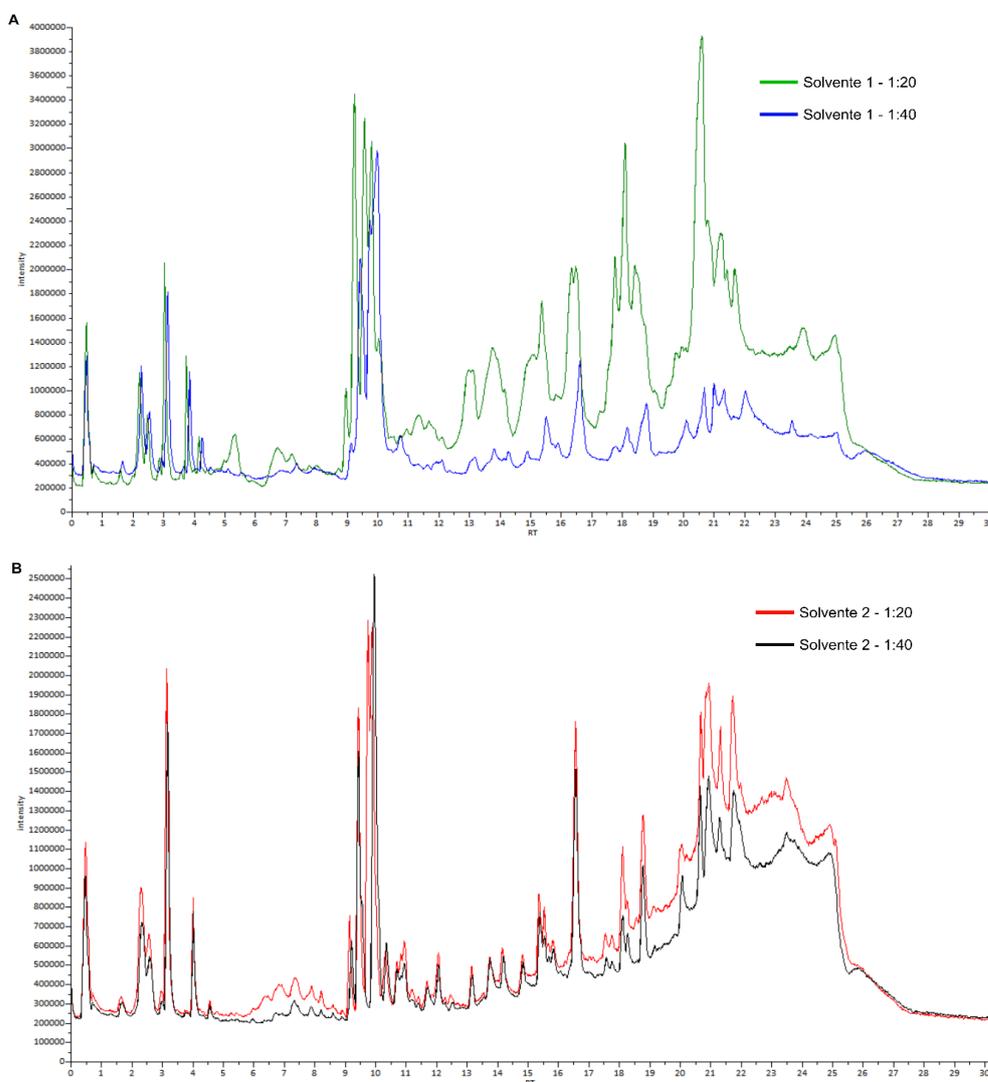


Figura 13. Sobreposição dos cromatogramas da padronização dos testes de extração de tecido parafinado. A. Sobreposição dos cromatogramas referentes aos testes do solvente 1 (CH₃OH:

CHCl₃: H₂O (3:1:1). **B.** Sobreposição dos cromatogramas referentes aos testes do solvente 2 (80% Metanol).

A comparação entre os melhores resultados de cada teste de solvente, sendo a proporção 1:20 dos testes 1 e 2, demonstrou claramente que o teste 1 apresentou melhor resolução cromatográfica, com picos de intensidades maiores, além de maior quantidade de picos, sendo este o protocolo de escolha para as análises do metaboloma da lesão de células gigantes (Figura 14).

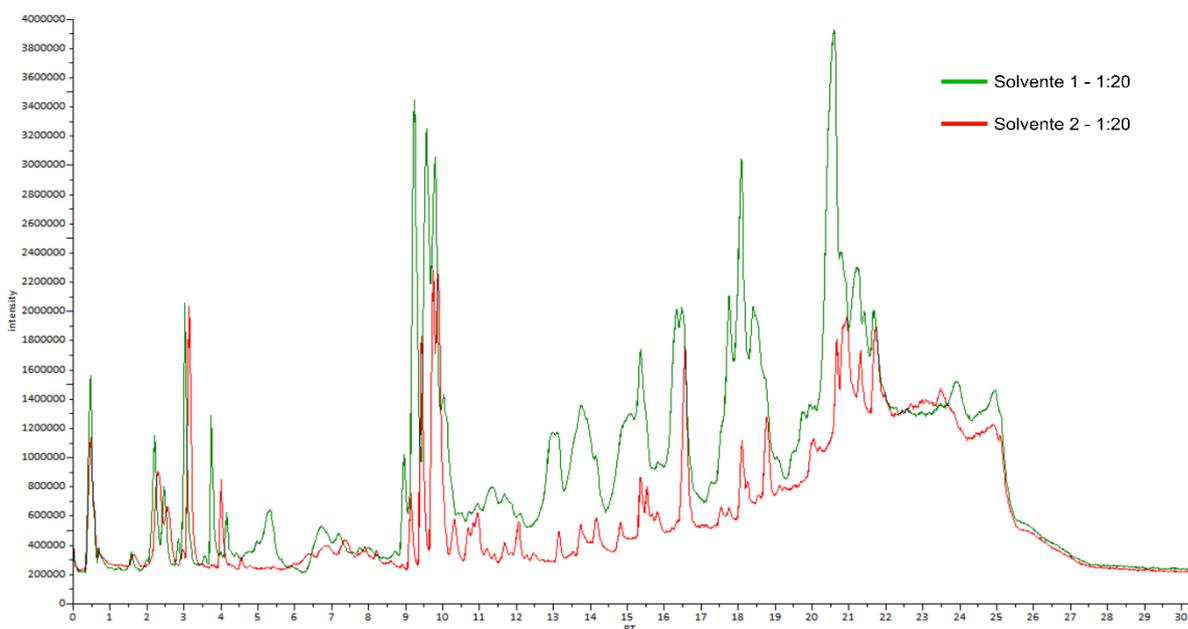


Figura 14. Sobreposição dos cromatogramas das melhores condições da padronização dos testes de extração de tecido parafinizado. Sobreposição dos cromatogramas referentes aos testes do solvente 1 (CH₃OH:CHCl₃:H₂O) (3:1:1) e solvente 2 (80% Metanol) com a proporção de 1mg de tecido para 20 uL de solvente de extração.

Alguns trabalhos utilizam tecido parafinizado para metabolômica em LC-MS, porém até o presente momento todos apresentaram uma abordagem alvo, visando um grupo ou moléculas específicas (YUAN *et al.*, 2012; NG *et al.*, 2014; KELLY *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2017; CACCIATORE *et al.*, 2017; FENG *et al.*, 2019). Portanto desenvolver um protocolo para avaliar o metaboloma de tecidos parafinizados, objetivando uma análise global pode contribuir não só no contexto da LCG, bem como para outros estudos com tecido parafinizado avaliados em LC-MS.

A utilização de plataformas metabolômicas, como a espectrometria de massa, resulta em uma maciça quantidade de dados complexos e que necessitam de ferramentas bioinformáticas para serem analisados. Da etapa de geração dos sinais obtidos nos espectrômetros de massa até a interpretação biológica dos dados, vários *softwares*, bancos de dados e plataformas são utilizados. Particularmente os dados gerados em LC-MS são mais numerosos quando comparados com outras plataformas analíticas devido ao uso de colunas cromatográficas mais abrangentes, cobrindo uma faixa de moléculas com grande variabilidade de características físico-químicas (NAZ *et al.*, 2014).

Diante disso, para as análises dos dados gerados em LC-MS, foi utilizado o IPO, que permite a otimização de parâmetros utilizados pelo XCMS em análises de dados obtidos de cromatografia acoplada à espectrometria de massa (LIBISELLER *et al.*, 2015). O IPO explora picos do isótopo natural ^{13}C , ubíquo em amostras biológicas, para otimizar quais são os melhores valores dos parâmetros para a detecção de picos (*Peak picking*) e também para a correção do tempo de retenção (*Retcor*) e agrupamento necessários para análises por XCMS (LIBISELLER *et al.*, 2015). As rodadas de otimização visaram à padronização e construção do *script* ideal para a análise dos dados metabolômicos da LCG. As áreas verdes representam os valores dos parâmetros que ainda necessitam de otimização, e as áreas vermelhas a rosa são parâmetros bem otimizados, como demonstrados nas figuras 15 e 16 para o modo positivo, e figuras 17 e 18 para o modo negativo. Os gráficos de superfície resultantes das otimizações demonstram a qualidade e o grau da otimização obtidos para as análises metabolômicas da LCG.

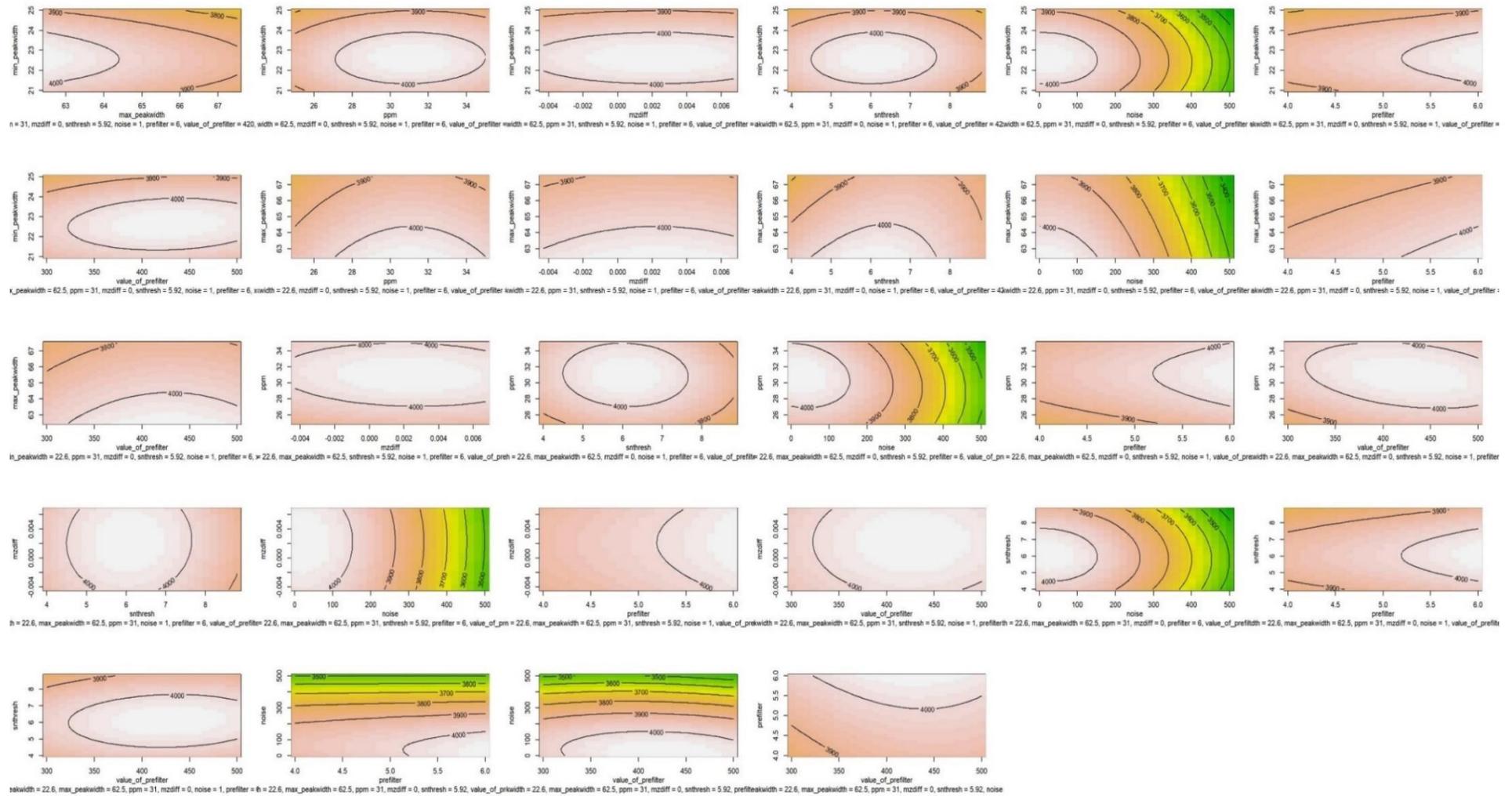


Figura 15. Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de detecção de picos dos dados modo positivo da metabolômica de LCG.

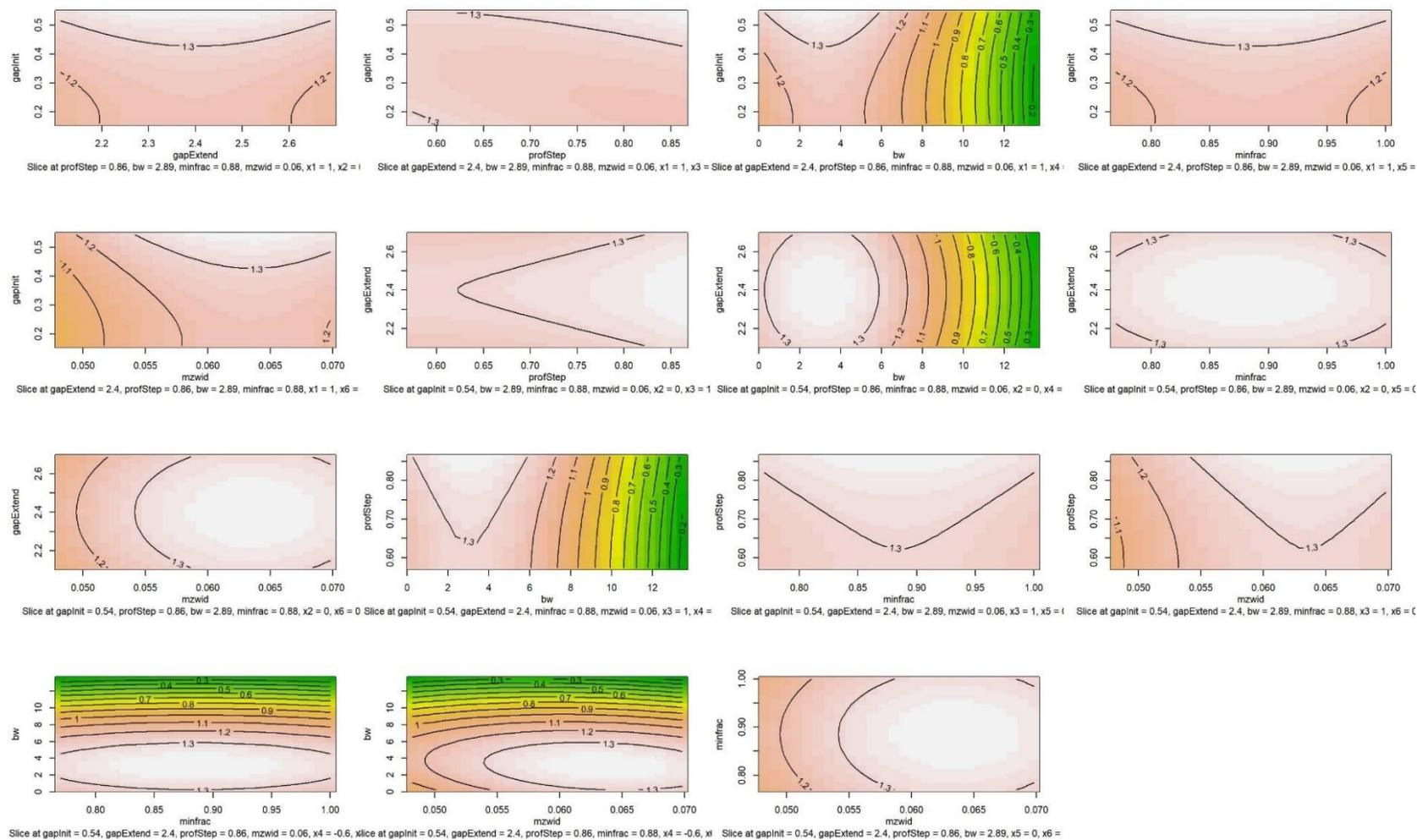


Figura 16. Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de correção de tempo de retenção e agrupamento dos dados modo positivo da metabolômica de LCG.

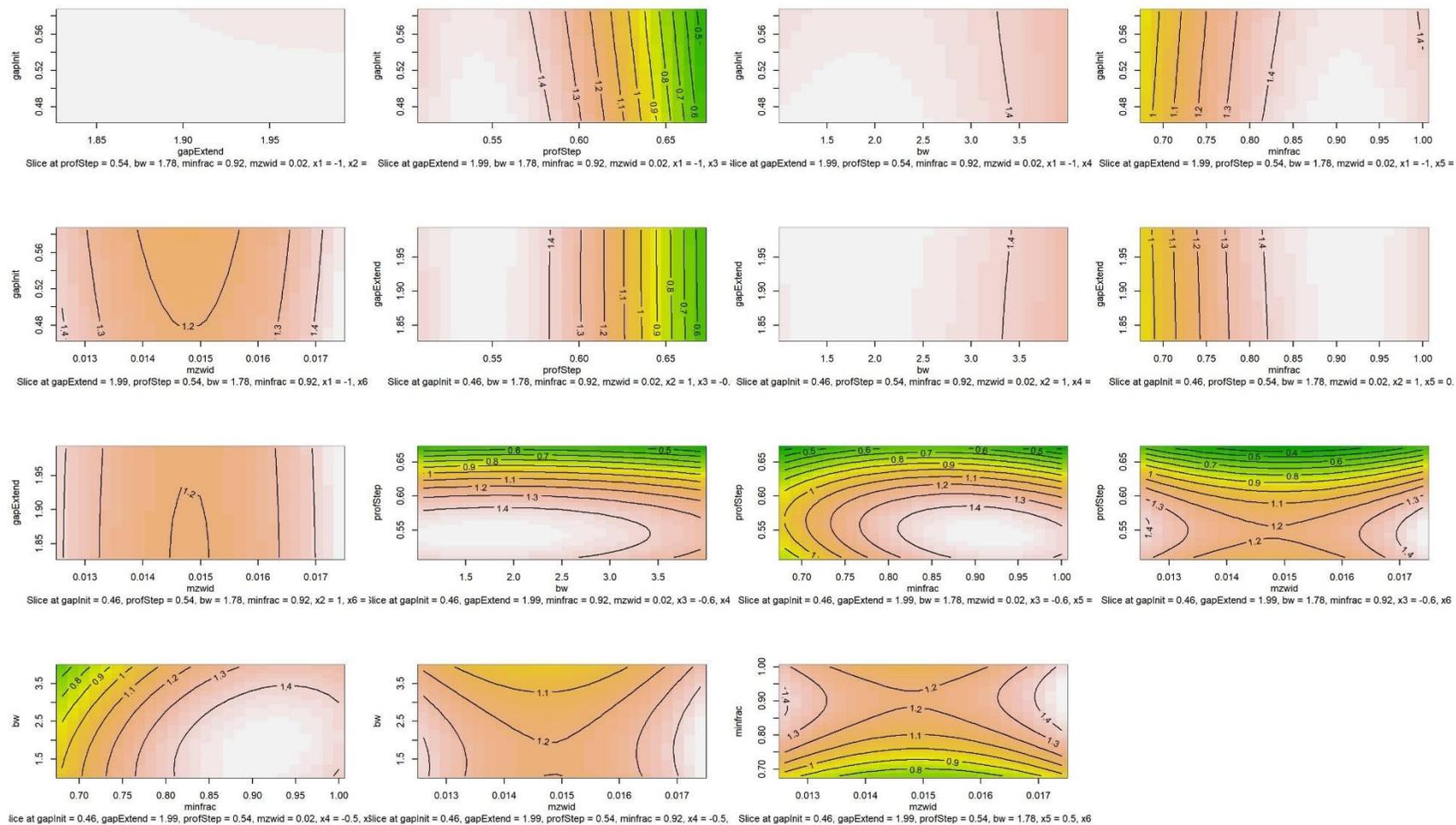


Figura 18. Gráficos de superfície de resposta para a otimização da etapa de correção de tempo de retenção e agrupamento dos dados modo positivo da metabolômica de LCG.

Os dados dos modos positivo e negativo foram otimizados separadamente e os scripts avaliados no XCMS quanto ao número de *molecular features* gerados (Tabela 4). Apesar do script utilizado na plataforma do XCMS online ser específico para qTOF Bruker, este não é totalmente compatível com o modelo do instrumento de análise de massa utilizado no presente trabalho. O script do XCMS online foi selecionado a título de comparação com os scripts otimizados pelo IPO, e verificou-se que uma considerável quantidade de *features* foi gerada, mais precisamente 12464 e 1250 *features*, modo positivo e negativo, respectivamente.

O alto número de *features* gerado pode estar relacionado a não otimização dos parâmetros de detecção de picos, além da ausência de uma correta eliminação de ruídos, visto que o processo de parafinização pode ocasionar perdas consideráveis de diversas biomoléculas, inclusive de metabólitos. Em contrapartida, após a otimização pelo IPO, os dois modos, além de mostrarem uma redução do número de *features*, possuem a avaliação dos parâmetros de qualidade pelo gráfico de superfície (Figuras 15, 16, 17 e 18). A primeira otimização, realizada com os valores *default* do IPO, baseou os valores dos parâmetros da segunda otimização, que por sua vez foi selecionada como o protocolo mais adequado para as análises no XCMS. A segunda otimização apresentou o melhor desempenho no gráfico de superfície de resposta, tendo na maioria das comparações entre os parâmetros as tonalidades de vermelho, indicando que os valores são ideais para aqueles dados.

Tabela 4. Parâmetros da otimização da análise de dados brutos do modo positivo e negativo

Parâmetros	Modo Positivo			Modo Negativo		
	Não otimizado*	Otimizado 1	Otimizado 2	Não otimizado*	Otimizado 1	Otimizado 2
Detecção de picos						
min_peakwidht	5	22.5	22.6	10	17.152	14
max_peakwidth	20	68	62.5	60	125	155
ppm	10	31.15	31	10	59.75	45.5
mzdiff	0.01	-0.00071	0.0023	0.01	0.00075	0.002
prefilter	3	3	6	3	3	3.7
value_of_prefilter	100	568	420	100	100	800
snthresh	6	10	5.92	6	10	8.1
noise		0	1	100	0	126
Correção do tempo de retenção e agrupamento						
gaplnit	-	0.928	0.2	-	0.64	0.525
gapExtend	-	2.04	2.3	-	1.92	1.91
profStep	1	0.657	0.8	1	0.52	0.59
bw	5	0.87	2	5	31.6	2.5
minfrac	0.5	0.7	0.7	0.5	0.54	0.94
mzwid	0.015	0.061	0.06	0.015	0.027	0.015
Resultados						
<i>Molecular features</i> #	12464	1748	3615	1520	955	466

*A análise correspondente à coluna “não otimizado” foi realizada com base nos parâmetros default para LC-QTOF Bruker do XCMS online. # Número de *molecular features* sem nenhum tratamento.

A qualidade dos dados gerados foi avaliada por meio da verificação dos CQ. A sobreposição dos cromatogramas dos CQs tanto no modo positivo quanto no negativo (Figura 19) reflete a reprodutibilidade da análise e estabilidade do instrumento durante toda a corrida, visto que os CQs são injetados tanto no início, quanto no meio e fim da corrida de todas as amostras (BROADHURST *et al.*, 2018). Os cromatogramas dos CQs apresentam uma sobreposição parcial, com um dos CQs apresentando uma divergência do perfil cromatográfico (Figura 19). Interessantemente, este CQ divergente foi a primeira injeção da corrida, e sabe-se que as primeiras injeções podem divergir devido a adequação da coluna às condições cromatográficas (BROADHURST *et al.*, 2018).

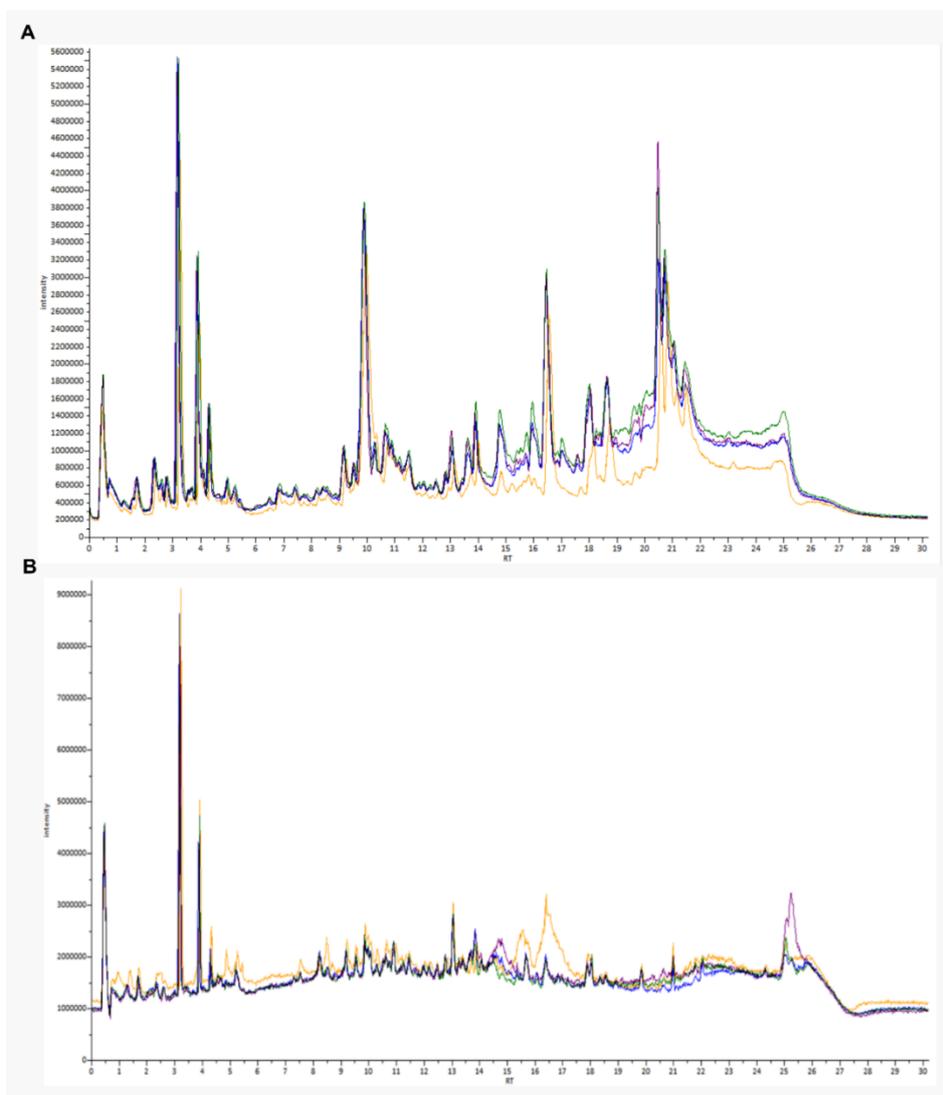


Figura 19. Sobreposição dos cromatogramas dos controles de qualidade dos dados modo positivo e negativo da metabolômica de lesão de células gigantes. Em amarelo CQ 1, em verde CQ 2, em azul CQ 3 e em roxo CQ 4.

Apesar do CQ 1 ser a primeira injeção da batelada de corridas no LC-MS e apresentar um perfil que difere do restante dos CQs em ambos os modos, uma análise de *outliers* demonstrou que não se trata de um *outlier*, portanto o CQ 1 foi mantido nas análises (Figura 20.A). A análise de *outliers* avalia por meio de algoritmos a presença de amostras que estão fora do perfil total observado no estudo. Essa avaliação permite determinar se alguma anormalidade ocorreu durante todo o processo de preparo de amostra e obtenção do dado. A análise permitiu não só verificar os CQs, mas todas as amostras e nenhuma delas mostrou um perfil discrepante, não sendo considerado *outlier* (Figura 20.A). Uma análise de componentes principais (PCA) evidenciou a reprodutibilidade das corridas dos CQs e estabilidade do sistema analítico durante a análise de ambos os modos, apresentando uma sobreposição das amostras de CQ (Figura 20.B).

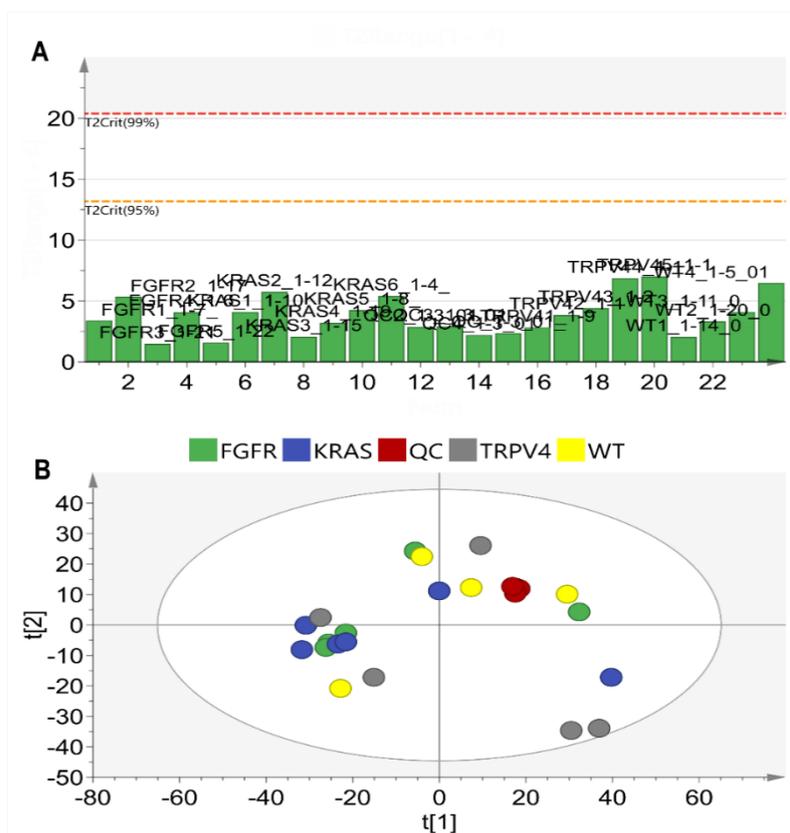


Figura 20. Avaliação da qualidade do dado gerado na plataforma de LC-MS. A. Análise de *outliers*, considerando todas as amostras analisadas dos dois modos, positivo e negativo. As barras verdes abaixo das linhas vermelha e amarela mostram que nenhuma amostra se comporta como *outlier*. **B.** Análise de PCA, considerando todas as amostras analisadas dos dois modos, positivo e negativo. Em ambas as análises as intensidades dos *molecular features* analisados foram

previamente transformadas em log, normalizadas pela mediana e centralizados pela média, além de escalonadas por Pareto.

Após todas as etapas de padronização dos parâmetros de extração dos metabólitos, cromatografia, espectrometria e análise bruta dos dados, foi possível a utilização de um protocolo adequado para as amostras parafinizadas. A padronização permitiu a geração de dados de qualidade adequando-se os processos da avaliação metabolômica às particularidades das amostras utilizadas no estudo.

6.2.2 Metabolômica da lesão de células gigantes

Posteriormente à análise bruta dos dados, 1619 *molecular features* foram detectados considerando os dois modos, sendo 1387 do modo positivo e 232 do modo negativo. Prosseguiu-se com a avaliação estatística multivariada e univariada para diferenciar os grupos com mutações nos genes *FGFR1*, *KRAS*, *TRPV4* e o grupo que não apresenta mutações, denominado WT. A análise multivariada não foi capaz de distinguir os grupos. Comparações de 2 a 2 grupos foram realizadas para a construção do modelo de PLS-DA, e nenhum dos modelos apresentou parâmetros de qualidade satisfatórios (Figura 21). Apesar de os gráficos de 2 dimensões apresentarem visivelmente a separação dos grupos em todos os casos (Figura 21.A-F), nenhum modelo apresentou um valor de Q^2 válido e na grande maioria dos casos o valor de predição foi negativo. (Figura 21.G). O fato de nenhum modelo multivariado ser válido pode estar associado à similaridade das amostras utilizadas no estudo e também ao pequeno tamanho amostral.

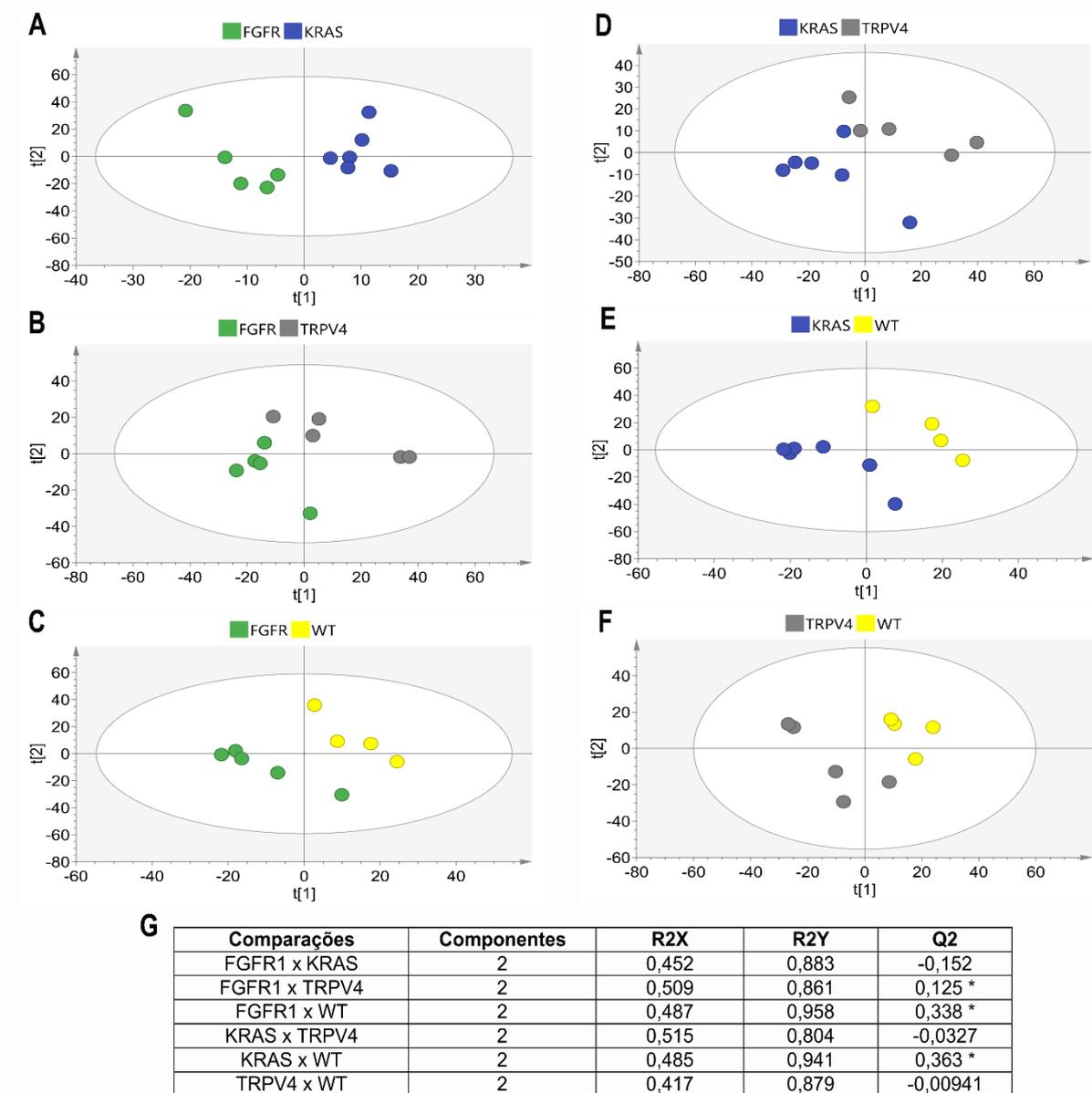


Figura 21. Avaliação estatística multivariada dos *molecular features* dos modos positivo e negativo. A-F. Modelos de PLS-DA construídos de 2 a 2 para todos os grupos analisados. **G.** Valores dos parâmetros de qualidade dos modelos de PLS-DA construídos de 2 a 3 para todos os grupos analisados. * Valores de Q2 mesmo que positivos apresentaram *overfitting* dos dados.

Em concordância com a análise multivariada, a univariada também apresentou pouca diferença entre os grupos. Como a estatística univariada trabalha com a detecção de diferenças caso a caso, essas discretas distinções entre os grupos foram evidenciadas, utilizando testes como teste T. Considerando os *molecular features* que apresentaram valor de $p < 0,05$ e *fold change* menor que -2 e maior que 2 em escala logarítmica, um total de 56 *molecular features* diferiram entre

os grupos e prosseguiram para a etapa de identificação dos metabólitos (Apêndice 2).

Nenhuma correção foi utilizada para os p valores, pois, considerando os resultados, além dos grupos apresentarem um perfil bastante semelhante, diferindo apenas em alguns metabólitos, a metabolômica é bastante instável quando comparada a outras ômicas. Sabe-se que o metaboloma pode sofrer influências tanto de outros níveis de informação molecular, quanto de fatores ambientais, como alimentação, microbiota, doenças de base, tabagismo, alcoolismo, uso de medicamentos, dentre outros (BEGGER, 2013). Portanto, neste caso, aplicar uma correção ao valor de p implicaria em uma redução drástica da quantidade de informação obtida na análise. Para compensar a ausência de correção de p valor, foi utilizado um filtro de *fold change* e posteriormente os dados foram correlacionados a outros resultados obtidos no estudo.

Considerando a classificação *Metabolomics Steards Initiative* (MSI), 12 *molecular features* foram identificados como metabólitos, sendo classificados como nível 2. Não foi possível chegar a uma identificação putativa mais específica, ou seja, de um metabólito, em 45 *molecular features*, sendo assim classificados como MSI 3 e 4 (classificação bioquímica e identificação desconhecidas) (SUMNER *et al.*, 2007) (Tabela 5).

Dentre as classes bioquímicas, metabólitos pertencentes às classes de ácidos graxos, acil graxos, lipídeos preinos, glicerofosfolipídeos, aminoácidos, esteroides e derivados foram identificados e/ou classificados (Tabela 5). Em concordância com os dados proteômicos gerados com as mesmas amostras, a metabolômica também apresentou uma variedade de classes de compostos, corroborando ainda mais para a viabilidade da utilização de tecidos parafinizados para análises de proteínas e metabólitos.

Tabela 5. Identificação provável dos *molecular features* diferenciais entre os grupos

Fórmula	Metabólitos putativos †	Classe bioquímica	KRAS x WT		FGFR x WT		FGFR x TRPV4		TRPV4 x WT	
			p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC	p valor	FC
C18H34O5	9,10,13-TriHOME/9,12,13-TriHOME	Acils graxos	0.0036	2.03	0.0078	2.77	Ns	-	0.0017	2.20
C24H34O4	9'-Carboxi-alpha-tocotrienol	Lipideos prenois	0.0002	2.52	Ns	-	Ns	-	0.0145	2.64
C26H50NO9P	POV-PE/ PS(20:1(11Z)/0:0)	Glicerofosfolípeos	Ns	-	Ns	-	Ns	-	0.0190	-2.63
C30H56NO9P	1-(9Z-octadecenoyl)-2-(4-oxobutryl)-sn-glycero-3-phosphocholine	Glicerofosfolípeos	Ns	-	0.0246	3.58	Ns	-	Ns	-
C30H59O12P	PI (21:0/0:0)	Glicerofosfolípeos	Ns	-	0.0253	3.21	Ns	-	Ns	-
C18H20N2O3	Phenylalanylphenylalanine	Aminoácidos	0.0147	2.19	0.0088	3.26	Ns	-	Ns	-
C18H34O4	18-hydroxy-9R,10S-epoxy-stearic acid	Ácidos graxos	Ns	-	Ns	-	0.0227	-5.44	Ns	-
C28H40O4	13'-Carboxy-gamma-tocotrienol	Lípideo prenoil	0.0039	-2.83	Ns	-	Ns	-	0.0180	-2.59
C26H43NO6	Glycocholic Acid	Esteroides e derivados	Ns	-	Ns	-	Ns	-	0.0289	-2.18
C27H44O5S	(6RS,24R)-24,25-dihydroxyvitamin D3 6,19-sulfur dioxide adduct	Lipideos esteroides	Ns	-	Ns	-	0.0101	3.22	0.0038	-3.42
C27H46O5S	26-hidroxicolesterol 3-sulfate	Esteroides e derivados	Ns	-	Ns	-	0.0115	2.92	0.0334	-2.73
C28H49O9P	PG(22:4(7Z,10Z,13Z,16Z)/0:0)	Glicerofosfolípeos	Ns	-	Ns	-	0.0204	2.63	Ns	-

†: A comparação entre os grupos KRAS e FGFR1, e KRAS e TRPV4 não apresentaram metabólitos estatisticamente significativos. FC: foldchange; Ns: Não significativo

As amostras com mutações nos genes *KRAS* e *FGFR1* não apresentaram nenhuma diferença significativa entre elas. Por outro lado, a maior parte dos *molecular features* diferenciais foram observados em comparação ao grupo com ausência de mutação, WT. A similaridade entre os grupos *KRAS* e *FGFR1* pode indicar que as mutações encontradas nesses genes na LCG compartilham processos moleculares semelhantes.

Dentre os sinais que diferenciaram entre os grupos, uma parcela pequena pôde ser identificada, correspondendo a aproximadamente 21% do *molecular features* significativos. A baixa quantidade de identificações observada pode estar relacionada à falta de conhecimento dos efeitos da fixação e parafinização nos metabólitos. Os efeitos dos processos que ocorrem na técnica de fixação de tecidos por formalina são bastante conhecidos na proteômica, como a oxidação de metionina, metilação de lisina, hidroximetil com alguns aminoácidos, mas até o momento nenhum estudo abordou essas ou a formação de outros adutos na metabolômica (MAGDELDIN; YAMAMOTO, 2012; BROECKX *et al.*, 2016; BAYER *et al.*, 2019; COSCIA *et al.*, 2020). Portanto, mais estudos metabolômicos utilizando amostras parafinizadas são necessários para melhor compreender e identificar as alterações causadas pelo processo de fixação e parafinização de tecidos.

Diversas vias e metabólitos têm sido relacionados à osteoclastogênese e metabolismo ósseo, como a via de vitamina D3 (CHRISTAKOS *et al.*, 2010; TAKAHASHI; UDAGAWA; SUDA, 2014). A vitamina D3, obtida da alimentação e da produção pela pele a partir de 7-deidrocolesterol pela irradiação ultravioleta, desempenha um importante papel na reabsorção óssea por osteoclastos, atuando na estimulação da diferenciação dessas células (CHRISTAKOS *et al.*, 2010; TAKAHASHI; UDAGAWA; SUDA, 2014). A redução de um metabólito pertencente à classe da vitamina D3, (6RS,24R)-24,25-dihydroxyvitamin D3 6,19-sulfur dioxide adduct, foi observada no grupo *TRPV4* quando comparado ao WT e *FGFR1*. Diante do papel da vitamina D3 e do *TRPV4* na diferenciação celular sugere-se que o metabolismo desta vitamina pode sofrer influência da mutação no gene *TRPV4*.

Os produtos da metabolização do ácido linoleico, 9,12,13-trihidroioctadecenóico (9,12,13-TriHOME) e 9,10,13-trihidroioctadecenóico (9,10,13-TriHOME) são considerados importantes mediadores inflamatórios e foram

correlacionados a sintomas inflamatórios do sistema respiratório após a exposição a um alergênico (NORDING *et al.*, 2010). Na LCG essas moléculas foram detectadas aumentadas nas amostras mutadas em comparação ao grupo WT. Tal fato sugere uma relação das mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* na modulação da resposta inflamatória em LCG, mas são necessários estudos que comprovem a hipótese.

6.3 Análise ômica integrativa

A integração de dados ômicos permite maior cobertura das alterações de um determinado sistema biológico, pois avalia diversas biomoléculas de diferentes camadas moleculares (HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017; SUN; HU, 2017). Diante disso, realizamos uma análise integrativa de dados genômicos previamente obtidos, e dos dados gerados neste trabalho (Figura 22).

No que concerne à sinalização celular, uma grande quantidade de vias foi enriquecida em todos os grupos. A sinalização celular possui um importante papel biológico de controle da atividade de diversos processos celulares como, diferenciação celular, arquitetura de tecidos, proliferação celular, apoptose, expressão gênica, entre outros (DOWNWARD, 2003). A ativação da via de MAPK foi descrita na LCG com associação às mutações nos genes *TRPV4*, *KRAS* e *FGFR1* (GOMES *et al.*, 2018). Além da via de MAPK, outras vias relacionadas a sinalização celular como PI3K, AKT, mTOR, p38 foram observadas em todos os grupos no estudo proteômico, além da proteína S1007, o que sugere a participação dessas vias na patogênese da lesão. No entanto, mais estudos são necessários para validar esses achados.

Moléculas envolvidas em processos apoptóticos como as proteínas, Bcl-2, Bax e caspase-3 e o gene pro-apoptótico *WWOX*, já foram descritas como aumentadas tanto a em abundância como em expressão nas células gigante multinucleadas da LCG (AMARAL *et al.*, 2011 e 2013). No presente trabalho foram identificadas outras moléculas e vias metabólicas envolvidas com a apoptose, até então não descritas na lesão de células gigantes, como as vias intrínsecas da apoptose, TNFalpha e caspases, dentre outras descritas no Apêndice 1.

Diferenciação celular é um foco importante de estudo no contexto da LCG. Diversos estudos caracterizam as células gigantes multinucleadas da LCG como osteoclastos-like, devido à positividade de marcadores de osteoclastogênese como, CD11c, RANK, OPG, NFAT1c, V-ATPase, TRAP, correlacionando a existência dessas células a uma possível diferenciação celular (FLANAGAN *et al.*, 1988; LIU; YU; LI, 2003; TOBÓN-ARROYAVE *et al.*, 2005 DUARTE *et al.*, 2011). No presente estudo, identificaram-se vias como EGF, EGFR1 e reguladores de transição de epitélio mesenquimal (TEM), uma proteína fosforilada (OSTF1) ligada a diferenciação de osteoclastos, e o metabólito da classe da vitamina D3 ((6RS,24R)-24,25-dihydroxyvitamin D3 6,19-sulfur dioxide adduct). Esses achados adicionam mais informações acerca da hipótese de diferenciação celular na LCG, contribuindo para o entendimento da patogênese da lesão.

Vias relacionadas à arquitetura de tecidos foram mais observadas no grupo com mutações em *TRVP4*, como vias do colágeno e matriz extracelular (MEC). O canal de cálcio possui um papel importante na remodelação da MEC (JI; MCCULLOCH, 2020). Moléculas relacionadas à arquitetura de tecidos, como fibronectina e tenascina, foram previamente descritas na LCG (ARAGÃO *et al.*, 2007). Diante da relação da mutação em *TRPV4* com esse processo, e os achados do presente estudo, mais investigações são recomendadas para aprofundar o conhecimento acerca da influência da mutação na arquitetura celular.

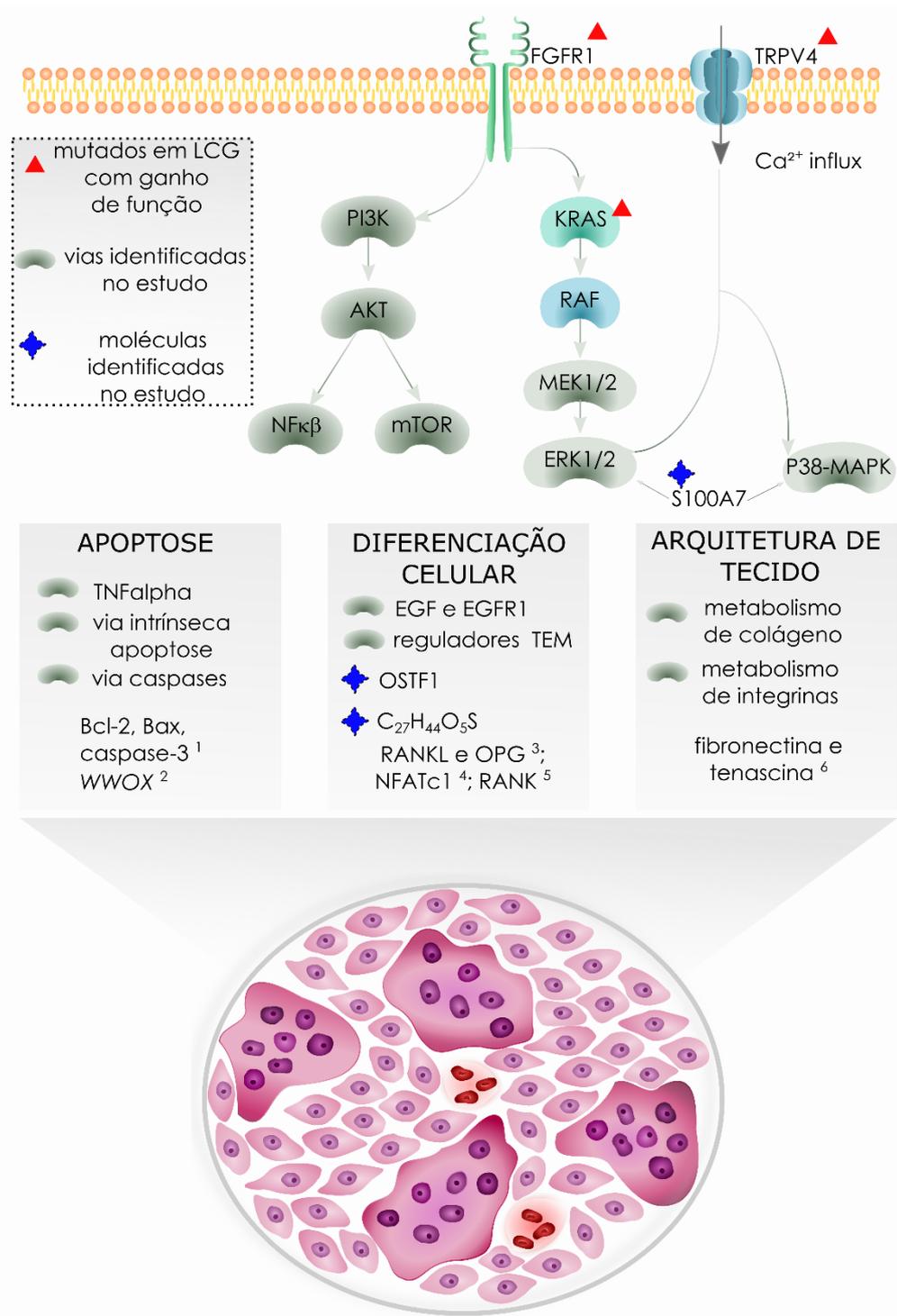


Figura 22. Análise integrativa dos achados moleculares em lesão de células gigantes dos maxilares. A análise foi realizada utilizando os dados gerados no trabalho e os dados da literatura. ¹ Amaral *et al.*, 2011; ² Amaral *et al.*, 2013; ³ Liu *et al.*, 2003; ⁴ Duarte *et al.*, 2011; ⁵ Tobón- Arroyave *et al.*, 2005; ⁶ Aragão *et al.*, 2007. TEM: Transição de epitélio mesenquimal.

Contudo, as alterações observadas no metaboloma, proteoma e fosfoproteoma precisam de um maior aprofundamento para melhor compreensão do

seu papel na patogênese de LCG dos maxilares. Para isso, validações e outras análises que confirmem a ativação ou participação dos processos sugeridos são necessárias. Considerar a utilização de culturas celulares e modelos animais como já vem sendo utilizado no contexto de lesões orais (PEREIRA *et al.*, 2019 e 2020), pode também auxiliar a compreensão do papel desses processos, possibilitando a validação dos achados.

7 CONCLUSÕES

Poucas diferenças foram observadas entre os grupos, sugerindo uma semelhança metabólica relacionada ao status mutacional, demonstrado em nível de proteína, fosfopeptídeos e metabólitos.

Vias metabólicas relacionadas a apoptose, sinalização celular, expressão gênica, diferenciação celular, atividade eritrocítica apresentaram alterações em todos os grupos.

As amostras mutadas em *KRAS* e *FGFR1* apresentam perfis proteômico e metabolômico semelhantes.

Amostras mutadas no gene *TRPV4* mostraram uma maior quantidade de vias alteradas relacionadas à arquitetura tecidual.

Amostras com ausência de mutação nos genes *KRAS*, *TRPV4* e *FGFR1* mostraram uma maior quantidade de vias alteradas relacionadas ao metabolismo de proteína.

Contudo, as alterações observadas no metaboloma, proteoma e fosfoproteoma necessitam de mais estudos para melhor compreender o papel desses achados na patogênese de lesão.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, Fabrício Rezende *et al.* Quantitative expression analysis of apoptotic / antiapoptotic genes and association with immunolocalization of BAX and BCL-2 in peripheral and central giant cell lesions of the jaws. *Tumor Biology*, v. 32, p. 997–1003, 2011.

AMARAL, Fabrício Rezende *et al.* WWOX expression in giant cell lesions of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 116, n. 2, p. 210–213, 2013.

ANDERSEN, Lis; FEJERSKOV, Ole; PHILIPSEN, Hans P. Oral giant cell granulomas. *Acta path. microbiol. sce*, v. 81, n. 5, p. 606–616, 1973.

ARMITAGE, Emily G; BARBAS, Coral. Metabolomics in cancer biomarker discovery : Current trends and future perspectives. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 87, p. 1–11, 2014.

AUCLAIR, Paul L *et al.* A clinical and histomorphologic comparison of the central giant cell granuloma and the giant cell tumor. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 66, p. 197–208, 1988.

BAUMHOER, Daniel *et al.* Activating mutations in the MAP-kinase pathway define non-ossifying fibroma of bone. *Journal of Pathology*, v. 248, n. 1, p. 1–7, 2019.

BAYER, Malte *et al.* Are formalin-fixed and paraffin-embedded tissues fit for proteomic analysis ? *Journal of Mass Spectrometry*, v. 55, n. 8, p. 1–5, 2019.

BEGER, Richard D. A Review of Applications of Metabolomics in Cancer. *Metabolites*, v. 3, p. 552–574, 2013.

BEHJATI, Sam *et al.* Distinct H3F3A and H3F3B driver mutations define chondroblastoma and giant cell tumor of bone. *Nature Genetics*, v. 45, n. 12, p. 1479–1482, 2014.

BOS, Johannes L. From Ras to Rap and Back , a Journey of 35 Years. *Cold Spring Harb Perspect Med*, v. 8, n. 2, p. a031468, 2018.

BRENES, Alejero *et al.* Multibatch TMT Reveals False Positives , Batch Effects , and Missing Values. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 18, n. 10, p. 1967–1980, 2019.

BRIERLEY, Daniel J; CRANE, Hannah; HUNTER, Keith D. Lumps and Bumps of the Gingiva : A Pathological Miscellany. *Head and Neck Pathology*, v. 13, n. 1, p. 103–113, 2019.

BROADHURST, David *et al.* Guidelines and considerations for the use of system suitability and quality control samples in mass spectrometry assays applied in untargeted clinical metabolomic studies. *Metabolomics*, v. 14, n. 6, p. 1–17, 2018.

BROECKX, Valerie *et al.* Comparison of multiple protein extraction buffers for GeLC-MS/MS proteomic analysis of liver e colon formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Molecular BioSystems*, v. 12, n. 2, p. 553–565, 2016.

CACCIATORE, Stefano *et al.* Metabolic Profiling in Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded Prostate Cancer Tissues. *Molecular Cancer Research*, v. 15, n. 4, p. 439–447, 2017.

CHAMBERS, Matthew C *et al.* A cross-platform toolkit for mass spectrometry and proteomics. *Nature Biotechnology*, v. 30, n. 10, p. 918–20, 2012.

CHAVES, Roberta R.M. *et al.* KRAS mutations in implant-associated peripheral giant cell granuloma Running title: KRAS and implant-associated giant cell granuloma. *Oral Diseases*, v. 26, n. 2, p. 334–360, 2019.

CHONG, Jasmine *et al.* MetaboAnalyst 4 . 0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, n. June, p. 1–9, 2018.

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

CHRCANOVIC, Bruno R.; GOMES, Carolina C.; GOMEZ, Ricardo S. Peripheral giant cell granuloma : An updated analysis of 2824 cases reported in the literature. *Oral Pathology & Medicine*, n. March, p. 454–459, 2018.

CHRCANOVIC, Bruno R.; GOMES, Carolina C.; GOMEZ, Ricardo S. Central giant cell lesion of the jaws : An updated analysis of 2270 cases reported in the literature. *Oral Pathology & Medicine*, n. May, p. 731–739, 2018.

CHRISTAKOS, Sylvia *et al.* Vitamin D: Metabolism. *Endocrinol Metab Clin North Am.*, v. 39, n. 2, p. 243–253, 2010.

CHUONG, Robert *et al.* Central Giant Cell Lesions of the Jaws: A Clinicopathologic Study. *J. Oral Maxillofac Surg.*, v. 44, p. 708–713, 1986.

COSCIA, Fabian *et al.* A streamlined mass spectrometry – based proteomics workflow for large-scale FFPE tissue analysis. *Journal of Pathology*, v. 251, p. 100–112, 2020.

COX, Brian; EMILI, Erew. Tissue subcellular fractionation and protein extraction for use in mass-spectrometry-based proteomics. *Nature Protocols*, v. 1, n. 4, p. 1872–1878, 2006.

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

CRUZ, Aline F. *et al.* Reticular and erosive oral lichen planus have a distinct metabolomic profile: A preliminary study using gas mass spectrometry. *Oral Pathology & Medicine*, v. 48, n. 5, p. 400-405, 2019.

DE LUCA, Antonella *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, 2012.

DEY, KK *et al.* S100A7 has an oncogenic role in oral squamous cell carcinoma by activating p38/MAPK and RAB2A signaling pathway. *Cancer Gene Ther*, v. 23, n. 11, p. 382–391, 2016.

DOWNWARD, Julian Targeting RAS signalling pathways in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. v. 3, n.11, p. 11-22, 2003.

DUARTE-ERADE, Filipe F. *et al.* The importance of BRAF- - V600E mutation to ameloblastoma metabolism. *Oral Pathology & Medicine*, v. 48, n. 7, p. 307-314, 2019.

DUARTE, Alessera P. *et al.* Increased expression of NFATc1 in giant cell lesions of the jaws, cherubism and brown tumor of hyperparathyroidism. *Oncology Letters*, v. 2, n. 3, p. 571–573, 2011.

DUDZIK, Danuta *et al.* Quality assurance procedures for mass spectrometry untargeted metabolomics: a review. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical*

Analysis, v. 147, n.5, p. 149–173, 2018.

EI-NAGGAR, Adel *et al.* Odontogenic e maxillofacial bone tumours. *WHO Classification of Head and Neck Tumors 9*, (204–260. IARC Publications, Lyon, 2017).

FENG, Di *et al.* UPLC-MS/MS-based metabolomic characterization and comparison of pancreatic adenocarcinoma tissues using formalin-fixed, paraffin-embedded and optimal cutting temperature-embedded materials. *INTERNATIONAL JOURNAL OF ONCOLOGY*, v. 55, n. 6, p.1249–1260, 2019.

FLANAGAN, Adrienne M. *et al.* The Multinucleate Cells in Giant Cell Granulomas of the Jaw Are Osteoclasts. *Cancer*, v. 62, n. 6, p. 1139-1145, 1988.

FLANAGAN, Adrienne M; SPEIGHT, Paul M. Giant Cell Lesions of the Craniofacial Bones. *Head and Neck Pathol*, v. 8, n. 4, p. 445–453, 2014.

GÁMEZ-POZO, Angelo *et al.* Protein phosphorylation analysis in archival clinical cancer samples by shotgun and targeted proteomics approaches. *Molecular BioSystems*, v. 7, n. 8, p. 2368–2374, 2011.

GIL DE LA FUENTE, Alberto *et al.* Knowledge-based metabolite annotation tool: Ceu Mass Mediator. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis February*, v. 154, p.138-149., 2018.

GOMES, Carolina C. *et al.* The highly prevalent H3F3A mutation in giant cell tumours of bone is not shared by sporadic central giant cell lesion of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 118, n. 5, p. 583–585, 2014.

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

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

GOODWIN, Sara; MCPHERSON, John D; MCCOMBIE, W Richard. Coming of age : ten years of next- generation sequencing technologies. *Nature Reviews Genetics*, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.

GUIDA, Riccardo Di *et al.* Non-targeted UHPLC-MS metabolomic data processing methods: a comparative investigation of normalisation, missing value imputation, transformation e scaling. *Metabolomics*, v. 12, n. 5, p. 1–14, 2016.

GUSTAFSSON, Ove J R; ARENTZ, Georgia; HOFFMANN, Peter. Proteomic developments in the analysis of formalin- fixed tissue. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1854, n. 6, p. 559–580, 2015.

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

HASIN, Yehudit; SELDIN, Marcus; LUSIS, Aldons. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, v. 18, n. 1, p. 1–15, 2017.

HORNBECK PV, *et al.*. PhosphoSite: A bioinformatics resource dedicated to physiological protein phosphorylation. *Proteomics*. v. 4, n. 6, p. 1551-61. 2004

HORNER, K. Central Giant Cell Granuloma of the Jaws : *Clinical Radiology*, v. 40, n. 6, p. 622–626, 1989.

JAFFE, Henry L. Giant-cell reparative granuloma, traumatic bone cyst, and fibrous (fibro-osseous) dysplasia of the jawbones. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 6, n. 1, p. 159–175, 1952.

JENSEN, Ole N. Interpreting the protein language using proteomics. *Molecular Cell Biology*, v. 7, n. 6, p. 391–403, 2006.

JI Chenfan; MCCULLOCH Cristopher A. TRPV4 integrates matrix mechanosensing with Ca²⁺ signaling to regulate extracellular matrix remodeling. *FEBS J*. Dec 9. 2020.

KABAN, Leonard B; TROULIS, Maria J. Antiangiogenic Therapy With Interferon Alpha for Giant Cell Lesions of the Jaws. *Clinical Articles*, v. 60, n. 10, p. 1103–1111, 2002.

KANEHISA, Minoru *et al.* From genomics to chemical genomics : new developments in KEGG. *Nucleic Acids Research*, v. 34, p. 354–357, 2006.

KELLY, Erew D *et al.* Metabolomic Profiling from Formalin-Fixed, Paraffin-Embedded Tumor Tissue Using Targeted LC/MS/MS : Application in Sarcoma. *PLoS ONE*, v. 6, n. 10, 2011.

KIM, Edward *et al.* Utility of the succinate : fumarate ratio for assessing SDH dysfunction in different tumor types. *Molecular Genetics e Metabolism Reports*, v. 10, p. 45–49, 2017.

KIND, Tobias *et al.* FiehnLib – mass spectral and retention index libraries for metabolomics based on quadrupole and time-of-flight gas chromatography/mass spectrometry. *Anal Chem*, v. 81, n. 24, p. 10038–10048, 2009.

KIRCH W. (eds) (2008) Pearson's Correlation Coefficient. *Encyclopedia of Public Health*. Springer, Dordrecht. 2008

KOLLIPARA, Laxmikanth; ZAHEDI, René P. Protein carbamylation: In vivo modification or in vitro artefact ? *Proteomics*, v. 13, n. 6, p. 941–944, 2013.

KRUSE-LOSLEDER, Birgit *et al.* Central giant cell granuloma of the jaws : A clinical, radiologic, and histopathologic study of 26 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 101, n. 3, p. 346–354, 2006.

KUREK, Kyle *et al.* Frequent Attenuation of the WWOX Tumor Suppressor in Osteosarcoma is Associated with Increased Tumorigenicity and Aberrant RUNX2 Expression. *Cancer Research*, v. 70, n. 13, p. 5577–5586, 2010.

LANGE, Jan De *et al.* Short communication DNA analysis of the SH3BP2 gene in patients with aggressive central giant cell granuloma. *Journal of Oral e Maxillofacial Surgery*, v. 45, n. 6, p. 499–500, 2007.

LEE, Dave C H; JONES, Erew R; HUBBARD, Simon J. Computational phosphoproteomics: From identification to localization. *Proteomics*, v. 15, n. 5-6, p. 950–963, 2015.

LESTER, S Reid *et al.* Peripheral giant cell granulomas : a series of 279 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 118, n. 4, p. 475–482, 2014.

LIBISELLER, Gunnar *et al.* IPO: a tool for automated optimization of XCMS parameters. *BMC Bioinformatics*, v. 16, n. 118, p. 1–10, 2015.

LIN, Mei *et al.* S100A7 Regulates Ovarian Cancer Cell Metastasis and Chemoresistance Through MAPK Signaling and Is Targeted by miR-330-5p. *DNA Cell Biol.* v. 37, n. 5, p.491-500. 2018

LIU, Bo; YU, Shi-Feng; LI, Tie-Jun. Multinucleated giant cells in various forms of giant cell containing lesions of the jaws express features of osteoclasts. *J Oral Pathol Med*, v. 32, n. 6, p. 367–375, 2003.

MAES, Evelyne *et al.* Proteomic analysis of formalin-fixed paraffin-embedded colorectal cancer tissue using teem mass tag protein labeling. *Molecular BioSystems*, v. 9, n. 11, p. 2686–2695, 2013.

MAGDELDIN, Sameh; YAMAMOTO, Tadashi. Toward deciphering proteomes of formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) tissues. *Proteomics*, v. 12, n. 7, p. 1045–1058, 2012.

MANN, Matthias; JENSEN, Ole N. Proteomic analysis of post-translational modifications. *Nature Biotechnology*, v. 21, n. 3, p. 255–261, 2003.

MARTINS, Allisson Felipe Lope *et al.* Glucocorticoids, calcitonin, and osteocalcin cannot differentiate between aggressive e nonaggressive central giant cell lesions of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, v. 120, n. 3, p. 386–395, 2015.

MATOS, Felipe R. *et al.* Immunoexpression of MMP-9, VEGF, e vWF in central and peripheral giant cell lesions of the jaws. *Oral Pathology & Medicine*, v. 40, n. 4, p. 338–344, 2011.

MEYERSON, Matthew; GABRIEL, Stacey; GETZ, Gad. Advances in understereering cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 10, p. 685–696, 2010.

MORI, Giorgio *et al.* The Interplay between the Bone and the immune system. *Clinical e Developmental Immunology*, v. 2013, n. 720504, 2013.

NAZ, Shama *et al.* Analytical protocols based on LC – MS, GC – MS e CE – MS for nontargeted metabolomics of biological tissues. *Bioanalysis*, v. 6, n. 12, p. 1657–1677, 2014.

NG, Ella S.M. *et al.* Extraction of tamoxifen and its metabolites from formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an innovative quantitation method using liquid chromatography e teem mass spectrometry. *Cancer Chemother Pharmacol*, v. 73, n. 3, p. 475–484, 2014.

NORDING, Malin L *et al.* Endogenous Levels of Five Fatty Acid Metabolites in Exhaled Breath Condensate to Monitor Asthma by High-Performance Liquid Chromatography: Electrospray Teem Mass Spectrometry. *IEEE Sens.* V. 10, n. 1, p.123-130, 2010.

OLIVEIRA, Ere M *et al.* Advances in Brief USP6 (Tre2) Fusion Oncogenes in Aneurysmal Bone Cyst. *Cancer Research*, v. 64, n. 6, p. 1920–1923, 2004.

OLSEN, Jesper V; ONG, Shao-en; MANN, Matthias. Trypsin Cleaves Exclusively C-terminal to Arginine and Lysine Residues. *Molecular & Cellular Proteomics*, v. 3, n. 6, p. 608–614, 2004.

OSTASIEWICZ, Paweł *et al.* Quantitatively Preserved in Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Tissue e Analyzable by High-Resolution Mass Spectrometry research articles. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 7, p. 3688–3700, 2010.

PAGET, Timothy *et al.* Metabolomics e Protozoan Parasites. *Acta Parasitologica*, v. 58, n. 2, p. 127–131, 2013.

PEACOCK, Zachary S.; JORDAN, Richard C. K.; SCHMIDT, Brian L. Giant Cell Lesions of the Jaws : Does the Level of Vascularity and Angiogenesis correlate With Behavior ? *YJOMS*, v. 70, n. 8, p. 1860–1866, 2012.

PEREIRA Núbia B; *et al.* Patient-derived xenografts of a case of ameloblastic fibrodentinoma. *Oral Dis.* v. 25, n. 4, p.1229-1233. 2019.

PEREIRA Núbia B; *et al.* First insights for targeted therapies in odontogenic myxoma. *Clin Oral Investig.* v. 24, n. 7, p. 2451-2458. 2020

PIEHOWSKI, Paul D *et al.* Residual tissue repositories as a resource for population - based cancer proteomic studies. *Clinical Proteomics*, v. 15, n. 25, p. 1–12, 2018.

RAGAMIN Aviel, *et al.* De novo TRPV4 Leu619Pro variant causes a new channelopathy characterised by giant cell lesions of the jaws and skull, skeletal abnormalities e polyneuropathy. *J Med Genet.* v. jmedgenet-2020-107427, 2021

REGEZI, Joseph A. Odontogenic Cysts, Odontogenic Tumors, Fibrousseous, and Giant Cell Lesions of the Jaws. *Modern Pathology*, v. 15, n. 3, p. 331–341, 2002.

ROTROFF, Daniel M; MOTSINGER-REIF, Alison A. Embracing Integrative

Multiomics Approaches. *International Journal of Genomics*, v. 2016, n. 17159852016, 2016.

ROURKE, Matthew B O; PADULA, Matthew P. Analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) tissue via proteomic techniques and misconceptions of antigen retrieval Matthew. *BioTechniques*, v. 60, n. 5, p. 229-238, 2016.

SCHELTEMA, Richard A; DECUYPERE, Saskia; KINDT, Ruben T. The potential of metabolomics for *Leishmania* research in the post-genomics era. *Parasitology*. V. 137, n. 9, p. 1291–1302, 2010.

SHARMA, Kirti *et al.* Ultradeep Human Phosphoproteome Reveals a Distinct Regulatory Nature. *Cell Reports Resource*, v. 8, n. 5, p. 1583–1594, 2014.

SINZ, Erea. Investigation of protein – protein interactions in living cells by chemical crosslinking e mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem*, v. 397, n. 8, p. 3433–3440, 2010.

SMITH, Colin A. *et al.* XCMS: Processing Mass Spectrometry Data for Metabolite Profiling Using Nonlinear Peak Alignment, Matching, e Identification. *Analytical Chemistry*, v. 78, n. 3, p. 779–787, fev. 2006.

SOLARI, Fiorella A. *et al.* Why phosphoproteomics is still a challenge Fiorella. *Molecular BioSystems*, v. 11, n. 6, p. 1487–1493, 2015.

SOW, AJ *et al.* Osteoglophonic dysplasia: A ‘common’ mutation in a rare disease. *Clin. Genet.* v.78, n. 2, p. 197-198, 2010.

STAVROPOULOS, F; KATZ, J. Central giant cell granulomas : A systematic review of the radiographic characteristics with the addition of 20 new cases. *Dentomaxillofacial Radiology*, v. 31, n. 4, p. 213–217, 2002.

SUMNER, Lloyd W *et al.* Proposed minimum reporting steards for chemical analysis. *Metabolomics*, v. 3, n. 3, p. 211–221, 2007.

SUN, Yan V; HU, Yi-juan. Integrative Analysis of Multi-omics Data for Discovery and Functional Studies of Complex Human Diseases. *Adv Genet*, v. 93, p. 147–190, 2017.

TAKAHASHI, Naoyuki; UDAGAWA, Naoyuki; SUDA, Tatsuo. Vitamin D endocrine

system e osteoclasts. *BoneKEy Reports*, v. 3, n. 495, p. 1–9, 2014.

T'KINDT, Ruben *et al.* Metabolomics to Unveil and Understand Phenotypic Diversity between Pathogen Populations. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 11, 2010.

TOBÓN-ARROYAVE, Sergio I. *et al.* Immunohistochemical expression of RANK, GR and CTR in central giant cell granuloma of the jaws. *Oral oncology*, v. 41, n. 5, p. 480–488, 2005.

TRIANAFILLIDOU, Katherine *et al.* Central Giant Cell Granuloma of the Jaws : A Clinical Study of 17 Cases e a Review of the Literature. v. 120, n. 3, p. 167–174, 2011.

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

VERMEREN Matthieu, *et al.* Osteoclast stimulation factor 1 (Ostf1) KNOCKOUT increases trabecular bone mass in mice. *Mamm Genome*. v. 28, n. 11-12, p. 498-514. 2017.

WAKABAYASHI, Masaki *et al.* Phosphoproteome Analysis of Formalin-Fixed e Paraffin-Embedded Tissue Sections Mounted on Microscope Slides. *J Proteome Res*. v. 13, n. 2, p. 915-24, 2014.

WANG, Haixing *et al.* Development e Evaluation of a Micro- and Nano-Scale Proteomic Sample Preparation Method. *Journal Proteome Research*, v. 4, n. 6, p. 2397–2403, 2005.

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

WILLIFORSS, Jakob; CHAWADE, Aakash; LEVEER, Fredrik. NormalyzerDE : Online tool for improved normalization of omics expression data and high-sensitivity differential expression analysis. *Journal of Proteome Research*, v. 18, n. 2, p. 732-740, 2018.

WISHART, David S *et al.* HMDB : the Human Metabolome Database. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. D531-6, p. 521–526, 2007.

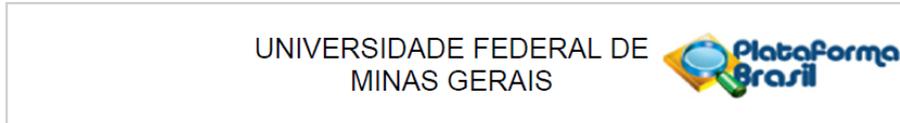
WOJAKOWSKA, Anna *et al.* An optimized method of metabolite extraction from formalin-fixed paraffin-embedded tissue for GC/MS analysis. *PLoS ONE*, v. 10, n. 9, p. 1–13, 2015.

YUAN, Min *et al.* A positive/negative ion – switching, targeted mass spectrometry – based metabolomics platform for bodily fluids, cells, and fresh and fixed tissue. *Nature Protocols*, v. 7, n. 5, p. 872–881, 2012.

ZHANG, Wei; LIU, Hui Tu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. *Cell Research*, v. 12, n. 1, p. 9–18, 2002.

ANEXOS

Anexo 1. Parecer consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE MOLECULAR DA LESÃO CENTRAL DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES

Pesquisador: Ricardo Santiago Gomez

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 99684918.0.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.029.397

Continuação do Parecer: 3.029.397

Outros	aprovacao_final_colegiado_odontologia.pdf	08/08/2018 12:43:23	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
--------	---	------------------------	------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 21 de Novembro de 2018

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

APÊNDICES

Apêndice 1. Vias enriquecidas relacionadas ao status mutacional

Tabela 1. Vias enriquecidas relacionada ao grupo FGFR1

FGFR1			
Classificação	Via enriquecida	p-valor	q-value (FDR: BH- method)
Apoptose	Activation of BAD e translocation to mitochondria	2.68E-07	4.13E-05
Apoptose	Activation of BH3-only proteins	3.14E-06	1.38E-04
Apoptose	APOPTOSE	9.57E-05	9.83E-04
Apoptose	CASPASES	2.01E-05	3.45E-04
Apoptose	DEATH RECEPTOR	1.54E-04	1.35E-03
Apoptose	Expanded Apoptosis	4.12E-04	2.49E-03
Apoptose	Fas	2.45E-06	1.51E-04
Apoptose	Intrinsic Pathway for Apoptosis	1.69E-05	3.25E-04
Apoptose	MITOCHONDRIA OXIDATIVE STRESS	1.09E-05	2.40E-04
Apoptose	MOMP REGULATION	7.50E-04	4.13E-03
Apoptose	Programmed Cell Death	2.95E-04	2.21E-03
Apoptose	RCD GENES	4.20E-04	2.49E-03
Apoptose	TNFalpha	2.20E-03	1.04E-02
Ciclo celular	Cell cyle	3.18E-04	2.33E-03
Ciclo celular	Cell cycle Checkpoints	3.89E-03	1.69E-02
Ciclo celular	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	2.68E-07	4.13E-05
Ciclo celular	Class I PI3K signaling events mediated by Akt	7.85E-06	2.20E-04
Ciclo celular	G2 M CHECKPOINT	8.34E-04	4.43E-03
Ciclo celular	G2/M Checkpoints	1.59E-04	1.36E-03
Ciclo celular	G2/M DNA damage checkpoint	8.19E-05	1.01E-03
Diferenciação celular	EGF	3.95E-06	1.52E-04
Diferenciação celular	EGFR1	1.40E-02	4.73E-02
Diferenciação celular	EMT REGULATORS	3.35E-04	2.35E-03
Sinalização celular/Arquitetura de tecido	a6b1 e a6b4 Integrin signaling	1.69E-05	3.25E-04
Sinalização celular	Collecting duct acid secretion	4.25E-04	2.47E-03
Sinalização celular	EGF receptor signaling	2.80E-04	2.16E-03
Sinalização celular	EGFR signaling for RTKC	3.99E-04	2.46E-03
Sinalização celular	ErbB1 downstream signaling	2.20E-04	1.79E-03
Sinalização celular	FGF	5.62E-05	7.52E-04
Sinalização celular	FGF signaling	2.08E-04	1.73E-03
Sinalização celular	FoxO family signaling	2.19E-05	3.55E-04
Sinalização celular	HEDGEHOG	3.31E-03	1.48E-02
Sinalização celular	Hippo signaling	1.30E-02	4.59E-02
Sinalização celular	LKB1 signaling events	1.47E-05	3.02E-04
Sinalização celular	Macrophage Map Update ver2 re	6.85E-03	2.77E-02
Sinalização celular	mTOR signaling	4.90E-05	6.86E-04
Sinalização celular	NOTCH4 Activation e Transmission of Signal to the Nucleus	2.30E-03	1.07E-02
Sinalização celular	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	6.67E-09	2.05E-06
Sinalização celular	PDGFR-beta signaling	3.75E-04	2.41E-03
Sinalização celular	phospholipase c delta in phospholipid associated cell signalling	4.59E-03	1.88E-02

Sinalização celular	PI3K AKT MTOR	4.32E-03	1.80E-02
Sinalização celular	PI3K-Akt signaling	6.94E-03	2.78E-02
Sinalização celular	Regulation of nuclear beta catenin signaling e target gene transcription	9.55E-05	1.01E-03
Sinalização celular	RHO GTPase Effectors	3.58E-04	2.40E-03
Sinalização celular	RHO GTPases activate PKNs	1.18E-04	1.11E-03
Sinalização celular	Signaling by Rho GTPases	1.32E-03	6.68E-03
Sinalização celular	Trk receptor signaling mediated by PI3K e PLC-gamma	8.56E-06	2.03E-04
Sinalização celular	WNT NON CANONICAL	1.01E-03	5.27E-03
Sinalização celular e Sistema imune	Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	3.10E-05	4.78E-04
Sinalização celular e Arquitetura de tecido	Alpha9 beta1 integrin signaling events	3.64E-04	2.38E-03
Atividade de eritrocítica	Erythrocytes take up carbon dioxide e release oxygen	9.53E-05	1.09E-03
Atividade de eritrocítica	Erythrocytes take up oxygen e release carbon dioxide	4.41E-05	6.47E-04
Atividade de eritrocítica	O2/CO2 exchange in erythrocytes	9.53E-05	1.09E-03
Expressão gênica	FOXO-mediated transcription	7.85E-06	2.20E-04
Expressão gênica	Genes targeted by miRNAs in adipocytes	1.48E-02	4.97E-02
Expressão gênica	Regulation of localization of FOXO transcription factors	2.68E-07	4.13E-05
Expressão gênica	TP53 Regulates Metabolic Genes	1.07E-04	1.03E-03
Expressão gênica	Transcriptional Regulation by TP53	7.39E-03	2.92E-02
Sistema imune e Sinalização celular	Toll-Like receptor signaling network	3.93E-04	2.47E-03
Metabolismo de carboidrato	insulin	8.86E-05	1.05E-03
Metabolismo de carboidrato	insulin Mam	1.03E-04	1.02E-03
Metabolismo de carboidrato	Insulin-mediated glucose transport	4.40E-06	1.51E-04
Metabolismo de proteína	Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements	3.97E-03	1.68E-02
Outros	adipocyte v2 1	9.01E-03	3.51E-02
Outros	Bicarbonate transporters	1.14E-02	4.35E-02
Outros	Calcium Regulation in the Cardiac Cell	5.99E-04	3.42E-03
Outros	Defective SLC4A1 causes hereditary spherocytosis type 4 (HSP4), distal renal tubular acidosis (dRTA) e dRTA with hemolytic anemia (dRTA-HA)	1.15E-03	5.90E-03
Outros	Gastric acid secretion	3.26E-03	1.47E-02
Outros	Hepatitis B	1.15E-02	4.33E-02
Outros	Hepatitis C	1.33E-02	4.65E-02
Outros	hepatocyte v2 9	1.11E-02	4.28E-02
Outros	Myometrial Relaxation e Contraction	6.72E-04	3.76E-03
Outros	Oocyte meiosis	3.33E-04	2.39E-03
Outros	Parkinson disease	1.23E-04	1.11E-03
Outros	Pathogenic Escherichia coli infection	1.77E-03	8.63E-03
Outros	Pertussis	3.34E-03	1.47E-02
Outros	Reversible hydration of carbon dioxide	1.37E-02	4.69E-02
Outros	SENESCENCE	2.60E-06	1.33E-04
Outros	Skeletal muscle v2 9	1.29E-02	4.60E-02
Outros	STARVATION AUTOPHAGY	7.50E-04	4.13E-03
Outros	Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) Susceptibility	1.36E-02	4.71E-02
Outros	Triglyceride catabolism	1.48E-02	4.97E-02
Atividade plaquetária e Sinalização celular	GP1b-IX-V activation signalling	1.26E-02	4.55E-02
Arquitetura de tecido	Alpha6Beta4Integrin	6.41E-05	8.22E-04

Arquitetura de tecido	Beta1 integrin cell surface interactions	2.53E-03	1.16E-02
Arquitetura de tecido	CYTOSKELETON POLARITY	1.20E-02	4.45E-02
Arquitetura de tecido	Regulation of actin cytoskeleton	1.66E-03	8.25E-03

Tabela 2. Vias enriquecidas relacionada ao grupo KRAS

KRAS			
Classification	Gene \ Pathway	p-value	q-value (FDR: BH-method)
Apoptose	Activation of BAD e translocation to mitochondria	7.78E-08	1.56E-05
Apoptose	Activation of BH3-only proteins	2.26E-06	1.52E-04
Apoptose	Apoptosis	6.97E-04	8.08E-03
Apoptose	CASPASES	1.65E-05	5.23E-04
Apoptose	DEATH RECEPTOR	3.35E-05	7.76E-04
Apoptose	Expanded Apoptosis	2.04E-03	1.68E-02
Apoptose	Fas	1.62E-06	1.39E-04
Apoptose	Intrinsic Pathway for Apoptosis	2.14E-05	5.62E-04
Apoptose	MITOCHONDRIA OXIDATIVE STRESS	1.20E-05	4.53E-04
Apoptose	MOMP REGULATION	2.99E-04	4.00E-03
Apoptose	Programmed Cell Death	8.78E-04	9.46E-03
Apoptose	RCD GENES	1.18E-04	2.16E-03
Apoptose	STARVATION AUTOPHAGY	2.84E-03	2.06E-02
Apoptose	TNFalpha	2.03E-04	3.22E-03
Ciclo celular	Cell cycle	9.65E-04	9.87E-03
Ciclo celular	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	7.78E-08	1.56E-05
Ciclo celular	G2/M Checkpoints	4.00E-04	5.25E-03
Ciclo celular	G2/M DNA damage checkpoint	1.70E-04	3.01E-03
Ciclo celular	Cell cycle Checkpoints	3.91E-03	2.48E-02
Diferenciação celular	EGF	3.08E-06	1.86E-04
Diferenciação celular	EGFR1	4.75E-06	2.61E-04
Sinalização celular	Macrophage Map Update ver2 re	8.58E-04	9.40E-03
Sinalização celular e metabolismo de carboidrato	Glucagon signaling	6.37E-03	3.46E-02
Sinalização celular e Arquitetura de tecido	a6b1 e a6b4 Integrin signaling	2.14E-05	5.62E-04
Sinalização celular	Class I PI3K signaling events mediated by Akt	7.73E-06	3.59E-04
Sinalização celular	EGF receptor signaling	8.23E-04	9.20E-03
Sinalização celular	EGFR signaling for RTKC	1.10E-03	1.04E-02
Sinalização celular	ErbB1 downstream signaling	4.16E-05	9.28E-04
Sinalização celular	FGF	1.04E-04	2.02E-03
Sinalização celular	FGF signaling	5.64E-04	6.80E-03
Sinalização celular	FoxO family signaling	3.01E-05	7.27E-04
Sinalização celular	Gene e protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12 stimulation	8.55E-03	4.33E-02
Sinalização celular	LKB1 signaling events	1.78E-05	4.89E-04
Sinalização celular	mTOR signaling	8.68E-05	1.74E-03
Sinalização celular	NOTCH4 Activation and Transmission of Signal to the Nucleus	7.34E-03	3.92E-02
Sinalização celular	p38 MAPK signaling	5.04E-03	2.95E-02
Sinalização celular	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	1.05E-08	6.36E-06
Sinalização celular	PDGFR-beta signaling	1.19E-03	1.09E-02
Sinalização celular	Regulation of nuclear beta catenin signaling e target gene transcription	2.07E-04	3.20E-03
Sinalização celular	RHO GTPase Effectors	9.50E-04	1.00E-02

Sinalização celular	RHO GTPases activate PKNs	2.73E-04	3.83E-03
Sinalização celular	Signaling by Rho GTPases	5.41E-03	3.08E-02
Sinalização celular	Trk receptor signaling mediated by PI3K e PLC-gamma	8.68E-06	3.49E-04
Sinalização celular	VEGFA-VEGFR2 Signaling	2.12E-04	3.20E-03
Sinalização celular	WNT NON CANONICAL	3.80E-03	2.44E-02
Sinalização celular	HEDGEHOG	4.37E-04	5.61E-03
Sinalização celular e Apoptose	Hippo-Yap signaling	3.19E-03	2.29E-02
Sinalização celular e Sistema imune	Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	1.64E-06	1.24E-04
Atividade eritrocítica	Erythrocytes take up carbon dioxide e release oxygen	1.01E-03	9.94E-03
Atividade eritrocítica	Erythrocytes take up oxygen e release carbon dioxide	4.68E-04	5.88E-03
Atividade eritrocítica	O2/CO2 exchange in erythrocytes	1.01E-03	9.94E-03
Expressão gênica	FOXO-mediated transcription	7.73E-06	3.59E-04
Expressão gênica	Nonsense-Mediated Decay (NMD)	8.63E-03	4.30E-02
Expressão gênica	Regulation of localization of FOXO transcription factors	7.78E-08	1.56E-05
Expressão gênica	TP53 Regulates Metabolic Genes	1.27E-05	4.50E-04
Expressão gênica	Transcriptional Regulation by TP53	1.94E-03	1.65E-02
Sistema imune	Immune system	1.75E-04	3.02E-03
Sistema imune	Innate immune system	1.10E-04	2.07E-03
Sistema imune	Neutrophil degranulation	1.01E-07	1.01E-05
Sistema imune e Sinalização celular	IL3-mediated signaling events	4.38E-03	2.67E-02
Sistema imune e Sinalização celular	TCR	1.91E-03	1.64E-02
Sistema imune e Sinalização celular	Toll-Like receptor signaling network	1.32E-03	1.18E-02
Metabolismo de carboidrato	beta cell v2 3	2.06E-03	1.68E-02
Metabolismo de carboidrato	gluconeogenesis	3.76E-03	2.44E-02
Metabolismo de carboidrato	glycolysis	3.47E-03	2.43E-02
Metabolismo de carboidrato	insulin	1.88E-04	3.14E-03
Metabolismo de carboidrato	insulin Mam	2.28E-04	3.35E-03
Metabolismo de carboidrato	Insulin-mediated glucose transport	6.02E-08	1.81E-05
Metabolismo de proteína	Cap-dependent Translation Initiation	9.47E-03	4.57E-02
Metabolismo de proteína	Cytoplasmic Ribosomal Proteins	4.11E-03	2.55E-02
Metabolismo de proteína	Eukaryotic Translation Initiation	9.47E-03	4.57E-02
Metabolismo de proteína	Formation of a pool of free 40S subunits	6.03E-03	3.34E-02
Metabolismo de proteína	GTP hydrolysis e joining of the 60S ribosomal subunit	8.02E-03	4.14E-02
Metabolismo de proteína	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	7.83E-03	4.07E-02
Metabolismo de proteína	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	4.80E-03	2.84E-02
Metabolismo de RNA	Metabolism of RNA	8.26E-03	4.22E-02
Metabolismo de RNA	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	8.63E-03	4.30E-02
Metabolismo de RNA	Regulation of mRNA stability by proteins that bind AU-rich elements	3.48E-03	2.41E-02
Outros	adipocyte v2 1	2.79E-03	2.05E-02

Outros	APOBEC3G mediated resistance to HIV-1 infection	7.90E-05	1.70E-03
Outros	Assembly of Viral Components at the Budding Site	7.34E-03	3.92E-02
Outros	Calcium Regulation in the Cardiac Cell	1.65E-05	5.23E-04
Outros	Collecting duct acid secretion	4.38E-03	2.67E-02
Outros	Defective SLC4A1 causes hereditary spherocytosis type 4 (HSP4), distal renal tubular acidosis (dRTA) e dRTA with hemolytic anemia (dRTA-HA)	3.68E-03	2.52E-02
Outros	Detoxification of Reactive Oxygen Species	6.12E-03	3.35E-02
Outros	Disease	8.59E-03	4.32E-02
Outros	downregulated of mta-3 in er-negative breast tumors	2.66E-03	2.03E-02
Outros	Early Phase of HIV Life Cycle	1.17E-03	1.09E-02
Outros	Fluid shear stress e atherosclerosis	1.62E-03	1.44E-02
Outros	Gastric acid secretion	2.61E-03	2.02E-02
Outros	Hemostasis	8.68E-03	4.26E-02
Outros	hepatocyte v2 9	4.08E-03	2.56E-02
Outros	Human cytomegalovirus infection	9.23E-03	4.49E-02
Outros	Human immunodeficiency virus 1 infection	1.00E-03	1.01E-02
Outros	Infectious disease	9.50E-04	1.00E-02
Outros	Influenza Infection	2.31E-03	1.83E-02
Outros	Influenza Life Cycle	1.75E-03	1.53E-02
Outros	Integration of provirus	4.68E-04	5.88E-03
Outros	Lissencephaly gene (LIS1) in neuronal migration e development	5.75E-03	3.21E-02
Outros	Metal sequestration by antimicrobial proteins	1.97E-04	3.20E-03
Outros	Minus-stre DNA synthesis	3.68E-03	2.52E-02
Outros	Myometrial Relaxation e Contraction	2.50E-04	3.60E-03
Outros	Oocyte meiosis	8.14E-05	1.69E-03
Outros	Parkinson disease	2.86E-04	3.92E-03
Outros	Pertussis	2.71E-03	2.05E-02
Outros	Phototransduction	4.70E-03	2.81E-02
Outros	Plus-stre DNA synthesis	3.68E-03	2.52E-02
Outros	Prolactin	1.97E-03	1.65E-02
Outros	Prolactin Signaling	2.71E-03	2.05E-02
Outros	Prostaglandin Synthesis e Regulation	5.93E-04	7.01E-03
Outros	Reverse Transcription of HIV RNA	3.68E-03	2.52E-02
Outros	SENESCENCE	1.78E-05	5.12E-04
Outros	Skeletal muscle v2 9	5.29E-03	3.04E-02
Outros	Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) Susceptibility	2.59E-03	2.03E-02
Outros	Uncoating of the HIV Virion	3.68E-03	2.52E-02
Outros	Viral carcinogenesis	8.22E-04	9.35E-03
Outros	Viral mRNA Translation	4.24E-03	2.61E-02
Outros	Virus Assembly e Release	7.34E-03	3.92E-02
Atividade plaquetária	Platelet degranulation	9.91E-03	4.70E-02
Arquitetura de tecido	Alpha6Beta4Integrin	2.15E-03	1.73E-02

Tabela 3. Vias enriquecidas relacionada ao grupo TRPV4

TRPV4			
Classificação	Via enriquecida	p-valor	q-value (FDR: BH- method)
Apoptose	Activation of BAD e translocation to mitochondria	2.39E-05	1.44E-03
Apoptose	Activation of BH3-only proteins	2.69E-04	5.53E-03
Apoptose	APOPTOSE	1.20E-05	8.52E-04
Apoptose	CASPASES	8.67E-05	2.60E-03
Apoptose	DEATH RECEPTOR	2.18E-04	4.72E-03
Apoptose	Expeed Apoptose	1.63E-04	4.11E-03
Apoptose	Fas	2.11E-04	4.85E-03
Apoptose	Intrinsic Pathway for Apoptose	1.38E-03	1.70E-02
Apoptose	MITOCHONDRIA OXIDATIVE STRESS	9.04E-04	1.31E-02
Apoptose	MOMP REGULATION	1.14E-03	1.56E-02
Ciclo celular	G2 M CHECKPOINT	6.12E-03	4.73E-02
Ciclo celular	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	2.39E-05	1.44E-03
Diferenciação celular	EGF	3.37E-04	6.58E-03
Diferenciação celular	EGFR1	6.69E-05	2.27E-03
Diferenciação celular	EMT REGULATORS	1.83E-03	2.07E-02
Diferenciação celular	FIBROBLAST ACTIVATION MARKERS	4.24E-03	4.14E-02
Sinalização celular	Class I PI3K signaling events mediated by Akt	6.57E-04	1.07E-02
Sinalização celular	FGF	4.30E-03	4.15E-02
Sinalização celular	FoxO family signaling	1.76E-03	2.08E-02
Sinalização celular	Gene e protein expression by JAK-STAT signaling after Interleukin-12 stimulation	3.42E-05	1.57E-03
Sinalização celular	HEDGEHOG	2.03E-03	2.26E-02
Sinalização celular	LKB1 signaling events	5.61E-05	2.09E-03
Sinalização celular	mTOR signaling	3.78E-03	3.78E-02
Sinalização celular	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	2.95E-06	2.88E-04
Sinalização celular	Photodynamic therapy-induced NFE2L2 (NRF2) survival signaling	5.60E-03	4.70E-02
Sinalização celular	PI3K-Akt signaling	1.62E-03	1.94E-02
Sinalização celular	RHO GTPase Effectors	8.18E-04	1.23E-02
Sinalização celular	RHO GTPases Activate NADPH Oxidases	6.09E-03	4.75E-02
Sinalização celular	Signaling by Rho GTPases	5.78E-03	4.65E-02
Sinalização celular	Trk receptor signaling mediated by PI3K e PLC-gamma	7.14E-04	1.12E-02
Sinalização celular	VEGFR3 signaling in lymphatic endothelium	6.60E-03	4.95E-02
Sinalização celular e Apoptose	Hippo-Yap signaling	5.60E-03	4.70E-02
Sinalização celular e Sistema imune	Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	2.46E-03	2.66E-02
Sinalização celular e arquitetura de tecido	a6b1 e a6b4 Integrin signaling	1.38E-03	1.70E-02
Sinalização celular e arquitetura de tecido	Alpha4 beta1 integrin signaling events	6.03E-04	1.00E-02
Atividade eritrocítica	Erythrocytes take up carbon dioxide e release oxygen	1.78E-03	2.08E-02
Atividade eritrocítica	Erythrocytes take up oxygen e release carbon dioxide	8.32E-04	1.23E-02
Atividade eritrocítica	O2/CO2 exchange in erythrocytes	1.78E-03	2.08E-02

Expressão gênica	Direct p53 effectors	5.01E-03	4.30E-02
Expressão gênica	FOXO-mediated transcription	6.57E-04	1.07E-02
Expressão gênica	Regulation of localization of FOXO transcription factors	2.39E-05	1.44E-03
Sistema imune	Sistema imune	1.22E-03	1.59E-02
Sistema imune	Inflammatory Response	4.15E-04	7.20E-03
Sistema imune	Innate Sistema imune	5.34E-05	2.09E-03
Sistema imune	Neutrophil degranulation	2.80E-06	3.64E-04
Sistema imune	Regulation of TLR by endogenous ligo	1.03E-04	2.87E-03
Sistema imune e Sinalização celular	Interleukin-12 family signaling	1.70E-04	4.16E-03
Sistema imune e Sinalização celular	Interleukin-12 signaling	7.99E-05	2.49E-03
Metabolismo de carboidrato	insulin	6.57E-03	4.99E-02
Metabolismo de carboidrato	Insulin-mediated glucose transport	3.74E-04	6.96E-03
Metabolismo de proteína	Protein digestion e absorption	7.69E-05	2.50E-03
Outros	adenine e adenosine salvage II	4.90E-03	4.50E-02
Outros	Bile secretion	5.06E-03	4.30E-02
Outros	Defective SLC4A1 causes hereditary spherocytosis type 4 (HSP4), distal renal tubular acidosis (dRTA) e dRTA with hemolytic anemia (dRTA-HA)	4.90E-03	4.50E-02
Outros	downregulated of mta-3 in er-negative breast tumors	4.68E-03	4.40E-02
Outros	Gastric acid secretion	5.90E-03	4.70E-02
Outros	Hemostasis	1.16E-05	9.04E-04
Outros	intrinsic prothrombin activation	5.60E-03	4.70E-02
Outros	Metal sequestration by antimicrobial proteins	3.50E-04	6.67E-03
Outros	Minus-stre DNA synthesis	4.90E-03	4.50E-02
Outros	NECROPTOSIS	2.12E-03	2.33E-02
Outros	Plus-stre DNA synthesis	4.90E-03	4.50E-02
Outros	Prolactin	4.48E-03	4.27E-02
Outros	Prolactin Signaling	6.12E-03	4.73E-02
Outros	Proximal tubule bicarbonate reclamation	5.60E-03	4.70E-02
Outros	regulators of bone mineralization	1.26E-03	1.62E-02
Outros	Reverse Transcription of HIV RNA	4.90E-03	4.50E-02
Outros	SENESCENCE	9.37E-04	1.33E-02
Outros	STARVATION AUTOPHAGY	1.14E-03	1.56E-02
Outros	Uncoating of the HIV Virion	4.90E-03	4.50E-02
Outros	Vitamin D Receptor	2.66E-04	5.62E-03
Outros	Calcium Regulation in the Cardiac Cell	6.09E-03	4.80E-02
Atividade plaquetária	Platelet activation	2.99E-03	3.11E-02
Atividade plaquetária	Platelet activation, signaling e aggregation	2.12E-04	4.74E-03
Atividade plaquetária	Platelet Adhesion to exposed collagen	1.26E-03	1.62E-02
Atividade plaquetária	Platelet Aggregation (Plug Formation)	7.14E-04	1.12E-02
Atividade plaquetária	Platelet degranulation	2.90E-03	3.06E-02
Atividade plaquetária	Response to elevated platelet cytosolic Ca ²⁺	3.36E-03	3.45E-02
Atividade plaquetária e Sinalização celular	GP1b-IX-V activation signalling	1.80E-05	1.17E-03
Arquitetura de tecido	Alpha6Beta4Integrin	4.86E-03	4.52E-02
Arquitetura de tecido	Anchoring fibril formation	4.90E-05	2.01E-03
Arquitetura de tecido	Assembly of collagen fibrils e other multimeric structures	2.08E-04	4.93E-03
Arquitetura de tecido	Beta1 integrin cell surface interactions	7.87E-07	1.23E-04

Arquitetura de tecido	Beta3 integrin cell surface interactions	6.65E-08	5.19E-05
Arquitetura de tecido	CELL MATRIX ADHESIONS	2.58E-03	2.76E-02
Arquitetura de tecido	Cell surface interactions at the vascular wall	3.78E-03	3.78E-02
Arquitetura de tecido	Collagen biosynthesis e modifying enzymes	3.19E-04	6.39E-03
Arquitetura de tecido	Collagen chain trimerization	6.15E-05	2.18E-03
Arquitetura de tecido	Collagen degradation	5.25E-06	4.55E-04
Arquitetura de tecido	Collagen formation	9.37E-04	1.33E-02
Arquitetura de tecido	Crosslinking of collagen fibrils	8.69E-05	2.51E-03
Arquitetura de tecido	Degradation of the extracellular matrix	1.16E-07	3.01E-05
Arquitetura de tecido	ECM	3.45E-03	3.50E-02
Arquitetura de tecido	ECM proteoglycans	1.10E-04	2.97E-03
Arquitetura de tecido	ECM-receptor interaction	2.85E-06	3.18E-04
Arquitetura de tecido	Extracellular matrix organization	8.80E-08	3.44E-05
Arquitetura de tecido	Focal adhesion	3.96E-04	7.18E-03
Arquitetura de tecido	Integrin	3.10E-05	1.51E-03
Arquitetura de tecido	Integrin cell surface interactions	1.16E-07	2.27E-05
Arquitetura de tecido	miRNA targets in ECM e membrane receptors	1.62E-04	4.21E-03
Arquitetura de tecido	Non-integrin membrane-ECM interactions	3.42E-05	1.57E-03

Tabela 4. Vias enriquecidas relacionadas ao grupo WT

WT			
Classificação	Gene \ Pathway	p-value	q-value (FDR: BH-method)
Apoptose	Activation of BAD e translocation to mitochondria	3.18E-06	5.89E-05
Apoptose	Activation of BH3-only proteins	3.67E-05	5.52E-04
Apoptose	APOPTOSE	2.26E-03	1.65E-02
Apoptose	Apoptose	2.64E-03	1.81E-02
Apoptose	CASPASES	5.15E-04	4.85E-03
Apoptose	DEATH RECEPTOR	3.52E-03	2.20E-02
Apoptose	Fas	2.87E-05	4.45E-04
Apoptose	FGF	6.31E-04	5.72E-03
Apoptose	Intrinsic Pathway for Apoptose	1.94E-04	2.07E-03
Apoptose	Programmed Cell Death	3.14E-03	2.04E-02
Apoptose	RCD GENES	3.25E-04	3.19E-03
Apoptose	MITOCHONDRIA OXIDATIVE STRESS	1.26E-04	1.41E-03
Apoptose	MOMP REGULATION	7.65E-03	4.09E-02
Apoptose	role of mef2d in t-cell apoptose	2.58E-03	1.80E-02
Apoptose	TNFalpha	2.73E-03	1.85E-02
Ciclo celular	Ciclo celular	3.38E-03	2.14E-02
Ciclo celular	Ciclo celular	3.70E-03	2.25E-02
Ciclo celular	Chk1/Chk2(Cds1) mediated inactivation of Cyclin B:Cdk1 complex	3.18E-06	5.89E-05
Ciclo celular	Class I PI3K signaling events mediated by Akt	9.10E-05	1.09E-03
Ciclo celular	G2 M CHECKPOINT	8.46E-03	4.33E-02
Ciclo celular	G2/M Checkpoints	1.74E-03	1.31E-02
Ciclo celular	G2/M DNA damage checkpoint	9.11E-04	7.83E-03
Diferenciação celular	EGF	4.61E-05	6.53E-04
Diferenciação celular	EGFR1	5.32E-03	3.12E-02
Sinalização celular e Arquitetura de tecido	a6b1 e a6b4 Integrin signaling	1.94E-04	2.07E-03
Sinalização celular	EGF receptor signaling	2.99E-03	1.97E-02
Sinalização celular	EGFR signaling for RTKC	8.45E-03	4.37E-02
Sinalização celular	ErbB1 downstream signaling	2.38E-03	1.71E-02
Sinalização celular	FGF signaling	2.25E-03	1.66E-02
Sinalização celular	FoxO family signaling	2.50E-04	2.51E-03
Sinalização celular	LKB1 signaling events	1.69E-04	1.85E-03
Sinalização celular	mTOR signaling	5.51E-04	5.10E-03
Sinalização celular	NOTCH4 Activation e Transmission of Signal to the Nucleus	5.05E-03	3.00E-02
Sinalização celular	p38 signaling mediated by MAPKAP kinases	1.96E-07	3.93E-06
Sinalização celular	PDGFR-beta signaling	3.96E-03	2.38E-02
Sinalização celular	Regulation of nuclear beta catenin signaling e target gene transcription	1.06E-03	8.77E-03
Sinalização celular	RHO GTPase Effectors	7.66E-03	4.00E-02
Sinalização celular	RHO GTPases activate PKNs	6.20E-05	8.28E-04
Sinalização celular	Role of Calcineurin-dependent NFAT signaling in lymphocytes	3.53E-04	3.39E-03
Sinalização celular	Trk receptor signaling mediated by PI3K e PLC-gamma	9.92E-05	1.14E-03
Sinalização celular	VEGFA-VEGFR2 Signaling	2.82E-03	1.88E-02
Erythrocyte activities	Erythrocytes take up carbon dioxide e release oxygen	9.52E-11	2.69E-09

Erythrocyte activities	Erythrocytes take up oxygen e release carbon dioxide	9.38E-12	4.51E-10
Erythrocyte activities	O2/CO2 exchange in erythrocytes	9.52E-11	2.69E-09
Expressão gênica	FOXO-mediated transcription	9.10E-05	1.09E-03
Expressão gênica	Regulation of localization of FOXO transcription factors	3.18E-06	5.89E-05
Expressão gênica	TP53 Regulates Metabolic Genes	1.18E-03	9.43E-03
Sistema imune e Sinalização celular	Toll-Like receptor signaling network	3.34E-03	2.14E-02
Metabolismo de carboidrato	insulin	9.83E-04	8.29E-03
Metabolismo de carboidrato	insulin Mam	1.14E-03	9.26E-03
Metabolismo de carboidrato	Insulin-mediated glucose transport	5.14E-05	7.06E-04
Metabolismo de proteína	Cytoplasmic Ribosomal Proteins	6.36E-13	3.06E-10
Metabolismo de proteína	Activation of the mRNA upon binding of the cap-binding complex and eIFs, e subsequent binding to 43S	9.68E-03	4.70E-02
Metabolismo de proteína	Cap-dependent Translation Initiation	1.02E-11	4.47E-10
Metabolismo de proteína	Eukaryotic Translation Initiation	1.02E-11	4.47E-10
Metabolismo de proteína	Formation of a pool of free 40S subunits	2.28E-12	2.19E-10
Metabolismo de proteína	Formation of the ternary complex, and subsequently, the 43S complex	7.31E-03	3.99E-02
Metabolismo de proteína	GTP hydrolysis e joining of the 60S ribosomal subunit	5.88E-12	4.04E-10
Metabolismo de proteína	L13a-mediated translational silencing of Ceruloplasmin expression	5.42E-12	4.34E-10
Metabolismo de proteína	Ribosomal scanning e start codon recognition	9.37E-03	4.65E-02
Metabolismo de proteína	Ribosome	2.81E-11	9.66E-10
Metabolismo de proteína	SRP-dependent cotranslational protein targeting to membrane	1.06E-12	1.70E-10
Metabolismo de proteína	Translation	1.09E-08	2.38E-07
Metabolismo de proteína	Translation initiation complex formation	9.37E-03	4.65E-02
Metabolismo de RNA	Metabolismo de RNA	2.51E-07	4.83E-06
Metabolismo de RNA	Nonsense Mediated Decay (NMD) enhanced by the Exon Junction Complex (EJC)	7.49E-12	4.50E-10
Metabolismo de RNA	Nonsense Mediated Decay (NMD) independent of the Exon Junction Complex (EJC)	1.29E-12	1.56E-10
Metabolismo de RNA	Nonsense-Mediated Decay (NMD)	7.49E-12	4.50E-10
Metabolismo de RNA	rRNA processing	1.13E-09	2.60E-08
Metabolismo de RNA	rRNA processing in the nucleus e cytosol	7.22E-10	1.74E-08
Metabolismo de RNA	Major pathway of rRNA processing in the nucleolus e cytosol	4.70E-10	1.19E-08
Outros	African trypanosomiasis	8.34E-05	1.03E-03
Outros	Collecting duct acid secretion	4.13E-05	6.01E-04
Outros	Defective SLC4A1 causes hereditary spherocytosis type 4 (HSP4), distal renal tubular acidosis (dRTA) e dRTA with hemolytic anemia (dRTA-HA)	2.53E-03	1.79E-02
Outros	Disease	1.68E-05	2.70E-04
Outros	hemoglobins chaperone	4.13E-06	6.85E-05
Outros	Infectious disease	5.41E-08	1.13E-06
Outros	Influenza Infection	9.38E-11	2.82E-09
Outros	Influenza Life Cycle	4.77E-11	1.53E-09
Outros	Influenza Viral RNA Transcription e Replication	2.63E-11	9.72E-10

Outros	Macrophage Map Update ver2 re	7.28E-03	4.02E-02
Outros	Malaria	2.35E-04	2.41E-03
Outros	Myometrial Relaxation e Contraction	6.89E-03	3.95E-02
Outros	Oocyte meiosis	3.54E-03	2.18E-02
Outros	Parkinson disease	1.35E-03	1.05E-02
Outros	Pathogenic Escherichia coli infection	8.46E-03	4.28E-02
Outros	Pathogenic Escherichia coli infection	8.46E-03	4.28E-02
Outros	Calcium Regulation in the Cardiac Cell	6.18E-03	3.58E-02
Outros	downregulated of mta-3 in er-negative breast tumors	1.26E-03	9.95E-03
Outros	SENESCENCE	7.09E-05	8.97E-04
Outros	STARVATION AUTOPHAGY	7.65E-03	4.09E-02
Outros	Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) Susceptibility	7.14E-03	3.99E-02
Outros	Transport of small molecules	7.48E-03	4.04E-02
Outros	Viral mRNA Translation	7.07E-13	1.70E-10
Outros	Vitamin B12 Metabolism	7.03E-03	3.98E-02
Arquitetura de tecido	Alpha6Beta4Integrin	7.17E-04	6.39E-03
Transporte mediado por vesículas	Binding e Uptake of Liges by Scavenger Receptors	1.68E-03	1.29E-02
Transporte mediado por vesículas	Scavenging of heme from plasma	8.77E-04	7.67E-03

Apêndice 2. Molecular features que diferiram entre os grupos

<i>Molecular Feature</i>	Modo de ionização	m.z	rt	Identificação putativa	KRAS x WT		KRAS x TRPV4		FGFR x WT		FGFR x TRPV4		TRPV4 x WT	
					p valor	log2 FC	p valor	log2 FC	p valor	log2 FC	p valor	log2 FC	p valor	log2 FC
M271T653	Positivo	271.1104	10.8849	Desconhecida										
M277T686	Positivo	276.6454	11.4291	Desconhecida	0.0164	-2.90								
M325T604	Positivo	325.3067	10.0672	Desconhecida									0.016	-4.36
M386T490	Positivo	386.2400	8.1743	Desconhecida					0.0041	2.80				
M391T491	Positivo	391.2004	8.1771	Ácido graxo	0.0011	3.55			0.0021	4.51				
M392T491	Positivo	392.2028	8.1794	Desconhecida	0.0136	2.10			0.0056	3.19				
M399T668	Positivo	399.3416	11.1400	Desconhecida			0.0170	-3.44						
M407T491	Positivo	407.1722	8.1854	Desconhecida					0.0077	2.64				
M433T170	Positivo	433.1356	2.8279	Desconhecida			0.0300	-2.03						
M455T672	Positivo	455.2789	11.1933	Desconhecida	0.0454	-2.89								
M468T574	Positivo	468.2925	9.5745	Desconhecida									0.0416	-2.09
M475T686	Positivo	474.7359	11.4363	Desconhecida									0.0175	-2.35
M488T1028_2	Positivo	488.3776	17.1378	Desconhecida							0.0386	-5.75		
M494T612	Positivo	494.3074	10.2018	Desconhecida									0.0345	-2.44
M496T685	Positivo	496.3233	11.4232	Desconhecida							0.0104	3.24	0.0070	-3.55
M508T753	Positivo	508.3526	12.5440	Desconhecida	0.0037	-2.27								
M510T844	Positivo	510.3686	14.0723	Desconhecida	0.0058	-2.24								
M511T845	Positivo	511.3626	14.0850	Desconhecida	0.0014	-3.43	0.0060	4.98			0.0025	7.71	0.0025	-8.41
M520T651	Positivo	520.3204	10.8478	Desconhecida							0.0322	2.82	0.0009	-3.41
M521T655	Positivo	521.3246	10.9117	Desconhecida									0.0061	-2.16
M523T720	Positivo	523.3387	12.0064	Desconhecida									0.0155	-2.23
M530T684	Negativo	530.3218	11.3960	Desconhecida							0.0221	2.60		
M556T717	Negativo	556.3373	11.9475	Desconhecida							0.0079	2.85	0.0106	-3.01
M558T800	Negativo	558.3536	13.3341	Desconhecida							0.0113	2.02		
M566T717	Negativo	566.3662	11.9554	Desconhecida									0.0218	-2.34
M568T801	Negativo	568.3804	13.3502	Desconhecida							0.0239	2.06		
M583T923	Negativo	583.3472	15.3888	Desconhecida					0.0160	3.30				

M585T895	Positivo	585.3124	14.9227	Desconhecida			0.0160	5.88		
M585T920	Negativo	585.3650	15.3391	Desconhecida	0.0246	3.92				
M588T927	Positivo	588.3426	15.4426	Desconhecida	0.0478	2.09				
M599T786	Positivo	599.3003	13.1031	Desconhecida			0.0302	3.37		
M602T896	Positivo	602.3193	14.9392	Desconhecida			0.0274	2.31		
M603T895	Positivo	603.3226	14.9210	Desconhecida			0.0437	2.66		
M604T926	Positivo	604.3643	15.4328	Desconhecida	0.0264	3.30				
M605T926	Positivo	605.3654	15.4359	Desconhecida	0.0269	2.86				
M606T927	Positivo	606.3660	15.4435	Desconhecida	0.0463	2.10				
M609T927	Positivo	609.3226	15.4425	Desconhecida	0.0288	3.41				
M610T926	Positivo	610.3244	15.4288	Desconhecida	0.0472	4.08				
M621T711	Positivo	621.2820	11.8440	Desconhecida					0.0457	-2.77
M621T920	Negativo	621.3431	15.3391	Desconhecida	0.0302	3.27				
M622T711	Positivo	622.2863	11.8440	Desconhecida					0.0383	-2.40
M623T761	Positivo	623.3002	12.6875	Desconhecida			0.0160	4.23		
M624T895	Positivo	624.3030	14.9227	Desconhecida			0.0160	5.66		
M625T926	Positivo	625.2959	15.4410	Desconhecida	0.0366	4.25				

A comparação KRAS x FGFR1 não apresentou nenhum *molecular feature* significativo. FC: *foldchange*; mz: relação massa carga; rt: tempo de retenção