

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular

Filipe Fideles Duarte Andrade

**INVESTIGAÇÃO DOS ASPECTOS MOLECULARES DO FIBROMA
CEMENTO-OSSIFICANTE POR TECNOLOGIAS ÔMICAS: análises
genômicas e proteômicas**

Belo Horizonte

2022

Filipe Fideles Duarte Andrade

**INVESTIGAÇÃO DOS ASPECTOS MOLECULARES DO FIBROMA
CEMENTO-OSSIFICANTE POR TECNOLOGIAS ÔMICAS: análises
genômicas e proteômicas**

Versão final

Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Co-orientadoras: Profa. Dra. Carolina
Cavaliéri Gomes

Dra. Thais dos Santos Fontes Pereira

Belo Horizonte

2022

A554i Andrade, Filipe Fideles Duarte.
Investigação dos aspectos moleculares do fibroma cemento-ossificante por tecnologias ômicas [manuscrito]: análises genômicas e proteômicas. / Filipe Fideles Duarte Andrade. -- Belo Horizonte: 2022.
109 f.: il.
Orientador(a): Ricardo Santiago Gomez.
Coorientador(a): Carolina Cavaliéri Gomes; Thais dos Santos Fontes Pereira.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Cementoma. 2. Fibroma Ossificante. 3. Sequenciamento Completo do Exoma. 4. Genômica. 5. Proteômica. 6. Displasia Fibrosa Óssea. 7. Dissertação Acadêmica. I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Gomes, Carolina Cavaliéri. III. Pereira, Thais dos Santos Fontes. IV. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. V. Título.

NLM: QU 465



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

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVALIAÇÃO DOS ASPECTOS MOLECULARES DO FIBROMA CEMENTO-OSSIFICANTE UTILIZANDO TECNOLOGIAS ÔMICAS

FILIPE FIDELES DUARTE ANDRADE

Tese de Doutorado defendida e aprovada, no dia dezessete de janeiro de dois mil vinte e dois, 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

Thaís dos Santos Fontes Pereira - Coorientadora
Prática privada

Carolina Cavalléri Gomes - Coorientadora
UFMG

Vanessa de Fátima Bernardes
UFMG

Sílvia Ferreira de Sousa
UFMG

Sara Ferreira dos Santos Costa
UNIFAL/MG

Fabício Tinóco Alvim de Souza
Centro Universitário UNA

Belo Horizonte, 17 de janeiro de 2022.



Documento assinado eletronicamente por Sara Ferreira dos Santos Costa, Usuário Externo, em 17/01/2022, às 14:14, 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 Sílvia Ferreira de Sousa, Professora do Magistério Superior, em 17/01/2022, às 14:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Carolina Cavalléri Gomes, Professora do Magistério Superior, em 17/01/2022, às 14:25, 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, Coordenador(a), em 17/01/2022, às 15:05, 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 Thaís dos Santos Fontes Pereira, Usuária Externa, em 17/01/2022, às 16:39, 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 Vanessa de Fátima Bernardes, Professora do Magistério Superior, em 21/01/2022, às 11:40, 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 Fabício Tinóco Alvim de Souza, Usuário Externo, em 01/02/2022, às 21:03, 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_orcao_orcao_externo=0 informando o código verificador 1166267 e o código CRC SEESASE4.

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, em especial aos meus avós, que são o meu porto seguro e sempre estiveram ao meu lado, dando apoio e incentivo. Além disso, sou muito grato por serem seres humanos exemplares. Vocês são fonte de inspiração!

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez e às minhas co-orientadoras Dra. Thaís dos Santos Fontes Pereira e a Prof^a Dra. Carolina Cavaliéri Gomes, por toda a dedicação, incontáveis contribuições e incentivo.

Ao LNBIO/CNPEM, *McGill University*, *University of Southern Denmark*, representados pelas figuras da Prof^a Dra. Adriana Franco Paes Leme, MSc Romênia Ramos Domingues, Prof^a Dra. Nada Jabado, Prof. Dr. Martin Røssel Larsen e Dra. Marcella Nunes Melo Braga, por toda a parceria que foi essencial para realização desse projeto. Além disso, agradeço a todos os pesquisadores e laboratórios da UFMG que estiveram envolvidos em diversas etapas deste estudo por todas as sugestões e parceria, dentre os quais destacam-se a Prof^a. Dra. Marina Gonçalves Diniz e Dra. Sara Ferreiras dos Santos Costa e o Laboratório de Proteômica do Instituto de Ciências Biológicas.

Aos membros da banca de qualificação de doutorado, Prof^a Dra. Carolina Cavaliéri Gomes, Prof Dr. Felipe Paiva Fonseca e Prof^a Dra. Vanessa Bernardes Milagres por todas as contribuições extremamente valiosas concedidas a esse trabalho.

À minha amiga, Jéssica Vitório, por nossa grande amizade. Você tornou os meus anos de pós-graduação mais tranquilos.

Aos meus colegas da Patologia Molecular, pela parceria e a boa convivência ao longo desse período.

Ao Prof. Dr. Luiz Armando de Marco e ao Programa de Medicina Molecular da UFMG, por toda assistência ao longo do doutoramento.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), que financiou parcialmente a minha bolsa de estudos e parte do projeto. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Além disso, agradeço também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) por também ter financiado a execução do projeto.

**“No man can reveal to you aught but that which already lies half asleep in
the dawning of your knowledge.”**

(The Prophet/ Kahlil Gibran)

RESUMO

O fibroma cemento-ossificante (FCO) é uma neoplasia benigna dos ossos do esqueleto maxilofacial, cujo potencial para crescimento contínuo pode acarretar prejuízos estéticos e/ou funcionais nos indivíduos afetados. Pouco ainda é entendido sobre os fatores envolvidos no seu desenvolvimento e progressão, impactando no estabelecimento de uma classificação clara, na identificação de marcadores auxiliares ao diagnóstico diferencial e no desenvolvimento de tratamentos menos agressivos. Desse modo, o presente estudo buscou identificar as alterações genéticas associadas à patogênese do FCO por meio de sequenciamento completo de exoma. Esta investigação teve também por objetivo avaliar se ocorrem diferenças na sinalização molecular entre FCO e a displasia fibrosa (DF) por análises proteômica e fosfoproteômica. Além disso, verificamos se a via MAPK participa da patogênese do FCO mediante análise imuno-histoquímica de fosfo-ERK1/2. No que diz respeito aos seus aspectos genéticos, os resultados do presente estudo sugerem que alterações genéticas pontuais tem um baixo impacto na patogênese do FCO, possivelmente representando alterações secundárias a eventos moleculares estruturais. A maioria das lesões apresentou intensa imunomarcagem de fosfoERK1/2 sugerindo que a ativação da via MAPK apresenta um importante papel no desenvolvimento do FCO. Diferenças significativas foram observadas nos níveis de 51 proteínas, do sítio fosforilado ser61 da proteína YAP1 e na regulação de diversas vias biológicas, como aquelas relacionadas à função e organização da matriz extracelular e atividades plaquetária e eritrocitária. Em conclusão, o desequilíbrio entre diferenciação e crescimento celular no FCO é desencadeado por alterações nos níveis de diversas proteínas, como S100A4, S100A6, dermatopontina, assim como alterações na dinâmica do citoesqueleto e ativação de diferentes cascatas de sinalização, incluindo a via MAPK/ERK. Os achados também sugerem que, mesmo diante de uma intensa similaridade fenotípica entre FCO e a DF, existem numerosas diferenças na regulação dos processos envolvidos em sua patogênese.

Palavras-chave: fibroma cemento-ossificante; lesões fibro-ósseas; sequenciamento completo de exoma; proteômica; displasia fibrosa.

ABSTRACT

Cemento-ossifying fibroma (COF) is a benign neoplasm of the maxillofacial bones, which presents potential for continuous growth that can lead to aesthetic and/or functional impairment in affected individuals. Little is still understood about the factors involved in its development and progression, impacting the establishment of a clear classification, the identification of auxiliary biomarkers for its differential diagnosis and the development of less aggressive treatments. Thus, the present study sought to identify the genetic alterations associated with the pathogenesis of COF through whole exome sequencing. This investigation also aimed to assess whether there are differences in molecular signaling between COF and fibrous dysplasia (FD) by proteomic and phosphoproteomic analyses. Furthermore, we verified whether the MAPK pathway participates in the pathogenesis of COF by immunohistochemical analysis of phospho-ERK1/2. Regarding its genetic aspects, the results of the present study suggest that point mutations might have a low impact on the pathogenesis of COF, possibly representing alterations secondary to structural molecular events. Most lesions showed intense immunostaining of phosphoERK1/2, suggesting that the activation of the MAPK pathway plays an important role in the development of COF. Significant differences were observed in the levels of 51 proteins, the levels of YAP1 ser61 phosphorylation and in the regulation of several biological pathways, such as those related to the function and organization of the extracellular matrix and platelet and erythrocyte activities. In conclusion, the imbalance between differentiation and cell growth in COF is triggered by changes in the levels of several proteins, such as S100A4, S100A6, dermatopontin, as well as changes in cytoskeletal dynamics and activation of different signaling cascades, including the MAPK/ERK pathway. The findings also suggest that in spite of intense phenotypic similarity between COF and FD, there are numerous differences in the regulation of the processes involved in their pathogenesis.

Keywords: cemento-ossifying fibroma, fibro-osseous lesions, whole exome sequencing, proteomics; fibrous dysplasia.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Aspectos histopatológicos do fibroma cemento-ossificante.....	21
Figura 2.	Características radiográficas, clínicas e transoperatórias do fibroma cemento-ossificante.....	22
Figura 3.	Representação esquemática das aplicações das principais abordagens ômicas.....	34
Quadro 1.	Quadro 1. Dados clínicos dos indivíduos acometidos por fibroma cemento ossificante incluídos no estudo e as respectivas análises moleculares realizadas utilizando cada amostra.....	46
Figura 4.	Distribuição dos tipos de variantes potencialmente somáticas que foram identificadas no sequenciamento completo das amostras de fibroma cemento-ossificante.....	47
Figura 5.	Resumo das estratégias utilizadas na avaliação dos resultados do sequenciamento completo do exoma para identificação de variantes possivelmente relevantes à patogênese do fibroma cemento-ossificante.....	48
Quadro 2.	Vias biológicas contidas no KEGG que foram utilizadas para seleção de potenciais <i>drivers</i> da patogênese do fibroma cemento-ossificante.....	49
Figura 6.	Alterações em componentes da via de sinalização MAP quinase podem ser responsáveis por parte das lesões de fibroma cemento-ossificante.....	54
Quadro 3.	Análise do perfil de expressão de fosfoERK1/2 em amostras de fibroma cemento-ossificante por imunohistoquímica.....	54
Quadro 4.	Dados clínicos dos pacientes incluídos na análise do fosfoproteoma e proteoma total.....	55
Figura 7.	Avaliação preliminar da qualidade dos extratos proteicos após a digestão utilizando tripsina e dessalinização com cartuchos <i>Sep-Pack C18</i>	56

Figura 8.	Avaliação preliminar da marcação do pool de amostras de displasia fibrosa e fibroma cemento-ossificante com as <i>tags</i> 127C, 128N, 128C, 129N, 129C e 130N do kit <i>TMT10plex</i>	57
Figura 9.	Análise de ontologia gênica (GO) realizada no módulo <i>Slim</i> do <i>Panther</i> com as proteínas identificadas no proteoma total após o pré-processamento dos dados.....	59
Figura 10.	<i>Heatmap</i> obtido utilizando as intensidades normalizadas de todas as proteínas mantidas após o pré-processamento dos dados.....	61
Figura 11.	<i>Heatmap</i> construído com as proteínas com níveis significativamente alterados entre o fibroma cemento-ossificante e a displasia fibrosa.....	62
Figura 12.	Análise de enriquecimento de vias revela vias biológicas potencialmente elevadas na displasia fibrosa em comparação ao fibroma cemento-ossificante.....	64
Figura 13.	Avaliação para verificar se potenciais alterações genômicas do fibroma cemento-ossificante são refletidas no seu perfil proteômico.....	67
Figura 14.	<i>Heatmap</i> demonstrando alterações consistentes no nível de fosforilação de diferentes proteínas entre os grupos, mas que não apresentaram significância estatística.....	68
Figura 15.	Proposta de sinalização molecular envolvida na patogênese do fibroma cemento-ossificante com base nos resultados das análises proteômicas e imunohistoquímica.....	74
Figura 16.	Proposição de mecanismos moleculares potencialmente envolvidos na patogênese da displasia fibrosa, tendo como base os achados dos ensaios proteômicos e fosfoproteômicos.....	77

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1.	Variantes potencialmente envolvidas na patogênese do fibroma cemento-ossificante.....	52
Tabela 2.	Frequência alélica das variantes nas amostras em que foram detectadas.....	53
Tabela 3.	Proteínas identificadas que apresentaram níveis significativamente alterados entre fibroma cemento-ossificante e displasia fibrosa.....	65
Tabela 4	Lista das dez vias mais significativamente enriquecidas utilizando as proteínas mais abundantes na displasia fibrosa.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMBIC	Tampão de bicarbonato de amônio
cm	Centímetro
CNA	Alteração de número de cópias/ <i>Copy number alteration</i>
COSMIC	Catálogo de Mutações Somáticas no Câncer/ <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i> (Base de dados)
Da	Dalton
DDA	Aquisição dependente de dados
DF	Displasia fibrosa
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	Dititreitol
ECM	Matriz extracelular
FCO	Fibroma cemento-ossificante
FDR	Taxa de falsa descoberta / <i>false discovery rate</i>
FWHM	Largura à meia altura / <i>full width at half maximum</i>
GO	Ontologia gênica / <i>Gene ontology</i>
HCF	Linhagem celular de fibroma cemento-ossificante humano
HCD	Dissociação induzida por colisão de alta energia
HPLC	Cromatógrafo líquido de alta performance
HPT-JT	Síndrome do hiperparatireoidismo-tumores maxilares
IHC	Imuno-histoquímica
LC/MS/MS	Cromatógrafo líquido acoplado a espectrômetro de massas em tandem
Log₂	Logaritmo na base 2
MAF	Frequência do alelo menor/ <i>Minor allele frequency</i>
MALDI-ToF/ToF	Espectrometria de massa por desorção-ionização de laser em matriz – tempo de voo / <i>Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry</i>
m/z	Razão massa/carga
mg	Miligrama
miRNA	MicroRNA
mL	Militro
mM	Milimolar

mRNA	RNA mensageiro
MS	Espectrômetro de massas
MS/MS	Espectrometria de massas em tandem
ms	Milissegundos
nL	Nanolitros
nm	Nanômetro
OMIM	Banco de dados de informações doenças de herança mendeliana
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCA	Análise de componentes principais / <i>Principal component Analysis</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
ppm	Partes por milhão
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa
qPCR	PCR quantitativo
RNA	Ácido ribonucleico
Ser	Serina
SNV	Variante de nucleotídeo único/ <i>Single nucleotide variant</i>
TALE	Termo de assentimento livre e esclarecido
TCGA	O Atlas do Genoma do Câncer/ <i>The Cancer Genome Atlas</i> (Base de dados)
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TEAB	Tampão de bicarbonato de trietilamônio
Thr	Treonina
TiO₂	Dióxido de titânio
TMT	Tag de massa em tandem/ <i>Tandem Mass Tag</i>
UTR	Região não traduzida/ <i>Untranslated region</i>
v/v	Volume/volume
µL	Microlitro
µg	Micrograma
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Fibroma cemento-ossificante (FCO).....	20
2.1.1 Aspectos clínicos, histopatológicos e radiográficos.....	20
2.1.2 Diagnóstico diferencial.....	23
2.1.3 Associação do FCO a outras doenças.....	24
2.1.4 Aspectos moleculares do FCO.....	25
2.1.4.1 Aspectos genéticos.....	25
2.1.4.2 A contribuição das análises histológicas e imuno-histoquímicas para o entendimento da patogênese do FCO.....	29
2.1.4.3 Modelos de estudo in vivo e in vitro de FCO.....	29
2.1.4.4 Ponderação acerca do conhecimento molecular do FCO.....	31
2.2 Análises ômicas.....	31
2.2.1 Genômica.....	31
2.2.1.1 Sequenciamento Completo de Exoma.....	32
2.2.2 Proteômica.....	33
3 JUSTIFICATIVA.....	35
4 OBJETIVOS.....	36
4.1 Objetivo geral.....	36
4.2 Objetivos específicos.....	36
5 MÉTODOS.....	37
5.1 Amostras e pacientes.....	37
5.2 Sequenciamento completo do exoma.....	37
5.3 Análises quantitativas do fosfoproteoma e proteoma total de FCO e DF.....	39
5.3.1 Preparo das amostras do proteoma total e fosfoproteoma.....	39

5.3.2 Pré-fracionamento das amostras do proteoma total.....	40
5.3.3 Aquisição dos dados na plataforma LC/MS/MS.....	41
5.3.3.1 Aquisição dos dados do proteoma total.....	42
5.3.3.2 Aquisição dos dados do fosfoproteoma.....	42
5.3.4 Pré-processamento dos dados.....	42
5.3.5 Análises estatísticas e interpretação biológica dos dados.....	43
5.4 Análises imuno-histoquímicas para avaliação do fosfo-Erk1/2 no FCO.....	43
6 RESULTADOS.....	45
6.1 Dados clínicos dos pacientes.....	45
6.2 Busca pela assinatura genética do FCO.....	46
6.2.1 Avaliação preliminar dos resultados do sequenciamento completo do exoma.....	46
6.2.2 Identificação de potenciais drivers envolvidos na patogênese do FCO.....	47
6.2.3. Avaliação da ocorrência de mutações no FCO de genes envolvidos na patogênese de síndromes neurocutâneas.....	50
6.2.4 Verificação da presença de alterações previamente descritas no FCO.....	50
6.2.5 Sequenciamento completo do exoma sugere potencial assinatura molecular do FCO.....	51
6.3 Avaliação da ativação da via MAPK no FCO por imuno-histoquímica.....	53
6.4 Análises proteômicas no estudo da fisiopatologia do FCO.....	55
6.4.1 Análises proteômica e fosfoproteômica quantitativas.....	55
6.4.1.1 Avaliação preliminar da qualidade dos experimentos de proteômica e fosfoproteômica quantitativas.....	55
6.4.1.2 Visão geral dos resultados proteômicos após o pré-processamento dos dados.....	57

6.4.1.3 FCO e DF apresentam diferenças nos níveis de diversas proteínas e na regulação de vias biológicas.....	60
6.4.1.4 Verificação se as alterações genômicas do FCO são refletidas no seu perfil proteômico.....	66
6.4.1.5 FCO apresenta níveis maiores da fosforilação do sítio ser61 da proteína YAP1.....	67
7 DISCUSSÃO.....	68
8. CONCLUSÕES.....	78
9. PERSPECTIVAS.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	80
APÊNDICES.....	98
Apêndice 1 - Imagem representativa da análise da expressão imunohistoquímica de fosfo-Erk1/2 (fosfo-p42/44) em granuloma piogênico, que foi utilizado como controle positivo de marcação pelos anticorpos empregados no presente estudo.....	98
Apêndice 2 - Imagens histopatológicas representativas dos casos de FCO empregados no estudo.....	99
Apêndice 3 - Lista dos genes envolvidos na patogênese de síndromes neurocutâneas.....	100
Apêndice 4 - Coletânea de informações relativas às implicações dos genes e as suas respectivas variantes que foram detectados como potencialmente envolvidos na patogênese do FCO.....	101
Apêndice 5 - Lista das vias significativamente enriquecidas utilizando as proteínas mais abundantes na displasia fibrosa.....	102
Apêndice 6 – Lista dos processos significativamente enriquecidos utilizando as proteínas aumentadas no fibroma cemento ossificante e na displasia fibrosa.....	103
Apêndice 7 - Avaliação realizada com o intuito de avaliar se as alterações descritas ao nível genômico no FCO são refletidas em seu perfil proteômico.....	105
Apêndice 8 – Análises multivariadas demonstram que o perfil fosfoproteômico de FCO e DF são similares.....	106

ANEXOS.....	107
Anexo 1 – Pareceres Consubstanciados do CEP.....	107

1 INTRODUÇÃO

O fibroma cemento-ossificante (FCO) é um tumor intraósseo benigno e é uma das principais lesões fibro-ósseas do esqueleto craniofacial (NELSON; PHILLIPS, 2019). Esta doença tem predileção por indivíduos do sexo feminino com idades entre 20 a 40 anos e é caracterizada por um crescimento intraósseo anormal e progressivo de tecido fibroso contendo quantidade variável de materiais mineralizados KHAN *et al.*, 2011). Apesar da lesão normalmente não ser acompanhada por sintomas, a qualidade de vida dos pacientes pode ser impactada pela ocorrência de alterações na estética facial e/ou comprometimento funcional em alguns casos (SU; WEATHERS; WALDRON, 1997a; ABRAMOVITCH; RICE, 2016). O tratamento do FCO consiste na aplicação de métodos cirúrgicos para promover sua completa remoção, devendo o paciente ser acompanhado clinicamente em longo prazo após o procedimento, visto que há relatos de recorrência (CHANG *et al.*, 2008; GONDIVKAR *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2011).

Apesar de diversos estudos terem tentado esclarecer os aspectos moleculares do FCO, a patogênese dessa lesão ainda permanece desconhecida (DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2020). Ao longo dos últimos anos, foram sugeridas tanto alterações genéticas (PIMENTA *et al.*, 2006; DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013; DINIZ *et al.*, 2011; MASI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016; MA *et al.*, 2021) quanto na sinalização de microRNAs (PEREIRA *et al.*, 2018b), níveis de proteínas e RNAs mensageiros (ZHANG *et al.*, 2010; HATANO *et al.*, 2011; PEREIRA *et al.*, 2018a), ressaltando que alterações em componentes de vias de sinalização como WNT/ β -catenina e Notch, comprometem a biogênese óssea e contribuem para o desenvolvimento do FCO (ZHANG *et al.*, 2010; PEREIRA *et al.*, 2018a). Entretanto, a maioria das análises carece de avaliações funcionais e/ou validação em grandes coortes (DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2020).

O conhecimento limitado acerca dos seus possíveis precursores celulares e aspectos moleculares, incluindo a sua assinatura genética, vêm causando muitas controvérsias em relação a sua classificação, além de dificultar a acurácia do diagnóstico diferencial dessa lesão e o desenvolvimento de métodos terapêuticos que sejam menos agressivos (TOYOSAWA *et al.*, 2007; BAUMHOER *et al.*, 2021; DESAI *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2021). Nesse contexto, o presente estudo visa identificar as alterações possivelmente envolvidas no

surgimento e manutenção dessa doença, assim como apontar potenciais marcadores de diagnóstico.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Fibroma cemento-ossificante (FCO)

2.1.1. Aspectos clínicos, histopatológicos e radiográficos

Controvérsias acerca da classificação e também da nomenclatura deste tumor têm existido desde a sua primeira descrição (GONDIVKAR *et al.*, 2011; EL-MOFTY, 2014; SPEIGHT; TAKATA, 2018). Entre as denominações já utilizadas para descrever essa doença, podem-se citar: fibroma ossificante, fibroma cementificante e, atualmente, é designado fibroma cemento-ossificante (CHANG *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2011). A atual denominação, FCO, recentemente adotada, denota a origem a partir de uma estrutura do aparato odontogênico, o ligamento periodontal e, portanto, limita sua ocorrência aos ossos maxilofaciais (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; WRIGHT; VERED, 2017; SPEIGHT; TAKATA, 2018). Na edição mais recente da “Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial de Saúde: tumores odontogênicos e dos ossos maxilofaciais” publicada no ano de 2017, o FCO foi classificado como um tumor odontogênico mesenquimal benigno (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Contudo, a apresentação e discussão desse tumor nesse documento são realizadas em conjunto às lesões fibro-ósseas, doenças com as quais apresenta diversas similaridades fenotípicas (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; WRIGHT; VERED, 2017). Entretanto, as divergências de patologistas e pesquisadores acerca dessa categorização ainda promovem constantes debates (BAUMHOER *et al.*, 2021; DESAI *et al.*, 2021). Uma melhor compreensão das bases moleculares dessa lesão pode contribuir com a identificação dos seus precursores celulares e a sua assinatura genética, por consequência, facilitando o estabelecimento de uma classificação definitiva.

Na maior parte dos casos, o FCO se manifesta como lesão única (WANG *et al.*, 2014). Contudo, lesões afetando múltiplos sítios podem ser observadas, sendo associadas ou não à síndrome do hiperparatireoidismo-tumores maxilares (HPT-JT) (WANG *et al.*, 2014; EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Os sítios de preferência do tumor são as regiões posteriores da mandíbula e as áreas que as circundam (BRANNON; FOWLER, 2001; EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Em contrapartida, casos afetando a maxila são menos frequentes (TRIJOLET *et al.*, 2011; ZEGALIE; SPEIGHT; MARTIN, 2015). Essa limitação

dos locais de acometimento vem causado debates, tendo em vista a documentação de lesões fenotipicamente similares em outros ossos do esqueleto craniofacial (BAUMHOER *et al.*, 2021).

A avaliação histopatológica do FCO revela a presença de um componente fibroso contendo fibras colágenas densas, quantidade baixa a moderada de vasos sanguíneos, além de estruturas mineralizadas (**Figura 1**) (SU; WEATHERS; WALDRON, 1997a; BRANNON; FOWLER, 2001; EL-MOFTY, 2014). Os fibroblastos neste tumor demonstram aspecto morfológico semelhante a um fuso (fusiforme) e eventualmente se arranjam em um padrão estoriforme (BRANNON; FOWLER, 2001; ZEGALIE; SPEIGHT; MARTIN, 2015). No que diz respeito à composição dos materiais mineralizados, a maioria dos tumores apresenta tanto trabéculas de osso, quanto depósitos de materiais cementoides (SU; WEATHERS; WALDRON, 1997a), sendo a proporção de cada tipo e o grau de mineralização variáveis entre as lesões (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Além disso, é possível observar, em muitos casos, osteoblastos circundando as trabéculas (SU; WEATHERS; WALDRON, 1997a; BRANNON; FOWLER, 2001). Além disso, uma cápsula fibrosa pode ser vista envolvendo algumas lesões (SU; WEATHERS; WALDRON, 1997a; EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

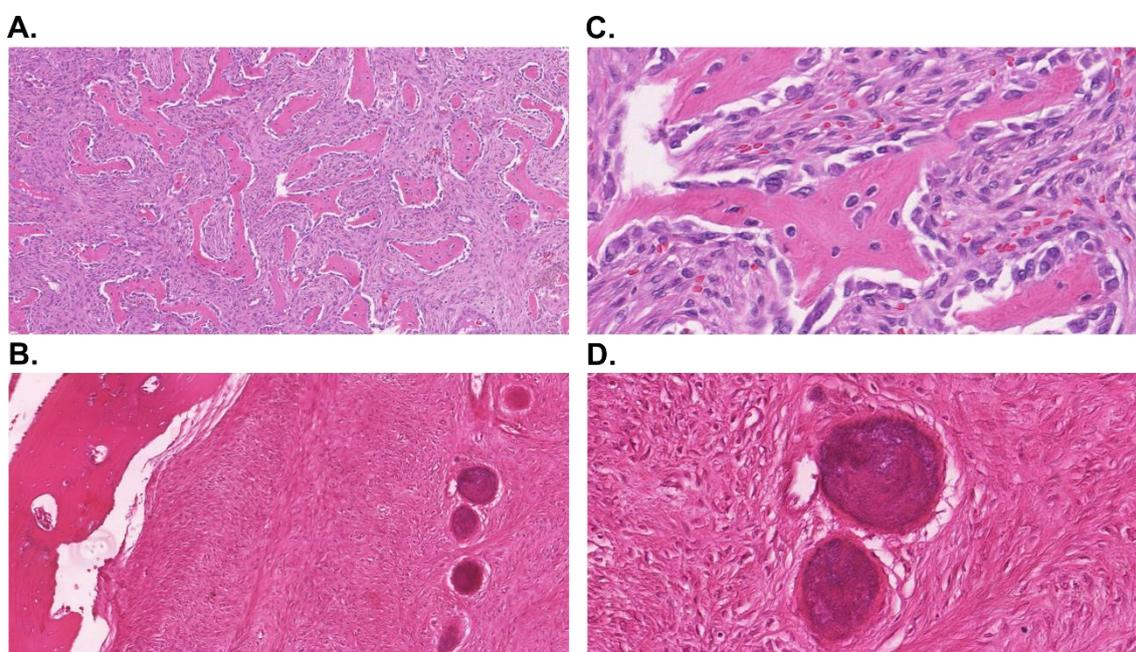


Figura 1. Aspectos histopatológicos do fibroma cimento ossificante. **A.** Imagem representativa de uma lesão composta predominantemente por trabéculas de osteoide, circundadas por osteoblastos em um estroma fibroso hiper celular **B.** Histopatologia representativa de uma lesão com predomínio de estruturas calcificadas que se assemelham a

cementículos. Uma separação clara entre o tumor (direita) e o osso normal (esquerda) é observada. Ambas as lâminas histopatológicas foram coradas com hematoxilina e eosina. As imagens apresentadas em **A** e **B** foram obtidas aplicando uma magnificação de 10x. **C**, **D**. Áreas representativas de cada tumor foram magnificadas para permitir melhor visualização das suas estruturas, respectivamente (aumento de 40x).

Os exames imagiológicos dessa neoplasia revelam uma delimitação das bordas lesionais (**Figura 2**) (SU; WEATHERS; WALDRON, 1997b; BRANNON; FOWLER, 2001). O tempo de evolução pode influenciar na característica do tumor nas análises de imagens, nas quais tanto variações no tamanho e opacidade podem ser percebidas (BRANNON; FOWLER, 2001; KHAN *et al.*, 2011; TITINCHI; MORTEL, 2016). Nos primeiros estágios de desenvolvimento das lesões, o seu aspecto tende a ser predominantemente radiolúcido, sendo o seu amadurecimento acompanhado por aumento dos níveis de mineralização e, por consequência, gradualmente tornam-se mistas e, em raras situações, radiopacas (KHAN *et al.*, 2011; TITINCHI; MORTEL, 2016).

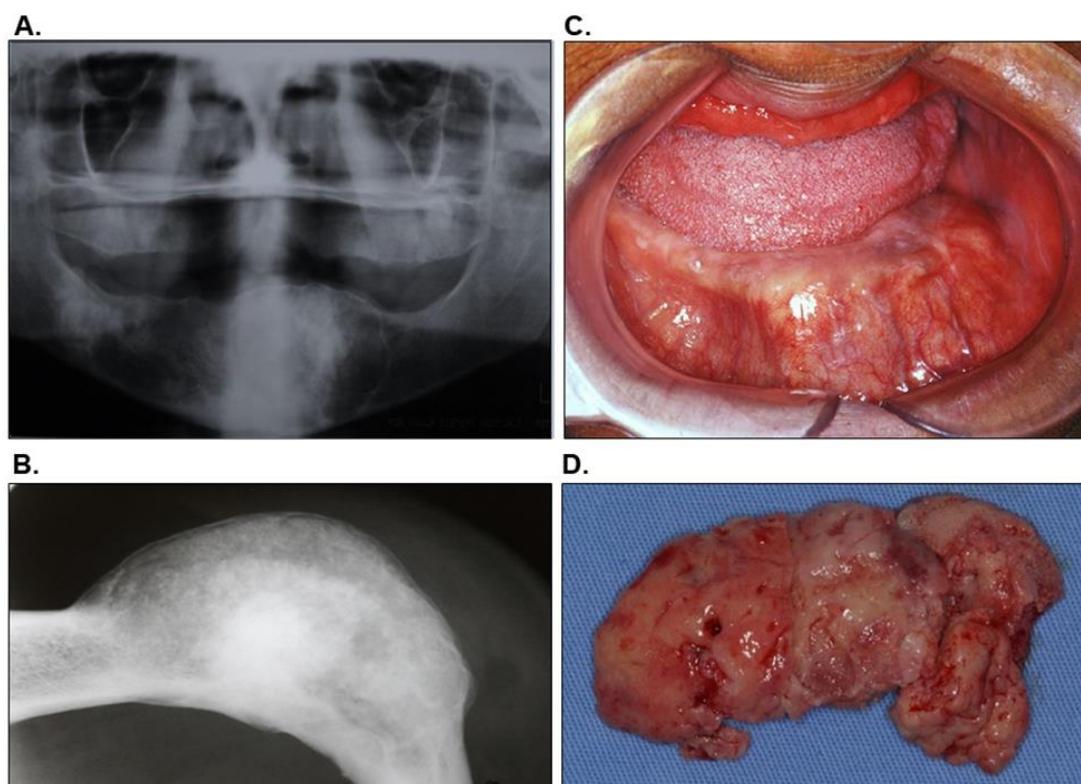


Figura 2. Características radiográficas, clínicas e transoperatórias do fibroma cemento ossificante. A. Imagem de radiografia panorâmica de uma lesão mandibular unilocular, mista (porções radiopacas e radiolúcidas), com bordas bem definidas. **B.** Radiografia oclusal mandibular mostrando expansão da cortical vestibular. **C.** Exame intrabucal demonstrando um

aumento de volume na região anterior do rebordo alveolar inferior. **D.** Peça cirúrgica obtida como uma lesão única durante a excisão cirúrgica. **Fonte:** imagens gentilmente cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo S. Gomez.

Diante do aspecto progressivo da lesão, que em muitas ocasiões pode ocasionar distúrbios estéticos e funcionais, os tratamentos de escolha visam a remoção cirúrgica completa do FCO (GONDIVKAR *et al.*, 2011; EL-MOFTY, 2014). Entre as estratégias mais comumente aplicadas, incluem-se a curetagem e enucleação, de modo que as modalidades cirúrgicas mais agressivas são usualmente reservadas para lesões de grandes dimensões (EVERSOLE; LEIDER; NELSON, 1985; GONDIVKAR *et al.*, 2011; KIM *et al.*, 2012; ZEGALIE; SPEIGHT; MARTIN, 2015). O acompanhamento do paciente deve ser mantido após a cirurgia, visto que na literatura são descritas taxas de recorrência variáveis (EVERSOLE; LEIDER; NELSON, 1985; CHANG *et al.*, 2008; GONDIVKAR *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2011). Até o presente momento, ao nosso conhecimento, a maior taxa de recorrência reportada é de 28% em uma série de casos cuja estratégia primária de tratamento era a curetagem (EVERSOLE; LEIDER; NELSON, 1985).

2.1.2 Diagnóstico diferencial

O FCO é uma lesão fibro-óssea benigna do esqueleto craniofacial, que consiste em um conjunto de doenças distintas, mas que apresentam semelhanças em diversos aspectos na análise histopatológica, apesar de variarem em relação a sua evolução e necessitarem de diferentes estratégias de manejo clínico (BRANNON; FOWLER, 2001; NELSON; PHILLIPS, 2019). Diante disso, as lesões classificadas nesse grupo são consideradas diagnósticos diferenciais do FCO, sendo incluídas nessa categoria, a displasia cemento-óssea, displasia fibrosa (DF) e cementoma familiar gigantiforme (EL-MOFTY, 2014; NELSON; PHILLIPS, 2019). Além disso, outras doenças também podem apresentar semelhanças clínicas e/ou em análises de imagem e devem ser consideradas. Essas lesões podem ser de natureza odontogênica, reativa, dentre outras, como por exemplo, fibroma odontogênico, granuloma periapical, cisto odontogênico calcificante, tumor odontogênico adenomatoide, lesão central de células gigantes (granuloma central de células gigantes), odontoma,

ameloblastoma, tumor odontogênico epitelial calcificante e osteossarcoma (MINTZ; VELEZ, 2007; CHANG, *et al.*, 2008; KHAN *et al.*, 2011).

A displasia fibrosa (DF) é uma das lesões fibro-ósseas benignas mais comuns do esqueleto maxilofacial, representando uma das principais doenças a serem consideradas como diagnóstico diferencial do FCO (TRIJOLET *et al.*, 2011; NELSON; PHILLIPS, 2019). A DF é uma lesão caracterizada pelo crescimento intramedular de tecido fibro-ósseo que é capaz de acometer tanto os componentes do esqueleto axial e apendicular, podendo afetar apenas um osso isoladamente (forma monostótica) ou vários (forma polioestótica) (PEREIRA *et al.*, 2019; NELSON; PHILLIPS, 2019). Os indivíduos acometidos frequentemente são jovens, predominantemente crianças e adolescentes (EL-MOFTY, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019; NELSON; PHILLIPS, 2019). Diante da grande sobreposição de aspectos fenotípicos entre a DF e o FCO, patologistas e clínicos sugerem que o diagnóstico deve abranger os achados clínicos, imagiológicos, histopatológicos e cirúrgicos (GONDIVKAR *et al.*, 2011; NELSON; PHILLIPS, 2019; PEREIRA *et al.*, 2019). Entre as principais características diferenciais dessa lesão de desenvolvimento, pode-se elencar a ausência de bordas bem definidas, que se adentram ao osso adjacente (EL-MOFTY, 2014; PEREIRA *et al.*, 2019). Outros critérios histológicos e moleculares já foram propostos na diferenciação dessas doenças, mas a sua capacidade discriminatória pode ser afetada por fatores biológicos e analíticos (PEREIRA *et al.*, 2019). Desse modo, a identificação de novas alterações nos aspectos moleculares entre essas lesões é de suma importância para auxiliar no seu diagnóstico diferencial.

2.1.3 Associação do FCO a outras doenças

A maioria dos relatos envolvendo ocorrência simultânea desse tumor a uma doença está associada à síndrome do hiperparatireoidismo-tumores maxilares (HPT-JT). Apesar de diversos fatores influenciarem o estabelecimento de uma incidência precisa, como a baixa frequência da síndrome e a possibilidade de surgimento do FCO antes de outros sinais patognomônicos, é estimado que até 50% dos portadores de HPT-JT desenvolvam essa neoplasia (IBRAHEM, 2020).

Outras associações do FCO com síndromes são descritas na literatura, incluindo a síndrome óculo-cérebro-cutânea (também denominada síndrome de Delleman), neurofibromatose tipo 1, síndrome de Buschke-Ollendorff, lipomatose encéfalo-crânio-cutânea e complexo esclerose tuberosa (MACLAREN; KLUIJT; KOOLE, 1995; RUGGIERI *et al.*, 2009; DAWSON *et al.*, 2014; MAHOMED; RIKHOTSO, 2015; PINTO; DE SOUZA; DOS SANTOS, 2015; JENDI *et al.*, 2018). Além disso, existe um relato da ocorrência de FCO em um indivíduo previamente acometido com retinoblastoma bilateral (GOLLIN *et al.*, 1992). É digno de nota que alguns estudos que reportam as associações do FCO com síndromes não fornecem dados suficientes para verificação e confirmação do diagnóstico de FCO.

Mahomed e Rikhosoto (2015) ressaltaram que uma grande parte das doenças previamente reportadas em associação ao FCO são classificadas como síndromes neurocutâneas. Considerando que o FCO provavelmente surge a partir de células do ligamento periodontal e que essa estrutura deriva da crista neural, cujas anormalidades estão associadas ao surgimento dessas síndromes, os autores propõem que essa relação etiológica pode ser o elo envolvido na ocorrência simultânea dessas doenças (MAHOMED; RIKHOSOTO, 2015). Outras hipóteses para esses eventos podem ser sugeridas, como coincidência no surgimento, ou o compartilhamento de mecanismos moleculares (MAHOMED; RIKHOSOTO, 2015).

Ocorrência simultânea do FCO com doenças são descritas na literatura, incluindo diversas lesões odontogênicas (QURESHI *et al.*, 2021), lesão central de células gigantes (KIM *et al.*, 2012), dentre outras. Contudo novas investigações também são necessárias para esclarecer as razões dessas observações (QURESHI *et al.*, 2021).

2.1.4 Aspectos moleculares do FCO

2.1.4.1 Aspectos genéticos

Mutações ativadoras no gene *GNAS* são descritas tanto em casos de DF monostótica quanto poliestótica, sejam esporádicos ou associados à Síndrome de McCune-Albright (PEREIRA *et al.*, 2019). De maneira oposta, essas mutações não são encontradas no FCO, sendo que sua ausência foi confirmada por diversos estudos empregando diferentes metodologias e tamanhos de coorte

e que analisaram tanto lesões solitárias quanto lesões múltiplas (TOYOSAWA *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2013; TABAREAU-DELALANDE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). Desse modo, essas alterações representam um importante marcador molecular de DF (PEREIRA *et al.*, 2019). Contudo, devido a fatores biológicos e analíticos, níveis variados de detecção dessas variantes genéticas têm sido descritos na DF, dificultando a sua utilização como marcadores de diagnóstico diferencial (PEREIRA *et al.*, 2019).

Mutações patogênicas no gene *CDC73* (também conhecido como *HRPT2*), responsável por codificar a proteína parafibromina que desempenha importantes atividades no controle transcricional, são implicadas no desenvolvimento de HPT-JT (CARPTEN *et al.*, 2002; CHEN, YAN *et al.*, 2016). No FCO, já foram detectadas mutações somáticas nos éxons 1, 2, 13 e 14 desse gene em diferentes estudos, tanto em casos esporádicos quanto associados à síndrome HPT-JT (PIMENTA *et al.*, 2006; DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013; MASI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2016). Outras evidências sugerem também que, nesta lesão, a perda de heterozigiosidade no locus do *CDC73* é comumente observada (DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013). Contudo, uma série de fatores apontam que o papel dessas alterações possivelmente está restrito à progressão do FCO, sem estarem associadas ao desenvolvimento inicial dessa doença (DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013). Entre esses aspectos, pode-se citar a aparente ausência de transcritos aberrantes, níveis similares da parafibromina entre tumores com e sem mutações nesse gene e a baixa frequência dessas alterações em casos esporádicos (PIMENTA *et al.*, 2006; HATANO *et al.*, 2013; DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013; CHEN *et al.*, 2016). Recentemente, um estudo questionou essa hipótese por meio da demonstração de que, em alguns casos, a expressão da parafibromina é indetectável no núcleo das células, sendo esse evento observado concomitantemente com mutações no gene *CDC73* em parte das lesões (COSTA-GUDA *et al.*, 2021). Os autores desse trabalho argumentam que existe a possibilidade de que os achados distintos podem ser decorrentes de variações metodológicas e populacionais (COSTA-GUDA *et al.*, 2021). Além disso, eles propõem que mutações em sítios diferentes desse gene podem apresentar desfechos variados no que diz respeito a estabilidade do produto proteico e, por consequência, no seu reconhecimento por imunoenaios (COSTA-GUDA *et al.*, 2021). Em consistência com esta proposição, uma análise

do impacto de uma mutação no éxon 2 identificada em outro estudo, foram constatados níveis menores do produto do gene mutado (MASI *et al.*, 2014).

Transcritos anômalos do gene supressor de tumor *WWOX*, demonstrando ausência completa ou parcial de diferentes éxons, foram detectados em três casos distintos de FCO (DINIZ *et al.*, 2011). Entretanto, diferenças significativas na expressão dos transcritos normais desse gene não são observadas entre os casos que apresentam essas alterações em relação aos que não apresentam (DINIZ *et al.*, 2011).

Tendo em vista a importância da via de sinalização Wnt/ β -catenina para o desenvolvimento ósseo (HOUSCHYAR *et al.*, 2019), alguns estudos visaram verificar se alterações nesse processo biológico poderiam estar implicados na patogenia do FCO (HORVAI; JORDAN, 2014; PEREIRA *et al.*, 2018). Alterações pontuais possivelmente benignas foram identificadas nos éxons 3 do gene *CTNNB1*, que codifica a β -catenina, e 15 do gene *APC* em dois casos distintos desse tumor (HORVAI; JORDAN, 2014). Por outro lado, a avaliação de mutações *hotspot* em um painel de 50 oncogenes e genes supressores de tumor por sequenciamento de nova geração, incluindo diversos genes envolvidos nessa via de sinalização, não revelou alterações patogênicas, o que é sugestivo de que mutações pontuais em componentes dessa via não promovem o desenvolvimento do FCO (PEREIRA *et al.*, 2018a). Contudo, o acúmulo de β -catenina no núcleo das células desse tumor parece ocorrer em uma parcela de casos dessa lesão (HORVAI; JORDAN, 2014). Além disso, alterações na expressão dos transcritos de diversos genes da via Wnt/ β -catenina foram observadas no FCO em comparação a amostras de osso normal (PEREIRA *et al.*, 2018a). Em conjunto, esses achados apontam que essa via possivelmente desempenha algum papel na patogênese do FCO.

Outra via de sinalização que potencialmente está envolvida na patogênese do FCO é a via Notch. Níveis alterados dos transcritos e proteínas dos genes *NOTCH1*, *NOTCH3*, *JAG1* e *JAG2* foram observados nesse tumor em relação a amostras de osso saudável (ZHANG *et al.*, 2010). Esse processo biológico possivelmente favorece o desenvolvimento da doença por meio de efeitos inibitórios sobre a diferenciação dos osteoblastos (ZHANG *et al.*, 2010). Por outro lado, análise de um painel de mutação *hotspot* por sequenciamento de

nova geração não identificou nenhuma mutação no gene *NOTCH1* (PEREIRA et al., 2018a).

Outro estudo, também realizado por nosso grupo, buscou avaliar se alterações na expressão de microRNAs (miRNAs) afetam a expressão gênica do FCO (PEREIRA et al., 2018b). Entre os 754 miRNAs avaliados, onze mostraram-se diminuídos nesse tumor em comparação a amostras de osso saudável, incluindo hsa-miR-95-3p, hsa-miR-141-3p, hsa-miR-205-5p, hsa-miR-223-3p, hsa-miR-31-5p, hsa-miR-944, hsa-miR-200b-3p, hsa-miR-135b-5p, hsa-miR-31-3p, hsa-miR-223-5p e hsa-miR-200c-3 FCO (PEREIRA et al., 2018). Outros cinco miRNAs apresentaram níveis mais elevados no FCO, sendo eles, hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-138-5p e hsa-miR-199a-3p (PEREIRA et al., 2018). Esses miRNAs possivelmente atuam regulando a expressão dos genes *EZH2*, *XIAP*, *MET* e *TGFBR1* (PEREIRA et al., 2018). Contudo, esses achados necessitam ser validados e novas análises são necessárias para determinar o papel dessas alterações na patogênese desse tumor (PEREIRA et al., 2018).

No que diz respeito às alterações citogenéticas, aberrações cromossômicas estruturais não-recorrentes foram detectadas em dois casos diferentes dessa doença por dois estudos empregando a técnica de bandamento G (GOLLIN et al., 1992; DAL CIN et al., 1993). A amplificação do gene *MDM2* já foi observada em dois indivíduos por dois estudos distintos (TABAREAU-DELALANDE et al., 2015; MA et al., 2021). Além disso, neste ano, foi identificado por meio de sequenciamento completo de genoma que alterações no número de cópias (CNAs) nos cromossomos 7 e 12 estão presentes em cerca de 45% casos dessa doença (MA et al., 2021). Análises adicionais realizadas por esse grupo indicam que esses CNAs afetam genes *HILPDA*, *CALD1*, *MDM2*, *CDK4*, *PHF14*, *AIMP2*, *C1GALT1*, *MICALL2*, visto que análises de qPCR demonstram a ocorrência de amplificação nesses genes em amostras contendo alterações no número de cópias (MA et al., 2021).

2.1.4.2 A contribuição das análises histológicas e imuno-histoquímicas para o entendimento da patogênese do FCO

Grande parte dos estudos sobre o FCO são baseados em análises histológicas e imuno-histoquímicas, comparando-o com tecidos normais e/ou com outras lesões. Em revisão não-exaustiva da literatura, é possível perceber que o FCO já foi avaliado em relação a marcadores de osteogênese não-colagenosos (ONO et al., 2007; TOYOSAWA et al., 2007; ELIAS, et al., 2010; VELTRINI et al., 2019), relacionados à proliferação celular (MESQUITA et al., 1998; GARCIA et al., 2013; GOULART-FILHO et al., 2018) e envolvidos na diferenciação óssea (MURAMATSU et al., 1997). Diferenças na composição das matrizes ósseas dessa neoplasia e a DF foram identificadas por meio de análises imuno-histoquímicas, como por exemplo, na abundância de osteocalcina, confirmando que apesar das inúmeras similaridades fenotípicas, ambas as lesões são distintas (TOYOSAWA et al., 2007)

Análises histológicas aplicando diferentes tipos de corantes e técnicas microscópicas já foram aplicadas no estudo dos materiais mineralizados e não-mineralizados dessa lesão, visando estabelecer sua origem (KULKARNI, 2014). Contudo, essas técnicas apresentam restrição do número de alvos que podem ser avaliados simultaneamente e, por consequência, limitam a capacidade de geração de *insights* acerca da patogênese da doença. Outro aspecto a ser abordado, é que grande parte das investigações empregando esses métodos tem buscado analisar apenas alvos classicamente descritos em condições similares (MESQUITA et al., 1998; ONO et al., 2007; TOYOSAWA et al., 2007; ELIAS, et al., 2010; GARCIA et al., 2013; GOULART-FILHO et al., 2018; VELTRINI et al., 2019). Desse modo, aplicação de métodos de análise mais abrangentes, como as tecnologias ômicas, podem ser benéficos para o entendimento de inúmeros aspectos relevantes da patogênese do FCO.

2.1.4.3 Modelos de estudo *in vivo* e *in vitro* de FCO

Com o intuito de facilitar o entendimento da patogênese do FCO, modelos animais e culturas teciduais e celulares da doença têm sido propostos ao longo dos últimos anos. Lee e colaboradores (2018) são os únicos pesquisadores a propor um modelo animal desse tumor. O modelo animal foi estabelecido por meio da deleção do gene supressor de tumor *MEN1* (LEE et al., 2018). Apesar

desse modelo compartilhar alguns aspectos clínicos e histopatológicos com o FCO em humanos, outras características como a presença de extensiva atividade osteoclástica ao redor das lesões são exclusivas dos murinos. Adicionalmente, a incidência de mutações no gene *MEN1* em casos de FCO em humanos ainda não foi determinada, ressaltando a necessidade de avaliação cautelosa desses achados.

Linhagens de células imortalizadas desse tumor foram geradas por meio de transfecções sequenciais das células obtidas de uma lesão unilocular mandibular, cujas estruturas mineralizadas eram constituídas principalmente de materiais que se assemelham a cimento, com vetores distintos, contendo inicialmente o antígeno T do vírus símio SV-40 e posteriormente o gene hTERT (KUDO *et al.*, 2002). Análise posterior comparando essas linhagens com uma linhagem de osteoblastos de maxilares humanos por microarranjo revelou aumento na expressão de diversos genes, como *HMMR*, *EREG*, *MSH2*, entre outros. Análises funcionais a partir desse resultado demonstraram que a proteína codificada por *HMMR* (denominada RHAMM), está envolvida na sinalização de ácido hialurônico, aumentando a fosforilação de ERK e promovendo o crescimento celular e possivelmente inibindo a diferenciação dessas células (HATANO *et al.*, 2011). Para verificar se as alterações na expressão de *HMMR* são reproduzidas *in vivo*, os níveis de expressão do transcrito e produto proteico desse gene foram analisados em amostras de tecido desse tumor por qRT-PCR e imuno-histoquímica, respectivamente, comparado com ossos normais. Os resultados indicaram que a abundância de mRNA e proteína estão aumentados no FCO em relação aos tecidos normais (HATANO *et al.*, 2013).

Outro modelo proposto para o FCO, inclui culturas organotípicas estabelecidas a partir de amostras teciduais de pacientes e estruturas de colágeno do tipo 1 (BASTOS *et al.*, 2018). Estas culturas *in vitro* apresentam vantagem de mimetizarem o microambiente tumoral (BASTOS *et al.*, 2018).

De modo geral, apesar dos modelos de estudo *in vivo* e *in vitro* representarem alternativas à relativa raridade da lesão, permitindo o seu estudo (LEE *et al.*, 2017), a interpretação dos resultados obtidos com seu uso deve ser realizada com cuidado. Essa afirmação é decorrente do conhecimento limitado acerca das características moleculares desse tumor, o que impossibilita checar se a sua assinatura molecular está contida nesses protótipos (DUARTE-

ANDRADE *et al.*, 2020) e, não somente os aspectos fenotípicos. À medida que os estudos sobre a doença vão avançando, um uso mais apropriado desses modelos será possível e eles serão bastante úteis na busca por novas estratégias de tratamento (DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2020).

2.1.4.4 Ponderação acerca do conhecimento molecular do FCO

Apesar das diversas descobertas recentes de alterações moleculares no FCO, novos estudos são necessários para validar esses achados e determinar o papel desses processos na origem e desenvolvimento do tumor. Nessas circunstâncias, as tecnologias ômicas se apresentam como ferramentas promissoras para confirmação das modificações detectadas, bem como para possibilitar a identificação de alterações *drivers* e outras características importantes desta lesão.

2.2 Análises ômicas

O termo “ômicas” é utilizado para referir a um conjunto de áreas da ciência que envolvem metodologias e tecnologias que visam a análise simultânea de um grande número de biomoléculas de determinada natureza (ROTROFF; MOTSINGER-REIF, 2016; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Entre os principais representantes dessas abordagens, podem-se incluir a genômica, transcriptômica, proteômica e a metabolômica (ROTROFF; MOTSINGER-REIF, 2016; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017).

2.2.1 Genômica

A genômica é a tecnologia ômica cujo alvo de análise são as moléculas de DNA, apresentando inúmeras aplicações no estudo de diferentes tópicos de interesse da área biomédica (GOODWIN, MCPHERSON; MCCOMBIE, 2016; LI *et al.*, 2017). No que diz respeito ao estudo de doenças humanas, essa abordagem tem sido utilizada principalmente com o intuito de detectar as variações pontuais, pequenas inserções e/ou deleções e alterações estruturais nas moléculas de DNA que apresentam possíveis implicações em sua patogênese e outras características de importância clínica (**Figura 3**) (MEYERSON; GABRIEL; GETZ, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; KOBOLDT *et al.*, 2013; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017). Diversas metodologias têm sido aplicadas

nas análises genômicas, mas com o surgimento das técnicas de sequenciamento de nova geração, uma grande parte das investigações passou a ser baseada nelas (WAN-IBRAHIM et al., 2015; LI *et al.*, 2017; LAPPALAINEN et al., 2019).

2.2.1.1 Sequenciamento Completo de Exoma

Entre as tecnologias genômicas, o sequenciamento completo do exoma representa uma ferramenta cujo objetivo é a análise em larga escala da porção codificante do DNA, os éxons (MEYERSON; GABRIEL; GETZ, 2010). Em comparação com o sequenciamento completo do genoma, essa técnica apresenta menores custos para realização dos experimentos, produzem dados de sequenciamento com maior profundidade e a complexidade na interpretação dos dados é menor (MEYERSON; GABRIEL; GETZ, 2010; ZHANG *et al.*, 2011; YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Por outro lado, as porções não-codificantes não são analisadas, por consequência as variantes contidas nessas regiões não são detectadas nessa metodologia (YOHE; THYAGARAJAN, 2017). Outra limitação do sequenciamento de exoma inclui a sua incapacidade de detectar grandes alterações estruturais (MOORCRAFT; GONZALEZ; WALKER, 2015). Não obstante, inúmeras investigações têm sido capazes de identificar a base molecular de diversas doenças por meio da utilização dessa técnica, assim como está sendo cada vez mais aplicada no diagnóstico genético (KU *et al.*, 2012; DASHTI; GAMIEL, 2017).

Durante o preparo da amostra, uma importante etapa do sequenciamento de exoma é o enriquecimento dos éxons pela utilização de sondas de oligonucleotídeos, sendo comumente baseada em métodos de captura em solução ou em arranjo (KU *et al.*, 2012; WARR *et al.*, 2015). Nos kits de enriquecimento comercializados na atualidade, algumas regiões não exônicas têm sido adicionadas, como as porções não-traduzidas (UTR) dos genes e as sequências de DNA que codificam miRNA, entre outras (MAJEWSKI *et al.*, 2011; WARR *et al.*, 2015).

No que concerne às lesões odontogênicas, o sequenciamento de painéis gênicos têm sido uma das ferramentas mais utilizadas para a identificação das alterações moleculares associadas ao seu desenvolvimento (DUARTE-ANDRADE, 2020). Essa abordagem tem sido aplicada com sucesso no estudo

de algumas dessas lesões. Por outro lado, a assinatura de outras condições, como FCO, não foi identificada por esta metodologia, diante da limitação do número de alvos que são avaliados (PEREIRA *et al.*, 2018a; DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2020). Nesse cenário, o sequenciamento do exoma se apresenta como uma ferramenta promissora no estudo dessa doença.

2.2.2 Proteômica

A proteômica é uma área cujo enfoque é o estudo amplo das proteínas presentes em um sistema biológico (MAES *et al.*, 2015). Tendo em vista a grande importância dessa biomolécula em praticamente todos os processos biológicos essenciais, essa abordagem é capaz de gerar informações sobre a sua abundância, nível de produção e degradação, ocorrência de modificações pós-traducionais, identificação de biomarcadores, do perfil molecular e de possíveis alvos para tratamento, entre outros (SCHMIDT; FORNE; IMHOF, 2014; MAES *et al.*, 2015; SUN; HU, 2016; HASIN; SELDIN; LUSIS, 2017).

As modificações pós-traducionais podem influenciar o funcionamento, organização entre outros aspectos das proteínas (MAES *et al.*, 2015; MELO-BRAGA *et al.*, 2015; SOLARI *et al.*, 2015; SUN; HU, 2016). Diante disso, as análises proteômicas podem também ser dedicadas exclusivamente ao estudo de uma determinada coleção de moléculas com propriedades químicas específicas (MAES *et al.*, 2015). Por exemplo, a fosfoproteômica tem o objetivo de analisar a fosforilação proteica, que é uma das principais modificações pós-traducionais e tem um grande envolvimento na sinalização molecular de importantes eventos biológicos (KOSAKO; NAGANO, 2011; WU *et al.*, 2011; LEE; JONES; HUBBARD, 2014), incluindo aqueles com potencial relevância para patogênese do FCO.

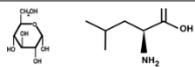
	Genômica	Transcriptômica	Proteômica	Metabolômica
Aplicações:	 Detecção de alterações na sequência Detecção de alterações estruturais Identificação de variantes associadas ao prognóstico e responsividade ao tratamento	 Avaliação da expressão gênica Análise de variações estruturais e de sequência Identificação de isoformas de <i>splicing</i>	 Análises qualitativas e quantitativas do perfil proteico Avaliação de interações de proteína Detecção e avaliação do efeito de modificações pós-traducionais	 Análises qualitativas e quantitativas do perfil metabólico Análise de vias metabólicas Investigações do impacto de alterações genéticas, fatores ambientais, entre outros.
	Alvos:	DNA Ex: DNA genômico éxons mtDNA	RNA Ex: mRNAs lncRNAs miRNAs	Proteínas Ex: Proteínas totais Fosfoproteínas

Figura 3. Representação esquemática das aplicações das principais abordagens ômicas.

As diferentes áreas ômicas possuem diferentes alvos moleculares de estudo, de modo que as suas metodologias, aplicações e interpretações são distintas na maioria das situações. Por exemplo, análises genômicas têm por objetivo a análise do DNA, sendo útil na detecção de alterações na sequência ou na estrutura dessa molécula. Além disso, algumas subáreas ômicas, cujo foco é avaliação de biomoléculas com propriedades específicas, são reconhecidas, como a fosfoproteômica que examina apenas as proteínas/peptídeos fosforilados. Siglas: mtDNA: DNA mitocondrial; lncRNA: *long non coding RNA*; Ác: ácidos.

3 JUSTIFICATIVA

O FCO é uma lesão fibro-óssea que tem o potencial de causar grandes prejuízos estéticos e funcionais aos indivíduos afetados na falta de tratamento apropriado. Contudo, o conhecimento limitado acerca dos seus aspectos moleculares interfere com o estabelecimento de marcadores de diagnóstico, classificação e o desenvolvimento de estratégias de tratamento com menores impactos na qualidade de vida dos indivíduos.

Nos últimos anos, o número de publicações visando compreender a patogênese dessa lesão cresceu enormemente, com apontamento de diversos alvos e processos biológicos com potencial relevância na patogênese dessa doença. Contudo, a maioria desses estudos carece de validação em números maiores de amostras e análise do impacto funcional das alterações identificadas. Nesse contexto, diversas lacunas ainda necessitam de maiores esclarecimentos, como a determinação da sua origem celular e dos eventos moleculares implicados em seu desenvolvimento.

Nesse cenário, a aplicação de tecnologias ômicas, como a proteômica e o sequenciamento completo do exoma poderão trazer novos *insights* e auxiliar no entendimento das questões ainda não respondidas sobre a sua natureza biológica. A análise genética poderá auxiliar na identificação de eventos moleculares envolvidos no surgimento do FCO, enquanto a proteômica poderá apontar a sinalização implicada nesses processos. No geral, os achados desse estudo poderão favorecer evidências sobre essa lesão óssea, mas também auxiliar no esclarecimento de mecanismos que comprometem a osteogênese/diferenciação celular.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Identificar as alterações moleculares associadas à patogênese do FCO.

4.2 Objetivos específicos

- Identificar variantes genéticas associadas ao desenvolvimento e progressão do FCO;
- Verificar se a via MAPK participa da patogênese do FCO;
- Avaliar a ocorrência de diferenças na sinalização molecular entre FCO e DF;
- Identificar alterações na sinalização molecular envolvidas no desenvolvimento ou progressão do FCO.

5 MÉTODOS

5.1 Amostras e pacientes

A presente investigação foi conduzida em acordo com os princípios éticos, tendo sido aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG, sob os números de protocolo CAAE: 99674818.8.0000.5149 e 43925221.9.0000.5149 (**Anexo 1**).

As amostras utilizadas no presente trabalho foram obtidas de voluntários atendidos na Clínica de Patologia e Semiologia Odontológicas da Faculdade de Odontologia da UFMG que concordaram com sua participação e assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). No caso de minoridade, foi coletada a assinatura do menor em um Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) e dos responsáveis em um TCLE específico.

Durante os procedimentos cirúrgicos aplicados no diagnóstico e/ou tratamento, foram coletadas amostras de tecidos de FCO e DF de casos com descrição clínica completa para confirmação do diagnóstico por dois patologistas experientes, incluindo exames radiográficos, histopatológicos e histórico clínico, respeitando os critérios sugeridos pela OMS (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). No caso dos pacientes de FCO, foi coletado também, sempre que possível raspado de mucosa bucal ou fragmentos de mucosa do acerto da ferida cirúrgica.

Para cada amostra obtida, um fragmento de tecido foi criopreservado com *RNAlater* ou *TissueTek* em botijões de nitrogênio líquido. Outro fragmento foi fixado em formalina tamponada a 10% e embebido em parafina, sendo os blocos utilizados tanto no preparo de lâminas de histopatologia, quanto na realização de uma parcela dos experimentos.

Os tecidos frescos foram utilizados na realização do sequenciamento completo do exoma, enquanto que os tecidos parafinizados foram empregados nas análises proteômica, fosfoproteômica e imuno-histoquímicas.

5.2 Sequenciamento completo do exoma

O sequenciamento completo do exoma foi realizado em amostras de tecido fresco de onze casos de FCO e amostras pareadas de seis mucosas (jugal ou gengival) de seis desses pacientes (**Quadro 1**).

O DNA total foi extraído utilizando o kit *DNeasy Blood & Tissue* (QIAGEN), conforme as instruções do fabricante. A etapa de enriquecimento dos éxons foi

realizada utilizando o kit *SureSelect Human All Exon V5* (Agilent Technologies), conforme as especificações do fornecedor. Esse kit de captura é capaz de enriquecer 357.999 éxons, contidos em 21.522 genes. Os dados de sequenciamento foram adquiridos na plataforma HiSeq 2500 (Illumina), no modo *paired-end*.

O processamento bioinformático desses dados é complexo, envolvendo múltiplas etapas, e foi executado conforme o trabalho de Gomes e colaboradores (2018). Em resumo, o mapeamento das *reads* foi executado com a ferramenta *Burrows-wheeler Aligner* (BWA) (LI *et al.*, 2009a), utilizando como referência a montagem hg19 (também denominada GRCh37) do genoma humano. Em seguida, as duplicatas de PCR foram removidas pelo programa Picard. O processo de identificação das potenciais variantes, também conhecido como *variant call*, foi realizado pela aplicação conjunta de programas dedicados a essa finalidade, sendo eles, o SAMtools mpileup (LI *et al.*, 2009b), FreeBayes (versão v1.1.0-4-gb6041c647) e o GATK *haplotype caller* (versão 3.8) (MCKENNA *et al.*, 2010). Esse processo foi realizado para aumentar a confiança da detecção, de modo que esses achados foram filtrados no intuito de manter somente as variantes que tivessem sido identificadas em no mínimo duas dessas ferramentas e em pelo menos 10% do total das sequências obtidas de cada caso (GOMES *et al.*, 2018). Por fim, a anotação das variantes que foram mantidas após a filtragem foi conduzida utilizando o programa ANNOVAR.

A interpretação das tabelas brutas contendo as variantes identificadas no pré-processamento de bioinformática também foram filtradas com base em listas de genes envolvidos em processos biológicos com potencial relevância à patogênese do FCO, construídas a partir de dados da literatura ou obtidas de bases de dados de vias, bem como com o auxílio de diversos programas (**Quadro 2** e **Figura 5**). Os dados brutos também foram analisados utilizando os programas *online* Varstation (<https://varstation.com/>) e MendelMD (<https://mendelmd.org/>) (**Figura 5**). O IGV 2.4.16 foi utilizado para inspeção visual dos dados e exclusão de achados falso-positivos.

5.3 Análises quantitativas do fosfoproteoma e proteoma total de FCO e DF

5.3.1 Preparo das amostras do proteoma total e fosfoproteoma

As análises quantitativas do fosfoproteoma e proteoma total foram realizadas comparando amostras de tecidos parafinizados de FCO (n = 3) com DF (n = 3). As características clínicas dos casos utilizados são apresentadas no **Quadro 3**.

Inicialmente, as porções representativas de cada lesão foram selecionadas por meio da avaliação das lâminas de histopatologia, seguido por sua subsequente sobreposição aos respectivos blocos de parafina. A abordagem de extração proteica foi baseada em adaptações do método descrito no trabalho publicado por Piehowski e colaboradores (2018). De forma resumida, os dois cortes superiores com espessura de 10 µm foram descartados, enquanto que os demais foram coletados em microtubos Eppendorf® do tipo Protein LoBind. O procedimento de desparafinização consistiu em duas lavagens sucessivas com 500 µL de xilol seguidas por reidratação em banhos em uma série de álcoois com diferentes graduações (absoluto, 80° e 70°). Posteriormente, as proteínas foram extraídas utilizando uma combinação de soluções, sendo elas 200 µL de TFE (tetrafluoretanol):Tris (600 mM) em proporção 1:1 e 200 µL de tampão de bicarbonato de amônio (AMBIC) com concentração de 50 mM, contendo uma mistura comercial de inibidores de proteases e fosfatases (Sigma). Para auxiliar na quebra dos *crosslinks* que são formados no processo de parafinização dos tecidos, os microtubos contendo as amostras foram incubados à 95°C por um período de 90 min. Após esse intervalo, as amostras foram submetidas a dois ciclos de sonicação, 20 segundos cada, potência média e pausa de 30 segundos entre eles, em banho ultrassônico, com intuito de facilitar a homogeneização. As misturas foram centrifugadas à temperatura de 4°C e 14.000 g por 5 min e o sobrenadante foi recolhido em um novo microtubo. As proteínas foram reduzidas, utilizando 5 mM de ditioneitol durante 1 h à 37°C e posteriormente submetidas à alquilação com 40 mM de iodoacetamida por 30 min. Para digestão proteolítica, as amostras foram primeiramente diluídas cinco vezes com tampão AMBIC na concentração 50 mM, logo depois foram incubadas por 16 h à 37°C com tripsina modificada (1:50 – proporção de enzima:amostra). A tripsinização foi interrompida pela

adição de 0,4% de ácido trifluoroacético às misturas. A dessalinização dos peptídeos foi conduzida com cartuchos Sep-Pak C18 de extração de fase-sólida seguindo as especificações do fabricante. Para dosagem da concentração dos peptídeos, utilizou-se o *Qubit Protein Assay* (ThermoFisher, EUA) conforme indicações do protocolo do kit e a quantificação foi realizada no fluorômetro Qubit (ThermoFisher, EUA). Em seguida, 25 µg de cada amostra foram coletados em novos microtubos e o seu conteúdo foi completamente seco em um concentrador à vácuo SpeedVac e armazenados à -20°C até o momento de realização das etapas posteriores.

Como estratégia para quantificação relativa das proteínas entre os grupos, optamos pela marcação isobárica dos peptídeos utilizando o kit TMT10plex™ (ThermoFisher). Cada amostra foi marcada com uma *tag* isobárica distinta, conforme apresentado no **Quadro 3**. Nesta etapa, após a reconstituição dos peptídeos com 34 µL de uma solução de concentração 100 mM de tampão bicarbonato de trimetilamônio (TEAB), cada amostra foi marcada com 10 µL da solução de 0,2 mg de uma das *tags* diluída em acetonitrila, conforme o esquema pré-definido (**Quadro 3**). A reação foi incubada por 1 h e, posteriormente, paralisada pela adição da solução de 5% de hidroxilamina em 100 mM de tampão TEAB. Em seguida, quantidades iguais de cada amostra foram complexadas em um único *pool*. Por fim, para enriquecimento dos fosfopeptídeos, seguimos rigorosamente as indicações do artigo de protocolo de Mello-Braga e colaboradores (2015). Este procedimento é baseado no uso da cromatografia de afinidade com dióxido de titânio (TiO₂). Tanto a fração ligante (fosfoproteoma) da cromatografia, quanto não-ligante (proteoma total), foram coletadas para análise. As frações foram totalmente secas em concentrador SpeedVac e acondicionadas à -20°C até a realização das etapas posteriores.

5.3.2 Pré-fracionamento das amostras do proteoma total

As amostras do proteoma total foram submetidas a uma etapa de pré-fracionamento anteriormente à aquisição dos dados na plataforma LC/MS/MS. Esta etapa foi realizada com o intuito de reduzir a complexidade da amostra e, por consequência, permitir uma maior identificação de proteínas. Desse modo, o procedimento inicial consistiu na reconstituição da fração do proteoma em uma

solução de 200 mM de formato de amônio a pH 9,3 (Solução A). Esse processo foi realizado em um cromatógrafo líquido de alta performance (HPLC) do modelo Ultimate 3000 HPLC (Dionex, EUA), no qual uma coluna de C18 (C18 Acquity UPLC M-Class Peptide CSH da fabricante Waters) estava contida. Para a eluição dos peptídeos, utilizou-se um fluxo de 10 μ L/min e 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. Ao total, foram obtidas 15 frações peptídicas, que por um processo automatizado foram combinadas em cinco em adição ao *flow-through* (fração na qual as moléculas não se ligaram à coluna cromatográfica). Por fim, procedemos com a secagem das frações em um concentrador *SpeedVac* e as amostras foram mantidas resfriadas -20°C até o momento da análise.

5.3.3 Aquisição dos dados na plataforma LC/MS/MS

Previamente à aquisição dos dados, os peptídeos foram reconstituídos em uma solução de ácido fórmico à concentração de 0,1% (v/v). Em seguida, as amostras foram analisadas na plataforma HPLC EASYnLC (Thermo Scientific) acoplada ao espectrômetro de massa Q-Exactive HF Orbitrap (Thermo Fisher). A separação dos peptídeos do proteoma total e fosfoproteoma foi realizada, ao fluxo de 250 nL/min, em sistema contendo uma pré-coluna (2 cm de comprimento e 10 nm de diâmetro) e coluna (17 cm de comprimento, 75 nm de diâmetro interno e partícula de tamanho de 3 μ m), ambas de sílica-C18 e de fabricação interna. Gradientes distintos estabelecidos a partir das soluções A (0,1% de ácido fórmico) e B (90% de acetonitrila e 0,1% de ácido fórmico) foram utilizados para eluição dos peptídeos do proteoma total e do fosfoproteoma. As concentrações descritas nas seções 5.5.3.1 e 5.5.3.2 tem como referência o solvente B. Após a eluição, os peptídeos foram ionizados por nanoeletrospray e analisados no espectrômetro de massas programado para o trabalho no modo de aquisição dependente de dados (DDA). Os dados da MS/MS (espectrometria de massas em tandem) foram resolvidos no Orbitrap após a sua seleção e subsequente fragmentação por dissociação induzida por colisão de alta energia (HCD) sob uma energia de colisão normalizada de 34. As condições específicas do proteoma total e do fosfoproteoma são descritas nas subseções a seguir.

5.3.3.1 Aquisição dos dados do proteoma total

Os peptídeos das frações do proteoma total foram eluídos com o seguinte gradiente cromatográfico: 1-7% por 3 min; 7-28% em 50 min; 28-45% em 10 min; 45-100% em 3 min. No MS1, os íons peptídicos foram resolvidos na faixa de massa compreendida entre 400 a 1600 m/z, com resolução de 120.000 FWHM (*full width at half maximum*/ largura à meia altura). A cada MS, foram selecionados os 15 íons mais intensos para fragmentação. No MS2, os fragmentos foram resolvidos na faixa de massa entre 110 e 2000 m/z e uma resolução de 60.000 FWHM.

5.3.3.2 Aquisição dos dados do fosfoproteoma

Os peptídeos do fosfoproteoma foram separados sob a seguinte programação de gradiente: 1-3% por 3 min; 3-22% em 120 min; 22-40% em 20 min; 40-95% em 3 min. No MS1, os íons foram analisados na faixa de massa de 350 a 1400 m/z, com resolução de 120.000 FWHM. Em cada MS, isolou-se os 10 íons mais intensos para fragmentação por HCD. Já no MS2, os fragmentos foram analisados na mesma faixa do proteoma total, mas à resolução de 45.000 FWHM.

5.3.4 Pré-processamento dos dados

Os dados obtidos na plataforma LC/MS/MS foram pré-processados no programa *Proteome Discoverer* versão 2.4.0.305 (Thermo Fischer Scientific). Os peptídeos foram identificados utilizando a ferramenta Sequest HT para buscar na base de dados humana *UniProtKB/Swiss-Prot*, aplicando os seguintes parâmetros: 1. Seleção de tripsina como enzima proteolítica, aceitando no máximo a perda de duas clivagens; 2. Definição da carbamidometilação de cisteína como modificação fixa; 3. Seleção das modificações dinâmicas: acetilação da porção N-terminal da proteína, oxidação de metionina, modificações de TMT em lisina e em porção N-terminal de peptídeo. No processamento dos dados do fosfoproteoma, a fosforilação de serina, treonina e tirosina também foram consideradas como modificações dinâmicas. Foram consideradas como tolerâncias de massa do precursor (espectro MS1) e do fragmento (espectro MS2), respectivamente, 10 ppm e 0,02 Da. Considerando que os peptídeos foram marcados isobaricamente durante o preparo das

amostras, a quantificação nas análises do proteoma total e do fosfoproteoma foram baseadas na intensidade do íon repórter.

5.3.5 Análises estatísticas e interpretação biológica dos dados

Os dados foram transformados em \log_2 e cada amostra foi normalizada pela subtração de sua mediana no programa *Perseus* v.1.6.14.0. No caso particular dos fosfopeptídeos, aplicou-se também uma segunda estratégia de normalização, na qual os níveis das respectivas proteínas identificadas no proteoma total são considerados para correção da quantificação dos peptídeos modificados (WU *et al.*, 2011). A construção de modelos multivariados foi realizada no programa *MetaboAnalyst* versão 4.0 (CHONG *et al.*, 2018). Posteriormente, realizamos o teste estatístico Limma no programa *NormalyzerDE* (WILLFORSS, CHAWADE, LEVANDER, 2019), aplicando simultaneamente como limiar de significância o valor $p \leq 0,05$ e $\log_2 \text{fold change} \leq -0,58$ ou $\geq 0,58$. A escolha pela utilização dessa ferramenta estatística é decorrente principalmente deste método apresentar qualidade satisfatória mesmo com um número baixo de amostras (SCHWÄMMLE *et al.*, 2020). Além disso, diversos estudos têm reforçado a superioridade deste teste aos tradicionais, particularmente com dados complexos como os proteômicos (WILLFORSS, CHAWADE, LEVANDER; 2019; SCHWÄMMLE *et al.*, 2020).

A análise de enriquecimento de vias foi realizada na base de dados *pathDIP*, permitindo a pesquisa em todas as fontes de vias biológicas disponíveis na plataforma. As análises de ontologia gênica (GO) foram realizadas utilizando os programas *Enrichr* e *PANTHER* aplicando os parâmetros default e *Homo sapiens* como organismo de referência. Para análise de interação proteína-proteína, o *STRING* versão 11.0 foi empregada.

5.4 Análises imuno-histoquímicas para avaliação do fosfo-Erk1/2 no FCO

As análises imuno-histoquímicas foram realizadas em secções de 4 μ m de tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina de 8 casos de FCO (**Quadro 1**), conforme protocolo apresentado por Pereira e colaboradores (2019b). De forma detalhada, inicialmente, as secções teciduais foram desparafinizadas com banhos de xilol e reidratadas com uma série de álcoois graduados e o excesso de álcool removido por banho em água destilada. Para

recuperação antigênica, as lâminas foram imersas em solução tampão de tris-EDTA [pH 8.2] aquecida à 95-98°C por 30 minutos. O funcionamento das peroxidases endógenas foi paralisado com uma solução de 3% de peróxido de hidrogênio em metanol. Em seguida, as secções foram incubadas *overnight* com solução de 1:100 de anticorpo monoclonal de coelho anti-fosfo-Erk1/Erk2 (Thr202/Tyr204) (*Cell Signaling Technologies*®) a 4°C em uma câmara úmida. A revelação do procedimento foi realizada pela aplicação de Dako EnVision™+ Dual Link System-HRP e solução cromogênica de diaminobenzidina (Dako Liquid Dab+, Dako). Posteriormente, os tecidos foram contra-corados com hematoxilina de Meyer, desidratados em uma série álcoois graduados e banhos de xilol, e montadas em meio de montagem Entellan® (Merck Milipore). Para obtenção do controle negativo, a aplicação do anticorpo primário foi omitida em uma das secções (superior) de cada lâmina. Como controle positivo, foram utilizados tecidos parafinizados de granuloma piogênico oral que foram submetidos ao mesmo processamento das amostras testes (**Apêndice 1**). Além disso, a marcação das células endoteliais foi considerada como controle positivo interno.

A interpretação das lâminas foi realizada por dois patologistas experientes (RSG e TSFP), que analisaram a intensidade de marcação nuclear e citoplasmática por meio da inspeção microscópica de toda a área tecidual, classificando cada caso em: imunopressão ausente (-); baixa (+); moderada (++) e intensa (+++).

6 RESULTADOS

6.1 Dados clínicos dos pacientes

Os dados clínicos dos pacientes com FCO incluídos neste estudo e a descrição dos testes moleculares realizados em cada caso estão sumarizados no **Quadro 1**. Foram estudados 11 casos esporádicos de FCO. Entre as amostras, 9 foram obtidas de indivíduos do sexo feminino e 2 do sexo masculino (razão mulher/homem: 4:1), com idade variando entre 16 e 58 (média etária: 35,1). Apenas um dos tumores ocorreu na maxila. A mucosa bucal e/ou o raspado de mucosa bucal foram obtidos de seis desses casos de FCO para utilização como controle normal (DNA germinativo) no sequenciamento completo de exoma. Imagens representativas dos casos de FCO utilizados no estudo são apresentadas no **Apêndice 2**. Os experimentos de proteômica e fosfoproteômica com marcação isobárica foram realizados empregando, como grupo de comparação, pacientes com diagnóstico confirmado de DF conforme recomendações da OMS (EL-NAGGAR *et al.*, 2017) (**Quadro 3**). Para facilitar o entendimento do leitor, as informações específicas dos pacientes empregados em cada análise são descritas também nas seções subsequentes, mas o código de identificação das amostras foi unificado.

Quadro 1. Dados clínicos dos indivíduos acometidos por fibroma cemento ossificante incluídos no estudo e as respectivas análises moleculares realizadas utilizando cada amostra.

Nome da amostra	Sexo	Idade	Local da lesão	Análises moleculares			
				Sequenciamento Completo de Exoma		Proteômica com marcação isobárica	IHC
				Tumor	Mucosa normal		
FCO 1	F	29	Mandíbula	X	X	X	X
FCO 2	F	58	Mandíbula	X			
FCO 3	F	48	Mandíbula	X	X		
FCO 4	F	25	Mandíbula	X			X
FCO 5	F	30	Mandíbula	X			X
FCO 6	F	58	Mandíbula	X	X	X	X
FCO 7	F	31	Mandíbula	X	X		X
FCO 8	F	30	Maxila	X			X
FCO 9	M	30	Mandíbula	X	X		X
FCO 10	M	16	Mandíbula	X	X	X	X
FCO 11	F	46	Mandíbula	X			

Estão marcadas com “X” as análises realizadas em cada amostra. O ensaio de sequenciamento completo de exoma foi realizado com amostras frescas de tumor e mucosa normal. Por outro lado, a proteômica com marcação isobárica e a imuno-histoquímica foram realizadas com amostras de tecidos parafinizados. Abreviações: F: feminino; M: masculino; IHC: imuno-histoquímica.

6.2 Busca pela assinatura genética do FCO

6.2.1 Avaliação preliminar dos resultados do sequenciamento completo do exoma

Na busca pela assinatura genética do FCO, foi realizado o sequenciamento completo do exoma de amostras de tecido fresco de 11 casos de FCO e seis amostras pareadas de mucosa normal de seis dos pacientes afetados. Após o pré-processamento dos dados, foram detectadas, ao total, 13.761 variantes em 7.735 genes. Entre elas, 4.355 variantes em 3.312 genes foram identificadas apenas nas amostras de tumor, representando alterações somáticas.

A maioria das alterações potencialmente somática detectadas foram variantes de nucleotídeos únicos (SNV) não-sinônimas, correspondendo a 87% do total. Os outros tipos de variantes passíveis de identificação por

sequenciamento completo de exoma foram identificados em menor proporção nas amostras analisadas, dentre elas, deleção e inserção *frameshift*, inserção *in frame* e variantes com perda ou ganho de stop códon ou que promovem alterações no *splicing* (Figura 4).

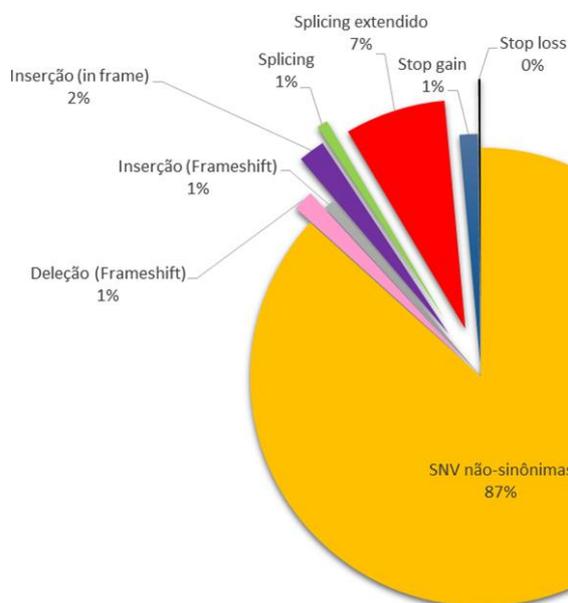


Figura 4. Distribuição dos tipos de variantes potencialmente somáticas que foram identificadas no sequenciamento completo das amostras de fibroma cemento ossificante.

6.2.2 Identificação de potenciais drivers envolvidos na patogênese do FCO

Com o intuito de viabilizar a identificação dos potenciais drivers envolvidos na patogênese do FCO, diferentes estratégias de filtragem foram aplicadas para seleção das variantes (Figura 5). Foram compilados os conjuntos de alvos que possivelmente poderiam estar implicados no desenvolvimento desta lesão, como aqueles participantes de vias frequentemente alteradas em processos neoplásicos, que regulam a diferenciação celular, que controlam a formação e a reabsorção óssea, entre outros (Quadro 2 e Figura 5). De modo similar, as alterações moleculares previamente descritas em FCO ou em doenças que já foram reportadas em associação a essa neoplasia também foram examinadas.

Os resultados do sequenciamento também foram analisados utilizando *pipelines* semiautomáticos, MendelMD e Varstation (Figura 5 C). Por fim, estratégias de inspeção manual foram aplicadas em conjunto ou separadamente às demais análises. Nas análises manuais, diferentes bases de dados e *softwares* foram utilizados para verificar o potencial impacto funcional das variantes, as respectivas frequências alélicas populacionais, tipo de mutação,

descrições prévias das alterações em lesões benignas e malignas, entre outros (Figura 5 D). É importante ressaltar que todos os dados foram revisados periodicamente com o intuito de verificar se as atualizações dos bancos genômicos poderiam promover alguma alteração em nossos resultados. Os achados de todas as análises serão apresentados nas seções subsequentes.

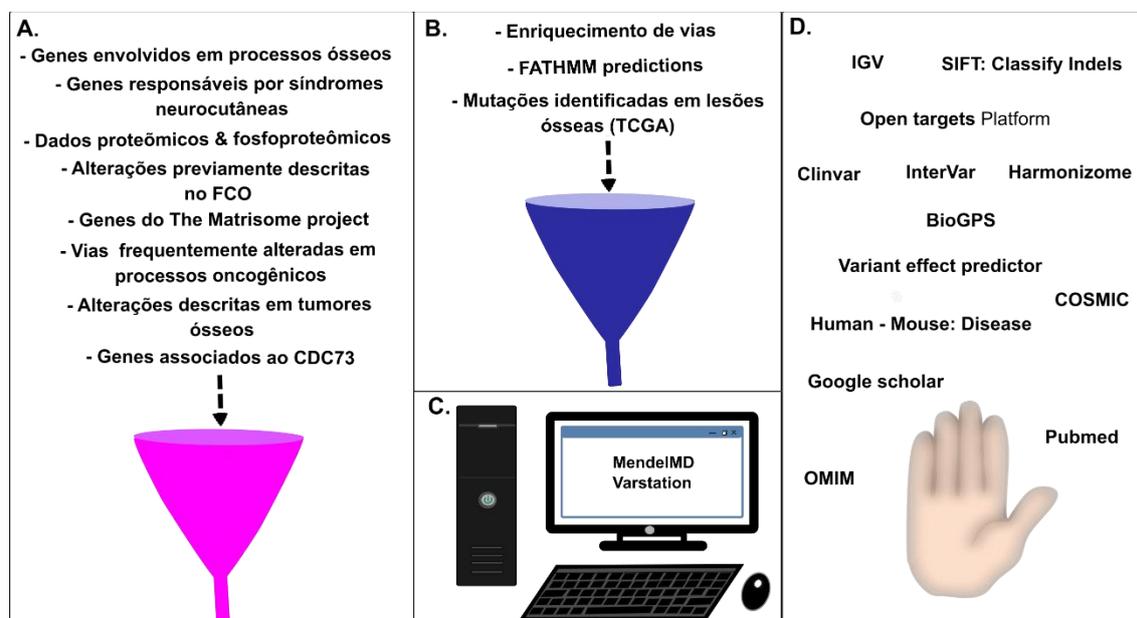


Figura 5. Resumo das estratégias utilizadas na avaliação dos resultados do sequenciamento completo do exoma para identificação de variantes possivelmente relevantes à patogênese do fibroma cemento-ossificante. **A.** Seleção das variantes com base em listas de genes construídas a partir de informações da literatura, bases de dados e resultados de outras análises ômicas. **B.** Seleção de variantes com base em ferramentas de bioinformática. **C.** Utilização de pipelines semiautomáticos gratuitos para triagem das variantes. **D.** Todas as variantes que ocorreram em pelo menos dois casos de fibroma cemento-ossificante ou que foram pré-selecionadas utilizando as diferentes estratégias de análise foram submetidas à inspeção manual no *Integrative Genome Viewer* (IGV) v.2.8.10 para remoção de falso-positivos e alterações potencialmente germinativas. Além disso, a interpretação dos resultados foi realizada com auxílio de informações da literatura, diversas bases de dados e de *softwares* de predição, conforme recomendações do guia publicado em 2017 pelo Colégio de Patologistas Americano, Sociedade Americana de Oncologia Clínica e Associação de Patologia Molecular (LI et al., 2017).

Quadro 2. Vias biológicas contidas no KEGG que foram utilizadas para seleção de potenciais *drivers* da patogênese do fibroma cemento-ossificante.

Nome da via biológica	Transdução de sinais		Código identificador da vida	
	Via de sinalização MAPK	hsa04010		
	Via de sinalização Ras	hsa04012		
	Via de sinalização WNT	hsa04310		
	Via de sinalização TGF- β	hsa04350		
	Via de sinalização FoxO	hsa04068		
	Via de sinalização PI3K-AKT	hsa04151		
	Via de sinalização mTOR	hsa04150		
	Via de sinalização AMPK	hsa04152		
	Via de sinalização Notch	hsa04330		
	Via de sinalização Hedgehog	Hsa04340		
	Via de sinalização cAMP	hsa04024		
	Via de sinalização Hippo	hsa04390		
	Sistema endócrino			
	Síntese, secreção e ação do hormônio da paratireoide	hsa04928		
	Síntese do hormônio da tireoide	hsa04918		
	Via de sinalização do hormônio da tireoide	hsa04919		
	Desenvolvimento e regeneração			
	Diferenciação osteoclástica	hsa04340		
	Doenças humanas			
	Vias em câncer	hsa05200		
	Comunidade celular – eucariotos			
	Adesão focal	hsa04510		
	Vias de sinalização regulando a pluripotência de células-tronco	hsa04550		
	Moléculas de sinalização e interação			
	Interação ECM-receptores	hsa04512		
	Motilidade Celular			

	Regulação do citoesqueleto de actina	hsa04810	
Crescimento e morte celular			
	Ciclo celular	hsa04110	

6.2.3. Avaliação da ocorrência de mutações no FCO em genes envolvidos na patogênese de síndromes neurocutâneas

A partir da ocorrência de FCO em associação a outras doenças pressupõe-se que possam existir alterações moleculares comuns entre elas (QURESHI *et al.*, 2021). Com isso, os genes envolvidos na patogênese das síndromes HPT-JT, Buschke-Ollendorff, lipomatose encefalocraniocutânea, síndrome de Delleman, retinoblastoma, complexo esclerose tuberosa e neurofibromatose tipo 1 (**Apêndice 3**) foram levantados com base em informações da literatura e OMIM e utilizados na filtragem dos dados do exoma do FCO. Duas deleções no gene *CDC73*, cujas mutações têm sido associadas à ocorrência de HPT-JT (CARPTEN *et al.*, 2002; CHEN, YAN *et al.*, 2016), foram identificadas simultaneamente na amostra FCO 5 (p.G416_V421delGTAISV e p.E24fs) (**Tabela 1**). Essas alterações já haviam sido previamente identificadas em amostras dessa paciente por sequenciamento do tipo Sanger (PIMENTA *et al.*, 2006; MESQUITA-NETTO *et al.*, 2013).

Mutações possivelmente somáticas foram observadas nos genes *FGFR1* (p.P26L, rs770617767) e *KRAS* (p.L19F, rs121913538). Alterações nesses genes já foram previamente implicadas na patogênese da síndrome lipomatose encefalocraniocutânea, porém as variantes identificadas no presente estudo nas amostras de FCO não foram descritas nessa síndrome.

6.2.4 Verificação da presença de alterações previamente descritas no FCO

A presença de alterações em alvos previamente descritos como potencialmente implicados na patogênese do FCO foi verificada nas amostras do presente estudo. Consistente com trabalhos anteriores, as variantes de *GNAS* (p.R201H, p.R201C, p.R201S, p.R201L e p.R201G) envolvidas na patogênese da DF não foram encontradas nas amostras de FCO (TOYOSAWA *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2013; TABAREAU-DELANDE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014). De modo similar, não foram observadas alterações

patogênicas em componentes da via WNT/ β -catenina em conformidade com um trabalho do nosso grupo baseado em painel de sequenciamento de nova geração (PEREIRA et al., 2018a). Por fim, também não foram detectadas variantes somáticas possivelmente patogênicas em integrantes da via de sinalização NOTCH ou nos genes *WWOX*, *MEN1*, *HILPDA*, *CALD1*, *MDM2*, *CDK4*, *PHF14*, *AIMP2*, *C1GALT1*, *MICALL2*.

6.2.5 Sequenciamento completo do exoma sugere potencial assinatura molecular do FCO

As diferentes estratégias de filtragem dos dados levaram à identificação de sete variantes potencialmente envolvidas na patogênese do FCO (**Tabela 1, Apêndice 4**). Nenhuma das alterações foi detectada nos tecidos normais (controles) e a minoria ocorreu simultaneamente em dois ou mais casos. As SNVs p.P26L em *FGFR1*, p.L19F em *KRAS*, p.G86R em *ITGBL1* e as deleções p.G416_V421delGTAISV e p.E24fs no *CDC73* foram identificadas em apenas uma amostra da doença. Já as variantes p.Q11delinsPQ em *RANBP9* e p.P347R em *ESX1* foram observadas em três e cinco amostras, respectivamente. Todas as variantes apresentaram frequência alélica entre 10% e 52% nos casos de FCO e MAF inferior a 1% no conjunto de populações do gnomAD (**Tabela 1 e 2**).

Tabela 1. Variantes potencialmente envolvidas na patogênese do fibroma cemento-ossificante.

Gene	rsID	Alteração proteica	Casos de FCO											Identificador COSMIC	Interpretação Intervar	MAF gnomAD (v2.1.1)	SIFT/ SIFT indels	PolyPhen-2	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11						
<i>RANBP9</i>	-	p.Q11delinsPQ													-	-	-	Danosa	-
<i>ITGBL1</i>	rs114011815	p.G86R													-	Significância incerta	0.0006082	Deletéria	Possiv. Patogênica
<i>FGFR1</i>	rs770617767	p.P26L													-	Significância incerta	0.00002	Desconhecida	Desconhecida
<i>ESX1</i>	rs200088361	p.P347R													COSM226884	Significância incerta	0.0008919	Tolerável	Possiv. Patogênica
<i>KRAS</i>	rs121913538	p.L19F													COSM20818	Possiv. Patogênica	0	Deletéria	Possiv. Patogênica
<i>CDC73</i>	-	p.E24Kfs*2													COSM1235385	-	-	Danosa	-
<i>CDC73</i>	-	p.G416_V421delGTAISV													COSM1235386	-	-	-	-

Localização da Lesão												
Mandíbula												
Maxila												
Sexo do(a) paciente												
Masculino												
Feminino												
Idade do(a) paciente												
<20 anos												
20-40 anos												
>40 anos												
Tipo de amostra controle												
Mucosa adj.												
Raspado bucal												

Variantes potencialmente somáticas com possível relevância para o desenvolvimento e/ou progressão do fibroma cemento-ossificante identificadas utilizando diferentes estratégias de filtragem dos dados. São apresentados nessa tabela os aspectos clínicos das amostras de fibroma cemento-ossificante. Nenhuma das variantes selecionadas foram detectadas nas amostras de mucosa oral adjacente. Siglas e abreviações: Interp: interpretação; Possiv: possivelmente; SIFT:

Sorting Intolerant From Tolerant, MAF: *Minor Allele Frequency*, COSMIC: *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*, rsID: *reference SNP ID number*, gnomAD: *genome aggregation database*; Polyphen-2: *Polymorphism Phenotyping v2*.

Tabela 2. Frequência alélica das variantes nas amostras em que foram detectadas.

Gene	Alteração proteica	Casos de FCO										
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
RANBP9	p.Q11delinsPQ	-	-	38%	32%	35%	-	-	-	-	-	-
ITGBL1	p.G86R	-	-	-	-	46%	-	-	-	-	-	-
FGFR1	p.P26L	-	45%	-	-	-	-	-	-	-	-	-
KRAS	p.L19F	-	-	-	-	-	-	-	28%	-	-	-
ESX1	p.P347R	-	10%	11%	-	-	-	45%	-	21%	52%	14%
CDC73	p.E24Kfs*2	-	-	-	-	46%	-	-	-	-	-	-
CDC73	p.G416_V421delGTAISV	-	-	-	-	26%	-	-	-	-	-	-

6.3 Avaliação da ativação da via MAPK no FCO por imuno-histoquímica

Tendo em vista que o FCO ocorre em associação com diversas síndromes e doenças que apresentam alterações em genes da cascata MAPK, como a neurofibromatose tipo 1, lipomatose encefalocraniocutânea e lesão central de células gigantes (BENNET *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018; JENDI *et al.*, 2018), e a demonstração em modelos celulares dessa neoplasia que essa via de sinalização está ativada (HATANO *et al.*, 2011), realizamos uma análise imuno-histoquímica da expressão de fosfo-Erk1/2 para avaliar a ativação dessa via em tecidos desse tumor.

A avaliação das lâminas revelou positividade moderada a intensa no citoplasma e núcleo das células que se assemelham a fibroblastos dos casos estudados (**Figura 6**). Uma marcação em menor proporção foi observada em osteoblastos circundando trabéculas e osteócitos. Seis casos apresentaram intensa expressão imuno-histoquímica de fosfo-Erk1/2, já dois casos apresentaram expressão moderada ou mista (**Quadro 3**).

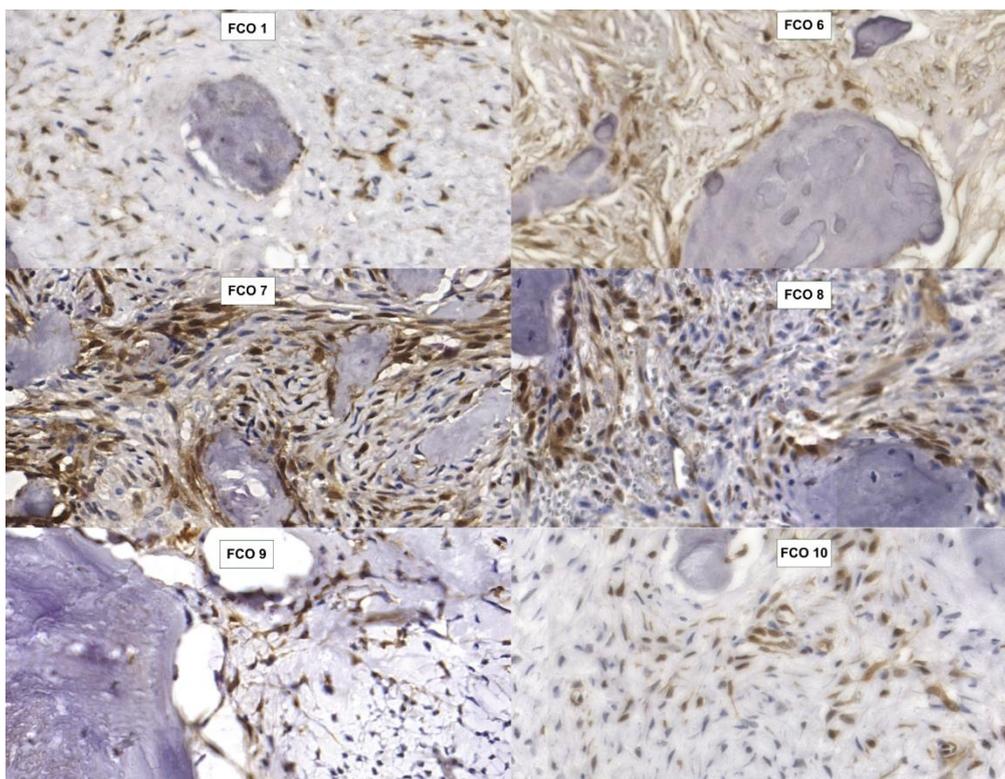


Figura 6. Alterações em componentes da via de sinalização MAP quinase podem ser responsáveis por parte dos casos de fibroma cemento-ossificante. Análise da expressão imuno-histoquímica de fosfo-Erk1/2 (fosfo-p42/44) em amostras de fibroma cemento-ossificante. Aumento de 40x.

Quadro 3. Análise do perfil de expressão de fosfoERK1/2 em amostras de fibroma cemento-ossificante por imuno-histoquímica

Amostra	Nível de intensidade
FCO 1	+++
FCO 4	+++
FCO 5	+++
FCO 6	+++
FCO 7	+++
FCO 8	+ / +++
FCO 9	+++
FCO 10	++

+ : baixa intensidade de marcação; ++ : intensidade de marcação moderada; +++: alta intensidade de marcação

6.4 Análises proteômicas no estudo da fisiopatologia do FCO

6.4.1 Análises proteômica e fosfoproteômica quantitativas

As análises proteômicas e fosfoproteômicas quantitativas foram realizadas comparando amostras de tecidos parafinizado de FCO (n = 3) e DF (n = 3), com o objetivo de auxiliar no entendimento da patogênese dessas doenças e apontar potenciais marcadores para o diagnóstico diferencial. O grupo de amostras da DF era constituído por tecidos parafinizados de lesões maxilares obtidos de duas pacientes do sexo feminino e de um homem, com idade média de 18,6 anos (Quadro 3). O conjunto de amostras do FCO apresentou a mesma distribuição em relação ao gênero dos voluntários, mas todas as lesões ocorreram na região mandibular e a idade média dos indivíduos era 34,33 anos (Quadro 3).

Quadro 4. Dados clínicos dos pacientes incluídos na análise do fosfoproteoma e proteoma total

	Código da Amostra	Idade	Localização da lesão	Gênero	Tag isobárica
Displasia fibrosa	DF 1	23	Maxila	Masculino	127C
	DF 2	10	Maxila	Feminino	128N
	DF 3	23	Maxila	Feminino	128C
Fibroma cemento ossificante	FCO 1	29	Mandíbula	Feminino	129N
	FCO 6	58	Mandíbula	Feminino	129C
	FCO 10	16	Mandíbula	Masculino	130N

6.4.1.1 Avaliação preliminar da qualidade dos experimentos de proteômica e fosfoproteômica quantitativas

Com o intuito de assegurar a confiabilidade e reprodutibilidade dos dados gerados, diversas avaliações da qualidade foram aplicadas durante etapas cruciais do preparo de amostras. Considerando que as análises proteômicas do

tipo *bottom up* são baseadas na análise de peptídeos proteolíticos (MERTINS *et al.*, 2018), uma digestão adequada da amostra é essencial para o sucesso desses experimentos. Portanto, previamente à aquisição dos perfis proteômicos, a eficiência da digestão proteolítica foi analisada utilizando um espectrômetro de massas do tipo MALDI-ToF/ToF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*), modelo Autoflex III Smartbeam, Bruker Daltonics. Com essa finalidade, aplicou-se uma pequena fração de cada amostra sobre os poços de uma placa de MALDI, recobrando-as com 1 μL de matriz contendo ácido- α -ciano-4-hidroxicinâmico e após a secagem à temperatura ambiente, os espectros foram analisados no equipamento. Neste experimento, é possível constatar a presença de peptídeos de massas variáveis, incluindo aqueles passíveis de identificação pelo Orbitrap nas faixas usualmente empregadas por estudos proteômicos e fosfoproteômicos (350 a 1.600 m/z) (**Figura 7**). Este resultado sugere que o processo de tripsinização foi conduzido de forma apropriada.

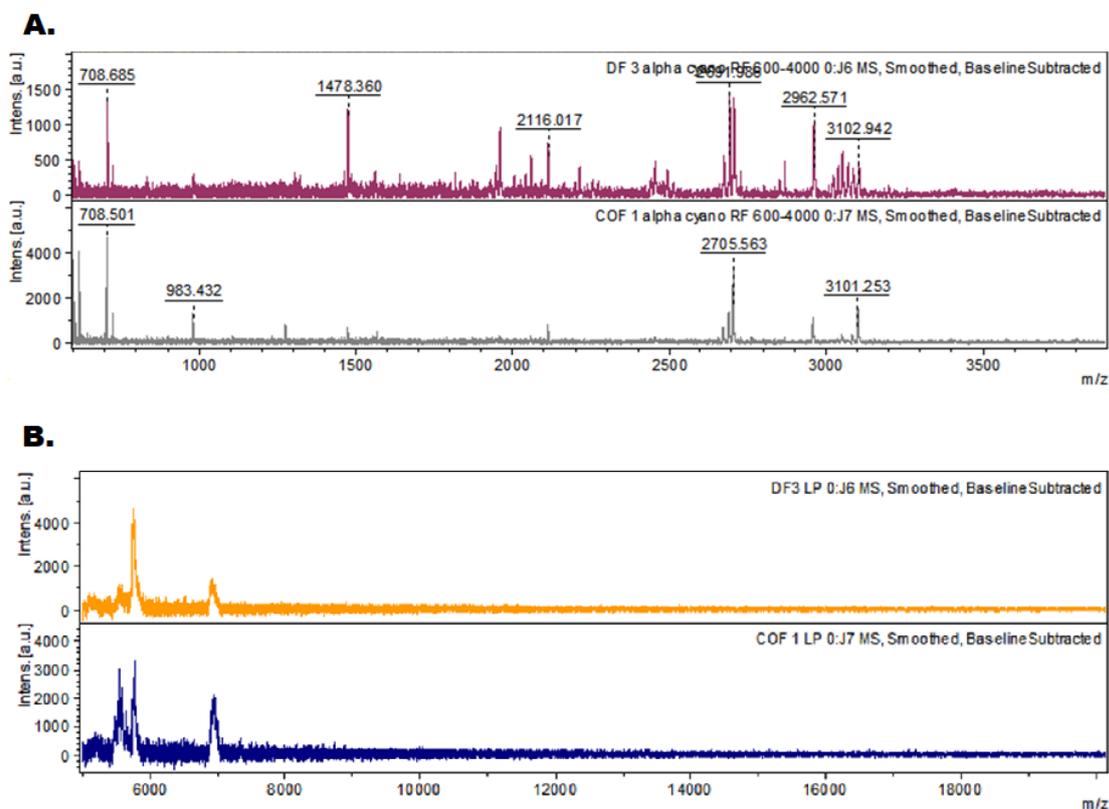


Figura 7. Avaliação preliminar da qualidade dos extratos proteicos após a digestão utilizando tripsina e dessalinização com cartuchos Sep-Pack C18. Espectros de massas representativos das amostras DF 3 e FCO 1 nos m/z compreendidos entre (A) 500 a 4.000 e (B) 6.500 a 19.000

Nas análises proteômicas quantitativas baseadas na utilização de *tags* isobáricas, a precisão da quantificação depende de uma marcação apropriada dos peptídeos na sua porção N-terminal e lisina (MERTINS et al., 2018). Desse modo, a eficiência da marcação representa um passo crítico nesse tipo de experimento. Diante do exposto, após as amostras serem marcadas com as diferentes *tags* do kit *TMT10plex*TM, elas foram combinadas em proporção igual em um único *pool*, que foi analisado utilizando um MALDI-ToF/ToF conforme descrito previamente. O espectro de massas obtido revelou que houve marcação das amostras com os reagentes utilizados (**Figura 8**).

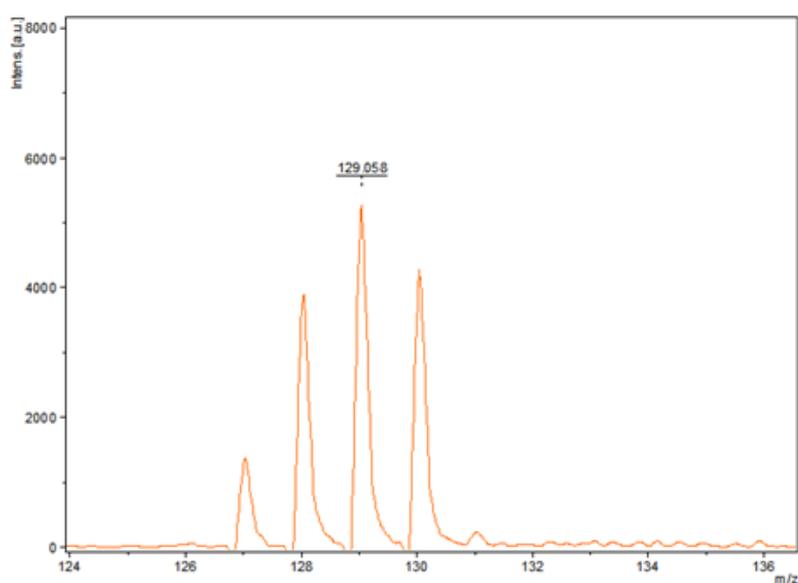


Figura 8. Avaliação preliminar da marcação do *pool* de amostras de displasia fibrosa e fibroma cemento-ossificante com as *tags* 127C, 128N, 128C, 129N, 129C e 130N do kit *TMT10plex*.

6.4.1.2 Visão geral dos resultados proteômicos após o pré-processamento dos dados

Na análise do proteoma total, após o pré-processamento dos dados com o intuito de remover potenciais contaminantes, selecionar as proteínas contendo pelo menos dois peptídeos proteotípicos e apresentando no mínimo dois valores válidos de intensidade em cada um dos grupos, foram mantidas 570 proteínas para as avaliações subsequentes.

A análise de ontologia gênica (GO) de componente celular utilizando o módulo *Slim* do sistema de classificação *Panther* demonstrou que esse conjunto de dados proteômicos contém proteínas intracelulares e extracelulares (**Figura**

9-A). Além disso, realizamos uma avaliação de ontologia de tipo tecidual (Jensen tissues) no *EnrichR* para avaliar a natureza biológica das proteínas identificadas. Observou-se que a maioria das biomoléculas são caracterizadas como ósseas, atestando que o procedimento de extração favoreceu o enriquecimento de moléculas possivelmente representativas da natureza fibro-óssea das lesões (**Figura 9-B**). Em relação à classificação dessas moléculas quanto à classe proteica, a classe mais frequente é de enzimas de interconversão de metabólitos (22%), seguido por biomoléculas implicadas na tradução proteica (14,6%), enzimas modificadoras de proteínas (10,1%), proteínas de citoesqueleto (7,9%) e outras categorias em menor proporção (**Figura 9-C**).

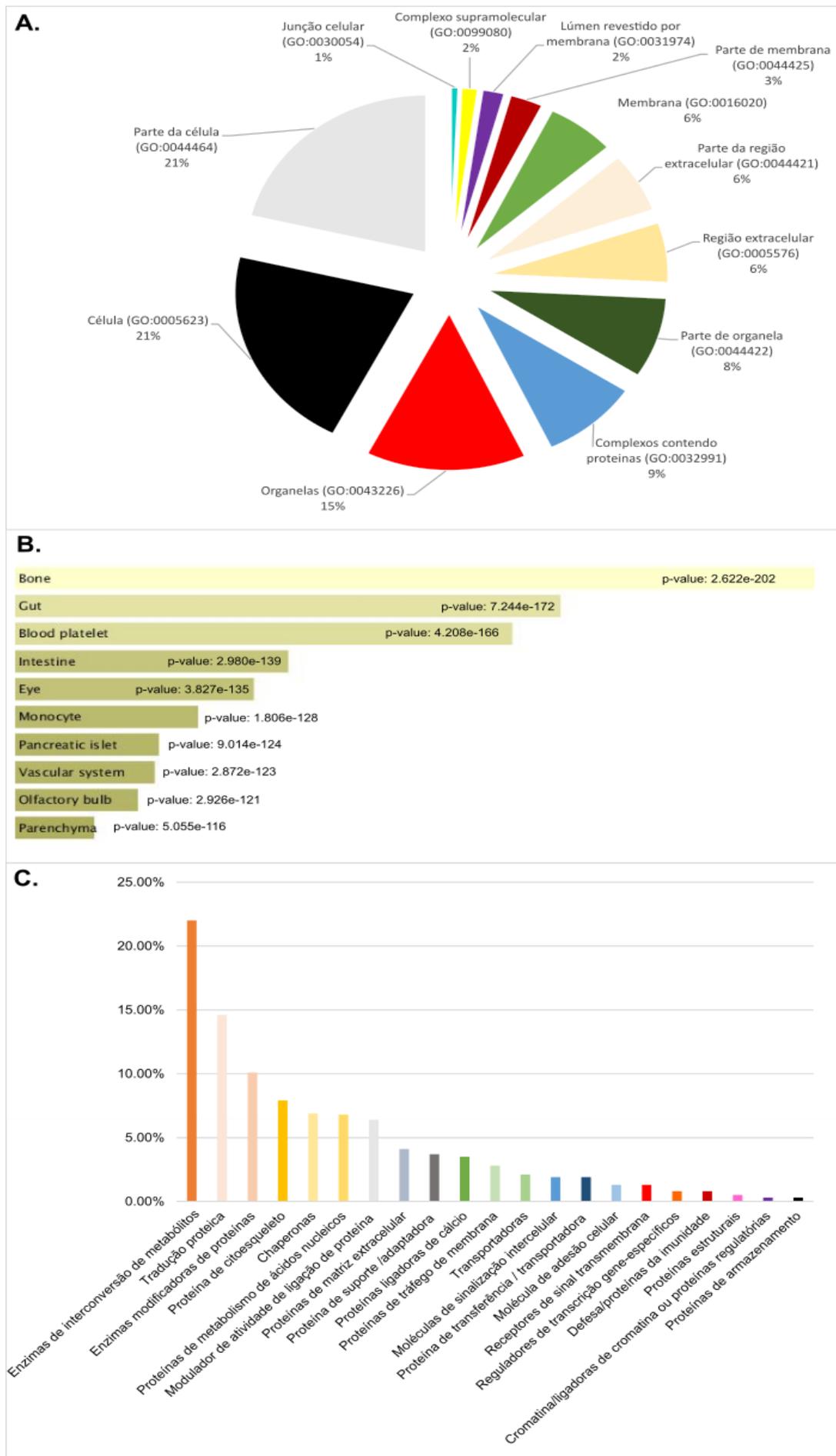


Figura 9. Análise de ontologia gênica (GO) realizadas no módulo *Slim* do Panther e no módulo *Jensen tissues* do *EnrichR* com as proteínas identificadas no proteoma total após o pré-processamento dos dados. A. Análise de GO de componente celular e B. tipo tecidual e C. classe proteica.

A análise do fosfoproteoma de amostras de FCO e DF possibilitou a detecção de 69 sítios fosforilados em 40 proteínas. Dentre eles, 19 fosfopeptídeos puderam ser normalizados pelos níveis de suas respectivas proteínas, tendo vista que também foram identificados no proteoma total.

6.4.1.3 FCO e DF apresentam diferenças nos níveis de diversas proteínas e na regulação de vias biológicas

Tendo como objetivo determinar se o FCO e a DF apresentam diferenças em seus perfis proteicos, construímos um *heatmap* com análise conjunta de agrupamento hierárquico, utilizando todas as proteínas que foram mantidas após o pré-processamento. Na análise da figura (**Figura 10**), é evidente, que no geral, existe uma predisposição das amostras de se agregarem por tipo de lesão. Essa tendência apenas não foi observada na amostra FCO 2. Ainda que um agrupamento completo em diferentes classes não tenha sido obtido, diversas consistências nos níveis das biomoléculas podem ser observadas entre os casos de cada doença, o que reforça a possibilidade de aplicação desses achados na determinação de potenciais biomarcadores. Em acordo com essa demonstração, ao aplicarmos o teste estatístico Limma, considerando como limiar de significância o valor $p \leq 0,05$ e $\log_2 \text{fold change} \leq -0,58$ ou $\geq 0,58$, foram detectadas alterações significativas nos níveis de 51 proteínas, cujos valores de $\log_2 \text{fold change}$ variaram de -2,18 a 1,76 (**Tabela 3 e Figura 11**).

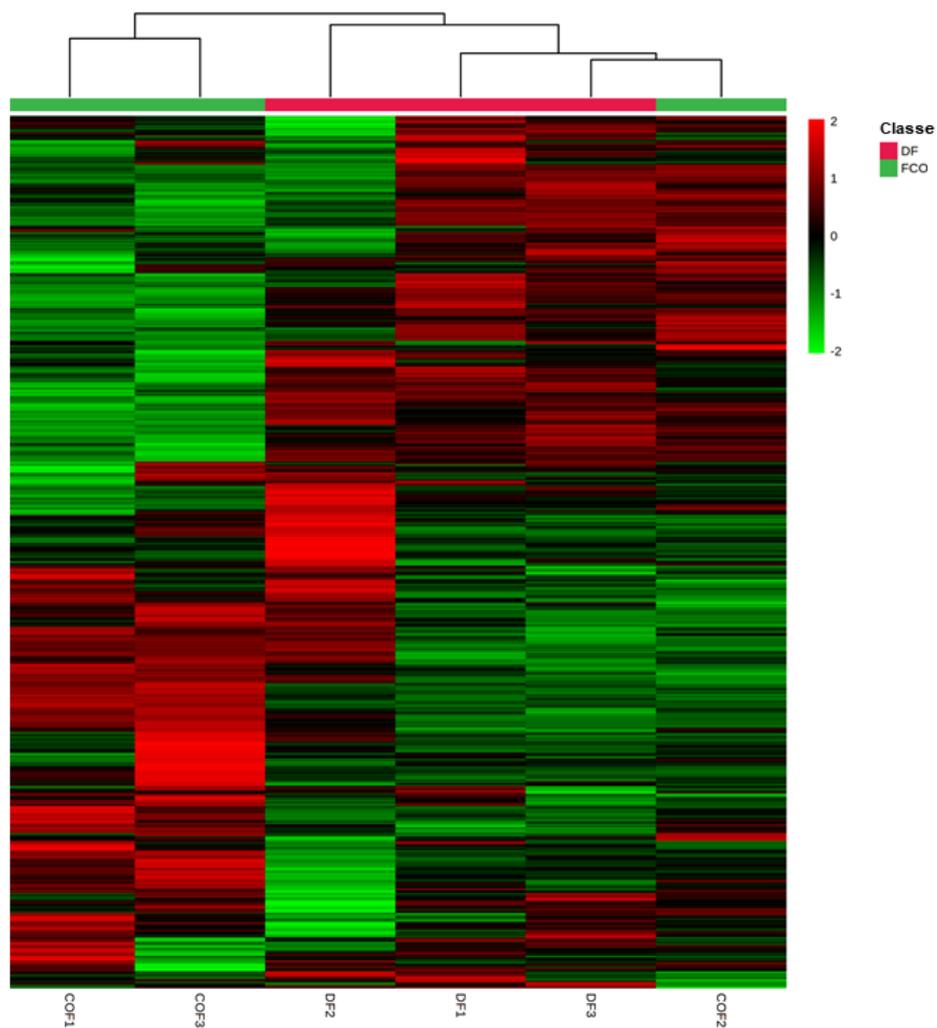


Figura 10. *Heatmap* obtido utilizando as intensidades normalizadas de todas as proteínas mantidas após o pré-processamento dos dados. As cores nesse gráfico são representativas da abundância de cada proteína nas diferentes amostras, sendo que os tons de vermelho indicam níveis maiores, enquanto as tonalidades de verde refletem quantidades menores. Para avaliação da relação do perfil proteômico do fibroma cemento-ossificante (FCO) com a displasia fibrosa (DF), foi construído um dendrograma na parte superior do *heatmap*, empregando como parâmetros a medida de distância euclidiana e agrupamento pelo método completo.

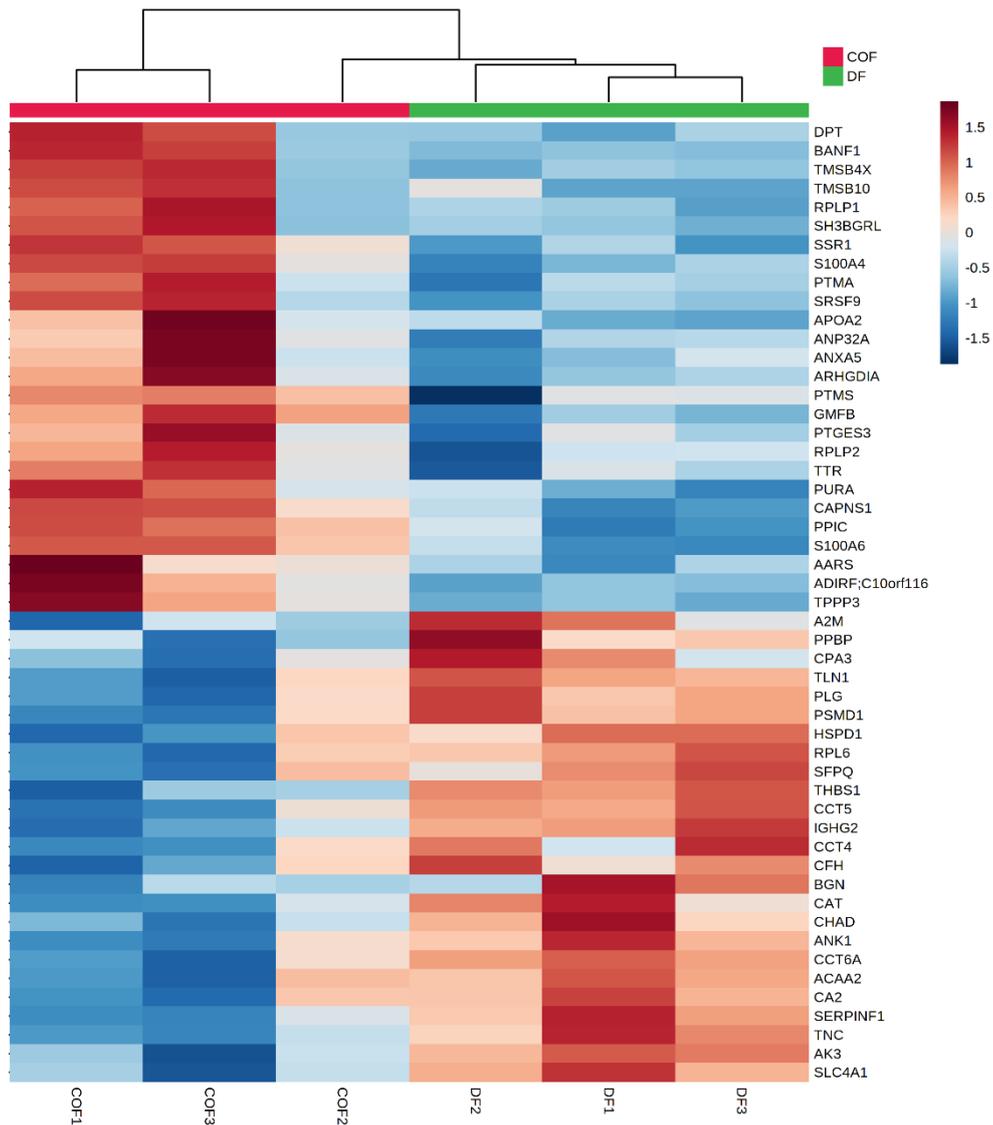


Figura 11. Heatmap construído com as proteínas com níveis significativamente alterados entre o fibroma cemento-ossificante e a displasia fibrosa. No gráfico, as tonalidades de vermelho indicam níveis aumentados, enquanto os tons de azul indicam abundância diminuída. Para construção do dendrograma no topo do gráfico, aplicou-se a medida de distância euclidiana e agrupamento pelo método completo.

Para entender o papel biológico das proteínas na patogênese dessas doenças, análises de enriquecimento de vias e processos biológicos foram realizadas. Nessa avaliação, com o intuito de facilitar a identificação dos processos que possivelmente estariam aumentados em cada doença, utilizou-se como *input* (entrada) no programa de enriquecimento, aquelas biomoléculas que apresentaram níveis elevados em uma lesão quando comparada com a outra. Apesar da abundância maior de 26 proteínas no FCO, nenhuma via significativamente aumentada foi encontrada nessa lesão. Por outro lado, a

investigação empregando as proteínas com níveis significativamente maiores em DF revelou inúmeras vias possivelmente regulados positivamente nessa doença (**Tabela 4 e Apêndice 5**). Entre as dez vias mais significativamente enriquecidas na DF (**Tabela 4**), é possível verificar uma alta representatividade daquelas implicadas em atividades eritrocitárias e plaquetárias, dobramento de proteínas e organização da matriz extracelular. De modo igual, na avaliação criteriosa de todas as vias enriquecidas nessa doença, observamos que essas se mantêm como as mais representativas (**Figura 12-A**). Diante desses achados, realizamos uma revisão criteriosa dos dados, na qual verificamos que dentre as 51 proteínas com níveis significativamente alterados entre as lesões, 12 são proteínas do cerne ou relacionadas à matriz extracelular (**Figura 12-B**).

Já na avaliação de processos biológicos, o FCO enriqueceu processos relacionados ao controle da produção de filamentos de actina, expressão gênica, processos biossintéticos, transporte nuclear e mecanismos envolvidos no transporte de proteínas (**Apêndice 6, Quadro A**). As proteínas aumentadas em DF enriqueceram inúmeros processos, entre os quais aqueles relacionados à função e organização da matriz extracelular (**Apêndice 6, Quadro B**).

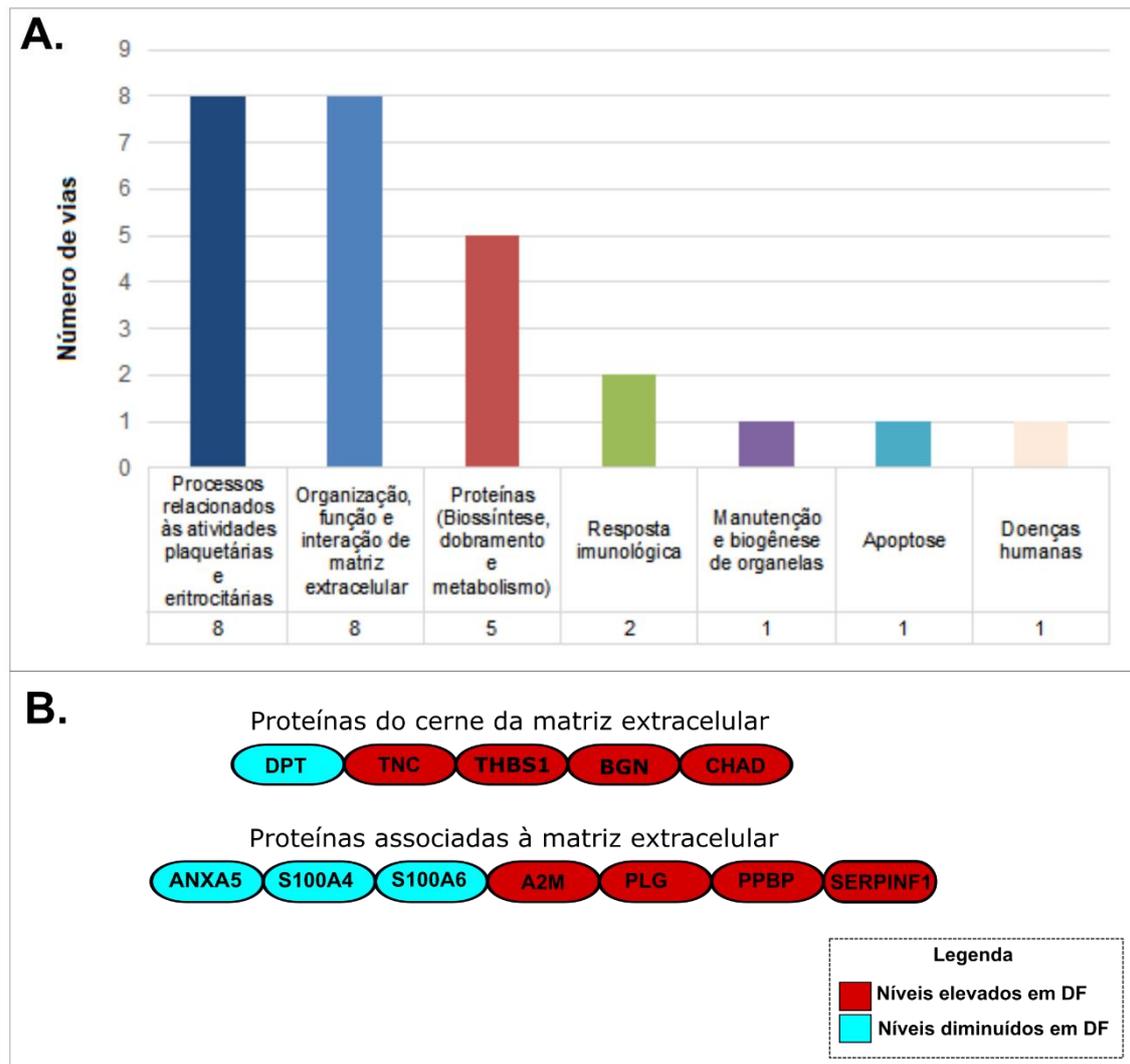


Figura 12. Análise de enriquecimento de vias revela vias biológicas potencialmente elevadas na displasia fibrosa em comparação ao fibroma cemento-ossificante. A. Agrupamento das vias em classes de processos biológicos. **B.** Relação de proteínas do cerne ou relacionadas à matriz extracelular com diferenças significativas de intensidade entre as doenças. A classificação das proteínas de matriz foi avaliada na base de dados “*The Matrisome Project*”, <http://matrisomeproject.mit.edu/>.

Tabela 3. Proteínas identificadas que apresentaram níveis significativamente alterados entre fibroma cemento-ossificante e displasia fibrosa.

Nome da proteína	Nome do gene	Valor p	Log ₂ FoldChange
<i>Alpha-2-macroglobulin</i>	A2M	0.032	-0.779
<i>Alanine--tRNA ligase, cytoplasmic</i>	AARS	0.041	0.864
<i>3-ketoacyl-CoA thiolase, mitochondrial</i>	ACAA2	0.048	-0.734
<i>Adipogenesis regulatory factor</i>	ADIRF; C10orf116	0.016	1.052
<i>GTP:AMP phosphotransferase AK3, mitochondrial</i>	AK3	0.027	-0.679
<i>Ankyrin-1</i>	ANK1	0.021	-0.936
<i>Acidic leucine-rich nuclear phosphoprotein 32 family member A</i>	ANP32A	0.049	0.763
<i>Annexin A5</i>	ANXA5	0.049	0.854
<i>Apolipoprotein A-II</i>	APOA2	0.020	1.607
<i>Rho GDP-dissociation inhibitor 1</i>	ARHGDI1	0.048	0.651
<i>Barrier-to-autointegration factor</i>	BANF1	0.023	1.533
<i>Biglycan</i>	BGN	0.045	-0.783
<i>Carbonic anhydrase 2</i>	CA2	0.018	-1.524
<i>Calpain small subunit 1</i>	CAPNS1	0.007	1.024
<i>Catalase</i>	CAT	0.041	-0.616
<i>T-complex protein 1 subunit delta</i>	CCT4	0.048	-0.774
<i>T-complex protein 1 subunit epsilon</i>	CCT5	0.010	-0.995
<i>T-complex protein 1 subunit zeta</i>	CCT6A	0.039	-0.628
<i>Complement factor H</i>	CFH	0.025	-1.064
<i>Chondroadherin</i>	CHAD	0.004	-2.176
<i>Mast cell carboxypeptidase A</i>	CPA3	0.022	-1.403
<i>Dermatopontin</i>	DPT	0.034	1.161
<i>Glia maturation factor beta</i>	GMFB	0.022	0.653
<i>60 kDa heat shock protein, mitochondrial</i>	HSPD1	0.045	-0.749
<i>Immunoglobulin heavy constant gamma 2</i>	IGHG2	0.004	-1.164
<i>Plasminogen</i>	PLG	0.021	-0.910
<i>Platelet basic protein</i>	PPBP	0.019	-1.068
<i>Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase C</i>	PPIC	0.027	0.641
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 1</i>	PSMD1	0.018	-0.971
<i>Prostaglandin E synthase 3</i>	PTGES3	0.038	1.016
<i>Prothymosin alpha</i>	PTMA	0.012	1.763
<i>Parathymosin</i>	PTMS	0.037	0.867
<i>Transcriptional activator protein Pur-alpha</i>	PURA	0.049	0.612
<i>60S ribosomal protein L6</i>	RPL6	0.019	-1.134
<i>60S acidic ribosomal protein P1</i>	RPLP1	0.040	1.316
<i>60S acidic ribosomal protein P2</i>	RPLP2	0.044	0.821
<i>Protein S100-A4</i>	S100A4	0.013	0.894
<i>Protein S100-A6</i>	S100A6	0.008	0.869

Nome da proteína	Nome do gene	Valor p	Log ₂ FoldChange
<i>Pigment epithelium-derived factor</i>	SERPINF1	0.019	-0.774
<i>Splicing factor, proline- and glutamine-rich</i>	SFPQ	0.047	-0.898
<i>SH3 domain-binding glutamic acid-rich-like protein</i>	SH3BGRL	0.044	1.074
<i>Band 3 anion transport protein</i>	SLC4A1	0.004	-1.687
<i>Serine/arginine-rich splicing factor 9</i>	SRSF9	0.031	0.858
<i>Translocon-associated protein subunit alpha</i>	SSR1	0.013	0.841
<i>Thrombospondin-1</i>	THBS1	0.010	-0.812
<i>Talin-1</i>	TLN1	0.019	-0.970
<i>Thymosin beta-10</i>	TMSB10	0.046	1.702
<i>Thymosin beta-4</i>	TMSB4X	0.037	1.072
<i>Tenascin</i>	TNC	0.006	-1.085
<i>Tubulin polymerization-promoting protein family member 3</i>	TPPP3	0.016	0.938
<i>Transthyretin</i>	TTR	0.034	0.833

O *fold change* foi calculado a partir dos valores transformados em log₂ e a média do grupo FCO (fibroma cemento-ossificante) foi utilizada como referência nessa avaliação. O cálculo foi realizado subtraindo a média das amostras de FCO pela média da DF (displasia fibrosa).

Tabela 4 - Lista das dez vias mais significativamente enriquecidas utilizando as proteínas mais abundantes na displasia fibrosa

Via biológica	Valor p	Valor de FDR
Associação de TriC / CCT com proteínas-alvo durante a biossíntese	7.37x10 ⁻⁰⁷	3.85x10 ⁻⁰⁴
Resposta ao Ca ²⁺ citosólico plaquetário elevado	3.51x10 ⁻⁰⁶	6.11x10 ⁻⁰⁴
Degranulação de plaquetas	2.88x10 ⁻⁰⁶	7.51x10 ⁻⁰⁴
Eventos de sinalização mediados por sindecano-4	2.96x10 ⁻⁰⁵	3.87x10 ⁻⁰³
Ativação, sinalização e agregação de plaquetas	9.59x10 ⁻⁰⁵	6.26x10 ⁻⁰³
Dobramento de proteínas mediado por chaperonina	7.27x10 ⁻⁰⁵	6.33x10 ⁻⁰³
Dobramento de proteína	7.27x10 ⁻⁰⁵	6.33x10 ⁻⁰³
Cooperação de PDCL (PhLP1) e TRiC/CCT no dobramento beta de proteína G	6.77x10 ⁻⁰⁵	7.07x10 ⁻⁰³
Eritrócitos captam oxigênio e liberam dióxido de carbono	1.26x10 ⁻⁰⁴	7.29x10 ⁻⁰³
Organização de matriz extracelular	1.55x10 ⁻⁰⁴	8.11x10 ⁻⁰³

FDR: *false discovery rate*

6.4.1.4 Verificação se as alterações genômicas do FCO são refletidas no seu perfil proteômico

Alterações genéticas promovem diversas modificações em nível de proteínas, como variações na atividade dessas biomoléculas, nível de produção, ocorrência de modificações pós-traducionais, entre outros aspectos (LI *et al.*, 2017). Baseado em uma descrição recente de que variações no número de

cópias são frequentes no FCO, em particular envolvendo os cromossomos 7 e 12 (MA *et al.*, 2021), analisamos os resultados dos dados proteômicos para verificar se algum efeito é observado em nível proteômico. Interessantemente, a grande parte das proteínas com variações significativas de intensidade entre FCO e DF no nosso estudo são codificadas por genes localizados nos cromossomos 1, 2 e 12 e 17 (**Figura 13**). Ao repetir essa análise apenas com as proteínas significativamente mais abundantes no FCO, verifica-se que novamente um número maior de proteínas codificadas por genes situados nos cromossomos 1 e 12 (**Apêndice 7**).

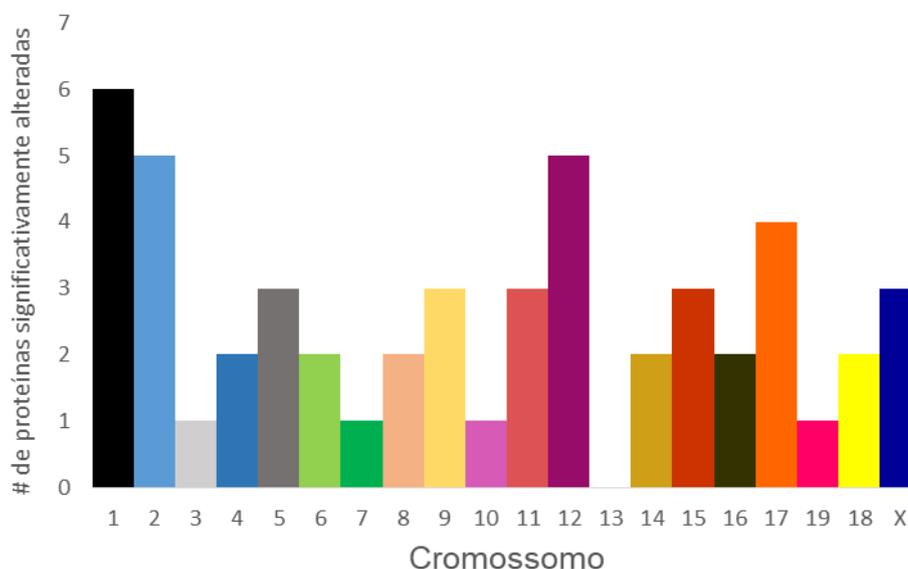


Figura 13. Avaliação para verificar se potenciais alterações genômicas do fibroma cemento-ossificante são refletidas no seu perfil proteômico.

6.4.1.5 FCO apresenta níveis maiores da fosforilação do sítio ser61 da proteína YAP1

Em contraste à análise do proteoma total, a avaliação estatística dos dados do fosfoproteoma identificou alterações significativas ($p < 0,05$ e \log_2 fold change apresentando valores $\leq -0,58$ ou $\geq 0,58$) apenas nos níveis de fosforilação do sítio ser61 da proteína YAP1 (*Yes1 Associated Transcriptional Regulator*), que se apresentaram maiores no FCO. Para esclarecer o papel biológico dessa modificação pós-traducional, a base de dados *PhosphoSitePlus®* foi consultada e revelou que essa fosforilação possivelmente possui efeitos inibitórios na atividade da proteína e contribui para sua localização intracelular. No que diz respeito a potenciais efeitos em processos biológicos, a

fosforilação desse sítio parece ter implicações na apoptose, crescimento celular, motilidade celular e organização do citoesqueleto e transcrição.

Apesar desse resultado limitado, outras variações consistentes nos níveis de fosforilação de outros sítios de proteínas diferentes foram observadas, porém sem significância estatística, incluindo os sítios Ser304 e Ser307 em RPLP0, Thr150 em MARCKS e Ser58 e Ser61 em NUCKS1 (**Figura 14**). Contudo, o papel biológico dessas fosforilações nas suas respectivas proteínas e em diferentes tipos processos biológicos ainda não é claro. Consistente com essas observações, é possível constatar que o perfil geral fosfoproteômico de ambas as lesões é muito similar (**Apêndice 8**).

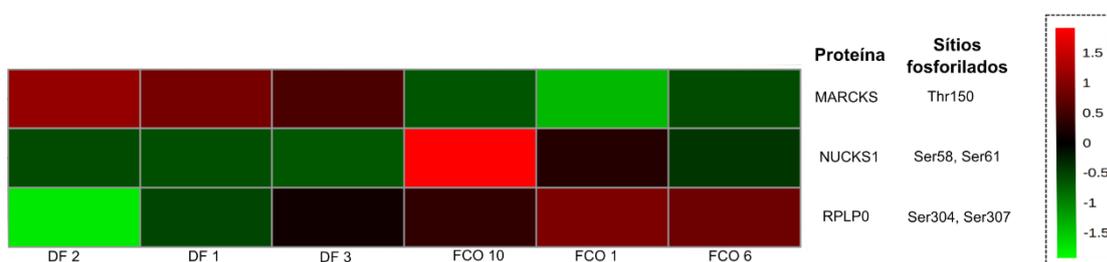


Figura 14. Heatmap demonstrando alterações consistentes no nível de fosforilação de diferentes proteínas entre os grupos, mas que não apresentaram significância estatística.

Abreviaturas: Thr: treonina; Ser: Serina

7 DISCUSSÃO

O FCO é um tumor cuja etiologia ainda não foi determinada, apesar de diversos pesquisadores sugerirem que a lesão deriva de componentes do ligamento periodontal (EL-MOFTY, 2014). Ainda que outros tipos celulares sejam potenciais precursores dessa lesão, é evidente que há um desequilíbrio entre osteogênese e proliferação celular (HATANO *et al.*, 2011). Nesse contexto, a contribuição do estudo molecular dessa doença não está limitada ao entendimento da sua patogênese, mas também favorece a compreensão dos eventos que impactam na diferenciação osteoblástica. Em conjunto, esses aspectos reforçam a necessidade de aprofundamento do entendimento da patogênese desse tumor, o que motivou este trabalho a investigar seus aspectos genéticos e sinalização molecular.

O sequenciamento completo de exoma permitiu identificar sete variantes potenciais em seis genes exclusivamente em amostras do tumor. Dentre as

alterações identificadas, aquelas detectadas nos genes *KRAS* (p.L19F) e *CDC73* (p.E24Kfs*2 e p.G416_V421delGTAISV) são classificadas como variantes com forte significância clínica conforme o guia publicado em 2017 pelo Colégio de Patologistas Americano, Sociedade Americana de Oncologia Clínica e Associação de Patologia Molecular (LI *et al.*, 2017). Já as demais alterações observadas são categorizadas como variantes sem significado clínico claro conforme o mesmo manual (LI *et al.*, 2017). Apesar da potencial implicação dessas variantes na patogênese do FCO, a maioria foi observada em no máximo três casos da doença, sugerindo que outros mecanismos moleculares são mais relevantes para desenvolvimento da lesão, de modo que representam alterações passageiras ou ainda que exista heterogeneidade no que diz respeito aos seus processos desencadeadores.

A descoberta recente de que cerca de 45% dos casos de FCO apresentam CNAs, em particular afetando os cromossomos 7 e 12 (MA *et al.*, 2021), favorece a hipótese de que patogênese molecular dessa doença envolve alterações mais complexas do que mutações pontuais ou de pequenas dimensões. Curiosamente, uma parte grande dos tumores de natureza óssea decorre de alterações de caráter estrutural, como translocações e alterações de número de cópias (LAM *et al.*, 2019), enquanto que uma outra parcela é explicada por eventos genéticos complexos, como a cromotripsia, em especial afetando as lesões malignas (STEPHENS *et al.*, 2011; LAM *et al.*, 2019; CORTÉS-CIRIANO *et al.*, 2020; FRANCESCHIN *et al.*, 2020). Outro argumento que ampara essa possibilidade é que os dados foram reanalisados periodicamente, até a data de redação final deste trabalho, utilizando diferentes tipos de abordagens manuais, automáticas e semiautomáticas, para minimizar a chance de ocorrência de erros humanos ou do emprego de informações desatualizadas de bibliotecas de dados genômicos na interpretação das variantes detectadas.

No presente estudo, a remoção completa de todas as variantes potencialmente germinativas não foi possível, tendo em vista que não foi possível a coleta de contraparte normal de todos os pacientes de FCO. Dessa forma, a análise dos dados permitiu verificar que grande parte das variantes apresentou frequência alélica próxima de 50% nos casos da doença, que é um forte indício de que não são somáticas (LI *et al.*, 2017). Contudo, novos ensaios são

necessários para confirmar que essas alterações não são relevantes para patogênese dessa doença, tendo em vista que diversos aspectos ainda são obscuros. A observação prévia de alterações germinativas patogênicas no FCO, a ocorrência simultânea com doenças que decorrem desse tipo de mutação, além da descrição eventual de casos familiares (YIH *et al.*, 1989; CANGER *et al.*, 2004) e/ou afetando múltiplos sítios (WANG *et al.*, 2014) não permitem excluir a possibilidade de que esses tipos de mutações possam ser importantes em pelo menos uma parcela dos casos. De modo interessante, o Dr. Baumhoer e o seu grupo de colaboradores (2021) reportaram uma série de variantes sem significado clínico claro em três lesões (3/4, 75%) com frequência alélica similar às identificadas no presente estudo. Contudo, por não estarem localizadas próximas às raízes dos dentes, as lesões avaliadas em seu trabalho, apesar de serem fenotipicamente similares ao FCO, não podem ser classificadas como tal de acordo com a “Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial de Saúde: tumores odontogênicos e dos ossos maxilofaciais” publicada no ano de 2017 (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; BAUMHOER *et al.*, 2021). Por fim, Ma e colaboradores (2021) demonstraram que tanto a porção mineralizada e não-mineralizada desses tumores apresentam as mesmas características genéticas, o que pode indicar homogeneidade tumoral.

Em conformidade com investigações prévias, os nossos dados apontam que alterações pontuais em *GNAS1* (TOYOSAWA *et al.*, 2007; LIANG *et al.*, 2011; SHI *et al.*, 2013; TABAREAU-DELALANDE *et al.*, 2013; WANG *et al.*, 2014), em componentes da cascata de sinalização WNT/ β -catenina (PEREIRA *et al.*, 2018a), bem como em outros genes supressores e oncogenes que são frequentemente alterados em processos oncogênicos (PEREIRA *et al.*, 2018a), possivelmente não promovem o desenvolvimento do FCO.

Apesar de a significância clínica da variante p.P347R detectada no gene *ESX1* não estar clara no presente momento, é possível que ela esteja envolvida na patogênese do FCO. Entretanto, é importante ressaltar que a cobertura do sequenciamento não foi uniforme em todos os casos da doença nos quais essa alteração foi identificada. Essa mutação tem sido descrita em importantes bases de dados de câncer e em diversos tipos de tumores, como o COSMIC (*Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*) e o TCGA (*The Cancer Genome Atlas*) com previsões de efeitos moderados, mas investigações direcionadas ao estudo do

impacto dessa alteração são necessárias, visto que pode representar uma mutação passageira. Ainda que análises funcionais sejam necessárias para esclarecer o papel dessa alteração, a recorrência de alterações somáticas nesse gene em outras doenças ósseas, como o osteossarcoma (REIMANN *et al.*, 2014; BOUSQUET *et al.*, 2016), pode indicar a sua participação na patogênese do FCO.

A discussão de que alterações em *CDC73* contribuem para o desenvolvimento de uma parcela dos casos de FCO foi reaquecida recentemente por novas evidências, indicando ausência de expressão nuclear da parafibromina, e em algumas situações, ocorrendo concomitantemente com mutações nesse gene (COSTA-GUDA *et al.*, 2021). No presente estudo, foram observadas alterações nesse gene em único caso (1/11, 9%), que já haviam sido demonstradas em um estudo prévio do grupo por sequenciamento do tipo Sanger dessa amostra (PIMENTA *et al.*, 2006; MESQUITA-NETTO *et al.*, 2013). Ainda que o sequenciamento completo de exoma apresente limitação em detectar variações estruturais de grandes tamanhos ou envolvendo regiões intrônicas (YOHE; THYAGARAJAN, 2017), a cobertura elevada de sequenciamento de toda a porção exônica deste gene e o corte razoável empregado neste trabalho favorecem a hipótese de que outros mecanismos moleculares são responsáveis pela ocorrência dessa doença, principalmente em casos esporádicos (não associados à síndrome HPT-JT).

A interpretação e/ou reanálise dos achados genômicos do presente estudo por novas investigações deve ser realizada com bastante cautela. Tendo em vista que outras limitações importantes do nosso experimento de sequenciamento completo do exoma devem ser consideradas, como a falta de validação das alterações identificadas por sequenciamento de Sanger e número limitado de amostras.

As MAPK são enzimas serina-treonina quinases que desempenham funções regulatórias em inúmeros processos biológicos importantes (GREENBLATT; SHIM; GLIMCHER, 2013; THOUVEREY; CAVERZASIO, 2015). A via MAPK/ERK exerce múltiplos papéis na biologia óssea, que podem variar conforme o estágio de diferenciação e sítio anatômico (GREENBLATT; SHIM; GLIMCHER, 2013), favorecendo ou inibindo a osteogênese, dependendo de uma série de fatores (MAJIDINIA; SADEGHPOUR; YOUSEFI, 2018). No

contexto particular do FCO, o impacto desse processo ainda foi pouco investigado, apesar de essa doença acontecer de forma simultânea a outras lesões ou síndromes nas quais as alterações moleculares principais ocorrem em um alvo que atua diretamente ou indiretamente nessa via (BENNET *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2018; JENDI *et al.*, 2018).

Hatano e colaboradores (2011) realizaram uma série de ensaios com uma linhagem imortalizada de FCO, demonstrando um mecanismo complexo no qual a fosforilação de ERK1/2 ocorre por intermédio da proteína RHAMM (receptor de motilidade mediado por hialuronano), o que possivelmente contribui para estimular o crescimento em detrimento da diferenciação celular. Por meio da análise imuno-histoquímica de uma série de casos dessa lesão, o presente estudo revelou que, no geral, os casos de FCO apresentam intensa expressão imuno-histoquímica de fosfo-Erk1/2, corroborando com a participação da via MAPK/ERK na patogênese da doença. Em acordo com a participação dessa via em uma parcela das lesões, a mutação L19F em *KRAS* foi observada em um dos casos e a alteração P26L em *FGFR1* em outra amostra. Essa alteração genética já foi demonstrada em alguns tipos de cânceres, como adenocarcinomas que acometem órgãos do trato gastrointestinal, e ensaios *in vitro* demonstraram que a sua presença contribui para processos tumorigênicos (AKAGI *et al.*, 2007). Contudo, outras análises são necessárias para esclarecer a função da via MAPK/ERK nessa doença, determinar os mecanismos que levam à sua ativação e verificar se outros componentes desse processo são afetados por mutações.

O entendimento das diferenças moleculares entre FCO e DF é altamente necessário para o desenvolvimento de novos exames eficientes em seu diagnóstico diferencial (TOYOSAWA *et al.*, 2007; VELTRINI *et al.*, 2019). Entretanto, até o presente momento, o número de investigações analisando comparativamente essas doenças é baixo e, na maioria das situações, empregam apenas análises imuno-histoquímicas analisando exclusivamente alvos classicamente relacionados a processos ósseos (TOYOSAWA *et al.*, 2007; ELIAS *et al.*, 2010; VELTRINI *et al.*, 2019). Apesar de diversos *insights* terem sido obtidos nesses estudos, os seus resultados têm pouca aplicação clínica (VELTRINI *et al.*, 2019). Nesse contexto, os ensaios proteômicos mostram-se

como uma alternativa plausível, visto que permitem avaliar de forma abrangente as proteínas sem desconsiderar a importância de outros mecanismos biológicos.

Em análise geral dos dados proteômicos, ficou evidente que o FCO apresenta maior diversidade em sua sinalização molecular quando comparado com a DF. Apesar do número baixo de amostras utilizadas nessas avaliações, esse achado concorda com as publicações recentes, demonstrando alta diversidade de aspectos moleculares dessa lesão (COSTA-GUDA *et al.*, 2021; MA *et al.*, 2021). Além disso, o FCO pode demonstrar extensa variabilidade histológica principalmente no que diz respeito aos seus materiais mineralizados, que podem diferir quantitativamente e qualitativamente, sendo este um dos principais aspectos que têm gerado discussão acerca da sua classificação ao longo dos anos (GONDIVKAR *et al.*, 2011; KHAN *et al.*, 2011). Veltrini e colaboradores (2019) demonstraram recentemente por meio de ensaios imunohistoquímicos que as características fenotípicas exercem um impacto notável na expressão de proteínas em lesões fibro-ósseas. Por outro lado, a maior diversidade proteica no FCO não revelou uma quantidade maior de processos biológicos quando comparado com a DF. Ainda que novos estudos sejam necessários, é provável que esse achado seja representativo da patogênese dessa doença.

As proteínas S100-A4 e S100-A6 exercem diversas funções na osteogênese, incluindo modulação da diferenciação de osteoblastos, mineralização e expressão de marcadores ósseos (DUARTE *et al.*, 2003; KATO *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2017). A expressão desses alvos moleculares foi demonstrada previamente no FCO e DF, mas sem interpretação estatística dos resultados (MURAMATSU *et al.*, 1997). Além disso, nesse trabalho, a entidade FCO foi considerada como duas variantes histológicas distintas com base no predomínio dos materiais mineralizados, sendo elas a ossificante e a cementificante (MURAMATSU *et al.*, 1997). No presente estudo, uma maior abundância dessas moléculas foi observada no FCO. Baseado em descrições prévias, que associam níveis maiores dessas proteínas com distúrbios no controle entre crescimento celular e diferenciação osteoblástica (DUARTE *et al.*, 2003; LI *et al.*, 2015; KIM *et al.*, 2017), é provável que essas moléculas participem de etapas importantes do desenvolvimento da doença.

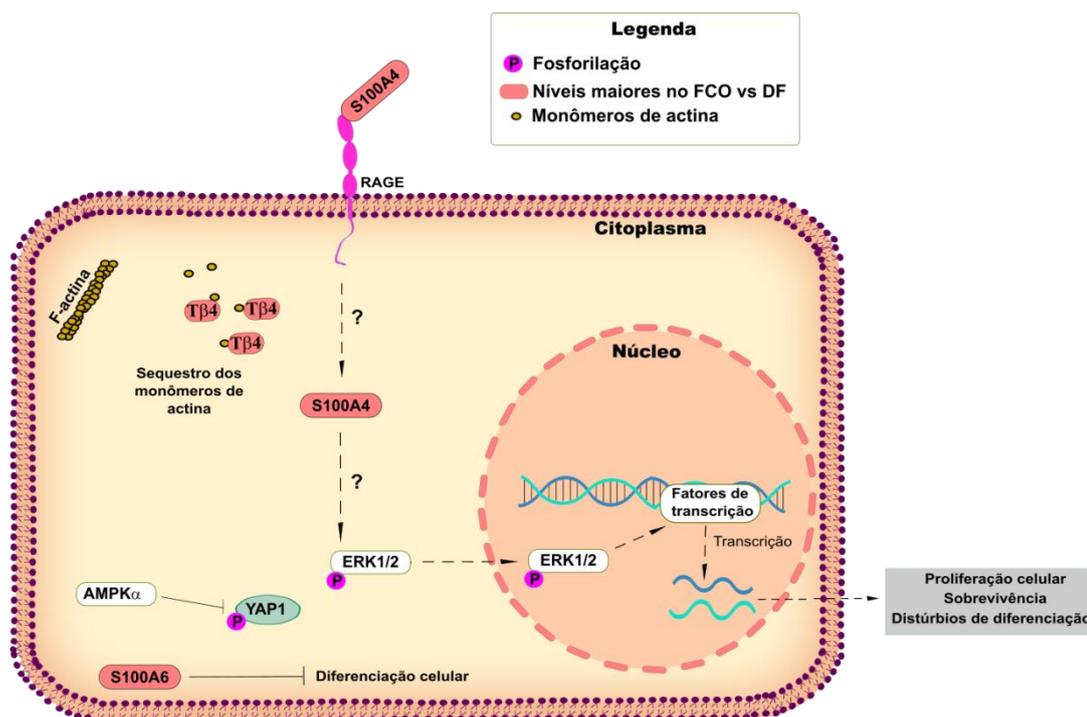


Figura 15. Proposta de sinalização molecular envolvida na patogênese do fibroma cemento-ossificante com base nos resultados das análises proteômicas e imuno-histoquímicas. Os achados do estudo apontam que a reorganização do citoesqueleto por meio da regulação de processos que modulam a estrutura e função da actina F são importantes para patogênese desse tumor. Além disso, proteínas multifuncionais como S100A4 e S100A6 apresentam níveis maiores nessa lesão, estando possivelmente implicadas na ativação da via MAPK e outros eventos de sinalização, para promover a proliferação, sobrevivência e alterações na diferenciação das células tumorais. Os fatores que levam à fosforilação inibitória na Ser61 de YAP1 ainda não estão claros e merecem ser melhor investigados. A construção desse modelo levou em consideração informações contidas na literatura e bases de dados de via como KEGG e *Reactome*, assim como os resultados das avaliações do presente estudo. Análises utilizando um número maior de amostras e outras metodologias são necessárias para confirmar essas hipóteses.

Os resultados das análises proteômicas sugerem que a patogênese do FCO é mediada por alterações na organização do citoesqueleto (**Figura 15**). Consistente com essa hipótese, a presente avaliação demonstrou que essa lesão apresenta níveis significativamente maiores de diversas proteínas implicadas na formação e organização dos filamentos actinares e na regulação da estrutura celular, incluindo a abundância de timosina beta-4 (Tβ4, *TMSB4X*), timosina beta-10 (*TMSB10*), fator de maturação da glia beta (*GMFB*) e inibidor alfa de dissociação Rho GDP (*ARHGDI1A*). Um estudo avaliando os efeitos da

timosina beta-4 (T β 4) em células-tronco mesenquimais durante a diferenciação osteogênica demonstrou que este peptídeo tem papel inibitório sobre esse processo (HO *et al.*, 2009). Essa inibição é mediada pelo impacto que essa proteína exerce, reduzindo a produção da actina F e, por consequência, no arranjo do citoesqueleto (HO *et al.*, 2009). Dessa forma, é possível que neste tumor, essas moléculas atuem no sequestro dos monômeros de actina, desencadeando alterações na dinâmica estrutural celular e levando à redução da capacidade de conversão osteogênica dos seus precursores celulares (**Figura 15**).

A via de sinalização Wnt desempenha funções importantes em diversos processos biológicos, apresentando papel proeminente na regulação da osteogênese (HOUSCHYAR *et al.*, 2019). Alguns estudos recentes têm sugerido que alterações nessa via estão envolvidas na patogênese do FCO (PEREIRA *et al.*, 2017) e da DF (REGARD *et al.*, 2011). Contudo, investigações verificando se ocorrem diferenças na ativação dessa cascata entre essas lesões, têm sido limitadas à análise imuno-histoquímica para avaliação do acúmulo nuclear de β -catenina (HORVAI; JORDAN, 2014). Na análise proteômica total do presente estudo, níveis maiores de PEDF (fator derivado do epitélio pigmentar) foram observados em todas as amostras de DF. Essa proteína codificada pelo gene *SERPINF1* tem sido implicada na modulação da via WNT/ β -catenina (GATTU *et al.*, 2013; BAXTER-HOLLAND; DASS, 2018). Em consistência com esse achado, análises de expressão gênica revelaram aumento nos níveis dos transcritos desse gene nos tecidos de pacientes acometidos por DF em comparação com indivíduos saudáveis (ZHOU *et al.*, 2014). Este resultado pode apontar a ocorrência de diferenças entre FCO e DF no que diz respeito aos mecanismos moleculares que modulam a atividade dessa via de sinalização (**Figuras 15 e 16**).

Nas análises proteômicas, um resultado inesperado foi a observação de diversas diferenças significativas tanto na abundância de proteínas quanto no enriquecimento de processos biológicos relacionados às funções de plaquetas e eritrócitos entre FCO e DF. Este achado pode refletir diferenças nos níveis de vascularização dessas doenças. Em acordo com essa hipótese, Shmuly e colaboradores (2017) demonstraram por meio da avaliação histomorfométrica,

focada no estudo de conteúdo vascular dessas lesões, que a DF apresenta maiores quantidades de vasos, assim como maiores medidas de área e perímetro de vasos sanguíneos. Contudo, ao nosso conhecimento, essa é a única publicação que abordou de forma quantitativa esse aspecto. Diante disso, novos estudos são necessários para confirmar a existência dessas diferenças entre essas doenças, aplicando novas metodologias.

A DF demonstrou alterações significativamente maiores nos níveis de diversas proteínas que compõem o cerne ou são relacionadas a matriz extracelular e, por consequência, foram enriquecidas diversas vias implicadas na organização função e interação dessa estrutura tecidual. Este achado é condizente com estudos prévios avaliando a expressão gênica dessa lesão (KISS *et al.*, 2010; ZHOU *et al.*, 2014). Entre as biomoléculas que apresentaram níveis maiores, diversas modulam direta ou indiretamente a diferenciação osteogênica, incluindo a trombospondina 1, biglicano e tenascina C (ALFORD *et al.*, 2015; MACKIE *et al.*, 1996; MORGAN *et al.*, 2011). Em uma publicação recente, foi sugerido que a presença de mutações no gene *GNAS1*, que representam uma assinatura molecular da DF, pode interferir na abundância de componentes de matriz (RAIMONDO *et al.*, 2020). Por outro lado, o FCO apresentou apenas uma proteína do cerne da matriz com níveis aumentados, a dermatopontina, uma biomolécula previamente implicada na osteogênese de células mesenquimais (COAN; LIVELY; DYKE, 2014). De modo geral, esses resultados em conjunto com os demais reforçam que diferentes mecanismos moleculares são desencadeados na patogênese do FCO e da DF, sendo alterações matricelulares possivelmente importantes para o desenvolvimento e manutenção dessa última lesão (**Figura 16**).

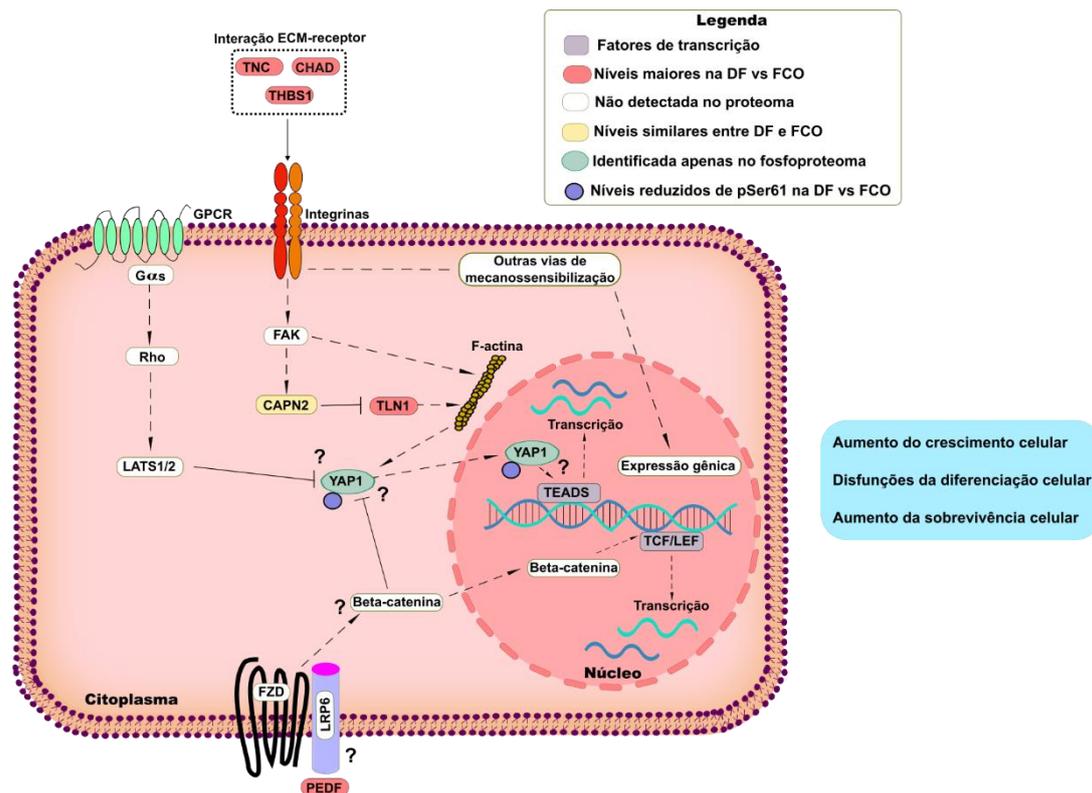


Figura 16. Proposição de mecanismos moleculares potencialmente envolvidos na patogênese da displasia fibrosa, tendo como base os achados dos ensaios proteômicos e fosfoproteômicos. Uma série intrincada de processos, em particular envolvendo a função e organização da matriz extracelular, possivelmente promovem aumento do crescimento e da sobrevivência celular, com concomitante desequilíbrio da diferenciação. Nesta ilustração, os pontos de interrogação demonstram aspectos que tem descrições conflitantes na literatura e que necessitam de novos estudos para estabelecerem o seu papel exato na patogênese da displasia fibrosa. Abreviatura: GPCR: Receptor acoplado à proteína G; FAK: quinase de adesão focal; TLN1: Talina 1; TNC: Tenascina; THBS1: Trombospondina 1; CHAD: condroaderina; LATS1: grande supressora de tumor quinase 1; CAPN2: calpaína 2; Rho: rodopsina (Adaptado de DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2022).

A análise do fosfoproteoma permitiu a detecção de apenas uma alteração significativa entre as doenças, sendo observada uma variação nos níveis de fosforilação de um sítio localizado na posição ser61 de YAP1. Conforme informações de bases de dados dedicadas à compilação de informações sobre modificações pós-traducionais e da literatura, a fosforilação desse sítio da proteína promove a sua inativação. A observação de que esta modificação pós-traducional ocorre em maior nível no FCO é curiosa, tendo em vista que descrições prévias demonstram que a ativação de *GNAS1* promove a inibição da sinalização por YAP/TAZ celular (POCATERRA *et al.*, 2020). Em geral, considerando que essa biomolécula não foi observada no proteoma total, novas

análises são requeridas para confirmar que essa alteração ocorre apenas em nível de fosfopeptídeo e não na quantidade total da proteína. Uma investigação mais profunda desse achado é importante, uma vez que esse alvo controla diversos processos de relevância para patogênese de ambas as lesões, como sobrevivência, diferenciação e proliferação celular (POCATERRA *et al.*, 2020). É possível que algum processo molecular leve à ativação da subunidade alfa da proteína quinase ativada por AMP (AMPK α) no FCO, a quinase implicada na fosforilação inibitória de ser61.

O impacto da fixação e parafinização de tecidos na análise do proteoma é baixo, afetando de modo geral proteínas que são pouco abundantes (DONCZO; GUTTMAN, 2018; PIEHOWSKI *et al.*, 2018). Por outro lado, uma série de investigações têm demonstrado que os efeitos desse processo no fosfoproteoma são maiores, com números menores de identificações de fosfopeptídeos (PIEHOWSKI *et al.*, 2018; ZENEYEDPOUR *et al.*, 2020). De igual importância, estudos de fosfoproteômica empregando tecidos parafinizados não avaliaram amostras mineralizadas (OSTASIEWICZ *et al.*, 2010; GÁMEZ-POZO *et al.*, 2011; WAKABAYASHI *et al.*, 2014; PIEHOWSKI *et al.*, 2018; ZENEYEDPOUR *et al.*, 2020). De forma conjunta, esses fatores podem ter sido os responsáveis pela identificação de apenas um único alvo significativamente alterado entre a DF e o FCO e ressaltam a necessidade de desenvolvimento protocolos mais eficientes para avaliações similares a essas.

8. CONCLUSÕES

Em conclusão, a análise do sequenciamento completo do exoma sugere que alterações genéticas pontuais possivelmente não são responsáveis pelo desenvolvimento do FCO. A intensa imunexpressão de fosfo-Erk1/2 na maioria das amostras sugere que a ativação da via MAPK é um importante mecanismo de sinalização na patogênese dessa doença. As análises proteômicas reforçam que processos moleculares distintos são ativados pelo FCO e a DF em sua patogênese, sendo a primeira lesão possivelmente decorrente de eventos intracelulares no estímulo do aumento do crescimento e da sobrevivência celular, com concomitante desequilíbrio da diferenciação

De modo geral, os resultados dessa pesquisa podem ser empregados em diversas investigações futuras, como aquelas focadas na determinação de

biomarcadores para o diagnóstico diferencial das lesões fibro-ósseas e na identificação de alvos terapêuticos para o desenvolvimento de terapias menos agressivas. Contudo, os nossos dados necessitam de testes funcionais e validação em um conjunto diferente e maior de amostras e muitas lacunas acerca das características moleculares do FCO ainda precisam ser investigadas, como a análise dos aspectos metabólicos, epigenéticos e aprofundamento das análises citogenéticas.

9. PERSPECTIVAS

- Confirmação dos achados do sequenciamento completo de exoma e das análises proteômicas por ensaios ortogonais;
- Verificação por meio de RNAseq se o FCO apresenta alterações estruturais recorrentes;
- Realização de ensaios funcionais para determinação do impacto das alterações identificadas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ABRAMOVITCH, Kenneth; RICE, Dwight D. Benign fibro-osseous lesions of the jaws. *Dental Clinics of North America*, v. 60, n. 1, p. 167-193, 2016.
2. AKAGI, Kiwamu; UCHIBORI, Ryosuke; YAMAGUCHI, Kensei; KUROSAWA, Keiko; TANAKA, Yoichiro; KOZU, Tomoko. Characterization of a novel oncogenic K-ras mutation in colon cancer. *Biochem Biophys Res Commun*, v.352, n. 3, p. 728-32, 2007.
3. ALFORD, Andrea I.; KOZLOFF, Kenneth M.; HANKENSON, Kurt D. Extracellular matrix networks in bone remodeling. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, v. 65, p. 20-31, 2015.
4. BASTOS, Victor Coutinho; PEREIRA, Núbia Braga; DINIZ, Marina Gonçalves; ANDRADE, Luciana Oliveira; CASTRO, Wagner Henriques; KITTEN, Gregory Thomas; GOMEZ, Ricardo Santiago; GOMES, Carolina Cavalieri. Bringing benign ectomesenchymal odontogenic tumours to the lab: an in vitro study using an organotypic culture model. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 48, p. 174–179, 2018.
5. BAUMHOER, Daniel; HAEFLIGER, Simon; AMELINE, Baptiste; HARTMANN, Wolfgang; AMARY, Fernanda; CLEVEN, Arjen; KLEIN, Michael J.; THOMPSON, Lester D. R.; HARDER, Dorothee; O'DONNELL, Paul. Ossifying fibroma of non-odontogenic origin: a fibro-osseous lesion in the craniofacial skeleton to be (re-)considered. *Head and Neck Pathology*, 2021.
6. BAXTER-HOLLAND, Mia; DASS, Crispin R. Pigment epithelium-derived factor: a key mediator in bone homeostasis and potential for bone regenerative therapy. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 70, n. 9, p. 1127-1138, 2018.
7. BENNETT, J. T.; TAN, T. Y.; ALCANTARA, D.; TétrauLT, M.; TIMMS, A. E.; JENSEN, D.; COLLINS, S.; NOWACZYK, M. J. M.; LINDHURST, M. J.; CHRISTENSEN, K. M.; BRADDOCK, S. R.; BRANDLING-BENNETT, H.; HENNEKAM, R. C. M.; CHUNG, B.; LEHMAN, A.; SU, J.; NG, S.; AMOR, D. J.; UNIVERSITY OF WASHINGTON CENTER FOR MENDELIAN GENOMICS; CARE4RARE CANADA CONSORTIUM;

- MAJEWSKI, J.; BIESECKER, L. G.; BOYCOTT, K. M.; DOBYNS, W. B.; O'DRISCOLL, M.; MOOG, U.; MCDONELL, L. M. Mosaic Activating Mutations in FGFR1 Cause Encephalocraniocutaneous Lipomatosis. *Am J Hum Genet*, v. 98, n. 3, p. 579-587, 2016.
8. BRANNON, Robert B.; FOWLER, Craig B.. Benign fibro-osseous lesions: a review of current concepts. *Advances In Anatomic Pathology*, v. 8, n. 3, p. 126-143, 2001.
 9. BOUSQUET, M.; NOIROT, C.; ACCADBLE, F.; GAUZY, J. SALES DE; CASTEX, M.P.; BROUSSET, P.; GOMEZ-BROUCHET, A.. Whole-exome sequencing in osteosarcoma reveals important heterogeneity of genetic alterations. *Annals of Oncology*, v. 27, n. 4, p. 738-744, 2016.
 10. CANGER, Emin Murat; CELENK, Peruze; KAYIPMAZ, Saadettin; ALKAN, Alper; GUNHAN, Omer. Familial ossifying fibromas: report of two cases. *Journal of Oral Science*, v. 46, n. 1, p. 61-64, 2004.
 11. CARPTEN, J.D.; ROBBINS, C.M.; VILLABLANCA, A.; FORSBERG, L.; PRESCIUTTINI, S.; BAILEY-WILSON, J.; SIMONDS, W.F.; GILLANDERS, E.M.; KENNEDY, A.M.; CHEN, J.D. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. *Nature Genetics*, v. 32, n. 4, p. 676–680, 2002.
 12. CHANG, Chia-Chuan; HUNG, Hsien-Yen; CHANG, Julia Yu-Fong; YU, Chuan-Hang; WANG, Yi-Ping; LIU, Bu-Yuan; CHIANG, Chun-Pin. Central ossifying fibroma: a clinicopathologic study of 28 cases. *Journal of the Formosan Medical Association*, v. 107, n. 4, p. 288–294, 2008. .
 13. CHEN, Xian; LUTHER, Gaurav; ZHANG, Wenwen; NAN, Guoxin; WAGNER, Eric R.; LIAO, Zhan; WU, Ningning; ZHANG, Hongmei; WANG, Ning; WEN, Sheng. The E-F hand calcium-binding protein S100A4 regulates the proliferation, survival and differentiation potential of human osteosarcoma cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 32, n. 4, p. 1083-1096, 2013.
 14. CHEN, Yan; HU, Da-Yan; WANG, Ting-Ting; ZHANG, Ran; DONG, Qing; XU, Zhi-Xiu; WANG, Lin; LI, Tie-Jun. CDC73 gene mutations in sporadic ossifying fibroma of the jaws. *Diagnostic Pathology*, v. 11, n. 1, p. 91, 2016.
 15. CHONG, Jasmine; SOUFAN, Othman; LI, Carin; CARAUS, Iurie; LI,

- Shuzhao; BOURQUE, Guillaume; WISHART, David s; XIA, Jianguo. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. *Nucleic Acids Research*, v. 46, n. W1, p. W486–W494, 2018.
16. CIN, Paola dal; SCIOT, Raf; FOSSION, Eric; VAN DAMME, Boudewijn; BERGHE, Herman van Den. Chromosome abnormalities in cementifying fibroma. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, v. 71, n. 2, p. 170–172, 1993.
17. COAN, Heather B.; LIVELY, Mark O.; DYKE, Mark E. Van. Dermatopontin in the extracellular matrix enhances osteogenic differentiation of adipose-derived mesenchymal stem cells. *Musculoskeletal Biology*, v. 1, n. 2, p. 1-8, 2014.
18. CORTÉS-CIRIANO, Isidro; LEE, Jake June-Koo; XI, Ruibin; JAIN, Dhawal; JUNG, Youngsook L.; YANG, Lixing; GORDENIN, Dmitry; KLIMCZAK, Leszek J.; ZHANG, Cheng-Zhong; PELLMAN, David S.. Comprehensive analysis of chromothripsis in 2,658 human cancers using whole-genome sequencing. *Nature Genetics*, v. 52, n. 3, p. 331-341, 2020.
19. COSTA-GUDA, Jessica; PANDYA, Chetanya; STRAHL, Maya; TAIK, Patricia; SEBRA, Robert; CHEN, Rong; UZILOV, Andrew V; ARNOLD, Andrew. Parafibromin abnormalities in ossifying fibroma. *Journal of the Endocrine Society*, v. 5, n. 7, p. bvab087, 2021.
20. DESAI, Rajiv S.; BANSAL, Shivani; SHIRSAT, Pankaj M.; PRASAD, Pooja; SATTAR, Shumai. Cemento-ossifying fibroma and juvenile ossifying fibroma: Clarity in terminology. *Oral Oncol*, v. 113, p. 105050, 2021.
21. DASHTI, Mahjoubeh J. S.; GAMIELDIEN, Junaid. A practical guide to filtering and prioritizing genetic variants. *Biotechniques*, v. 62, n.1, p. 18-30, 2017.
22. DAWSON, Annelise L.; SCHULMAN, Joshua M.; JORDAN, Richard C.; NORTH, Jeffrey P. Ossifying fibroma in Buschke-Ollendorff syndrome. *Journal of Cutaneous Pathology*, v. 41, n. 9, p. 740–744, 2014.
23. DE MESQUITA-NETTO, Ana Carolina; GOMEZ, Ricardo Santiago; DINIZ, Marina Gonçalves; FONSECA-SILVA, Thiago; CAMPOS, Kelma;

- MARCO, Luiz de; CARLOS, Román; GOMES, Carolina Cavaliéri. Assessing the contribution of HRPT2 to the pathogenesis of jaw fibrous dysplasia, ossifying fibroma, and osteosarcoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 115, n. 3, p. 359–367, 2013.
24. DINIZ, Marina; BORGES, Erica; PIMENTA, Flavio; NETTO, Ana de Mesquita; MARCO, Luiz de; GOMEZ, Ricardo; GOMES, Carolina. Evidence of molecular alterations in the tumour suppressor gene WWOX in benign and malignant bone related lesions of the jaws. *Oncology Reports*, v. 25, n. 2, p. 499–502, 2011.
25. DONCZO, Boglarka; GUTTMAN, Andras. Biomedical analysis of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue samples: the holy grail for molecular diagnostics. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, v. 155, p. 125-134, 2018.
26. DUARTE-ANDRADE, Filipe Fideles; VITÓRIO, Jéssica Gardone; PEREIRA, Thaís dos Santos Fontes; GOMES, Carolina Cavaliéri; GOMEZ, Ricardo Santiago. A review of the molecular profile of benign and malignant odontogenic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.*, v.129 , n. 4, p. 357-368, 2020.
27. DUARTE-ANDRADE, Filipe Fideles; PEREIRA, Thaís dos Santos Fontes; VITÓRIO, Jéssica Gardone; DINIZ, Marina Gonçalves; AMORIM, Larissa Stefhanne Damasceno; NAWROCKI, Arkadiusz; FELICORI, Liza Figueiredo; DE MARCO, Luiz; GOMES, Carolina Cavaliéri; LARSEN, Martin R; MELO-BRAGA, Marcella Nunes; GOMEZ, Ricardo Santiago. Quantitative proteomic study reveals differential expression of matricellular proteins between fibrous dysplasia and cemento-ossifying fibroma pathogenesis. *J Oral Pathol Med*. 2022.
28. DUARTE, Wagner R; SHIBATA, Tatsuya; TAKENAGA, Keizo; TAKAHASHI, Etsuko; KUBOTA, Kaori; OHYA, Keiichi; ISHIKAWA, Isao; YAMAUCHI, Mitsuo; KASUGAI, Shohei. S100A4: a novel negative regulator of mineralization and osteoblast differentiation. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 18, n. 3, p. 493-501, 2003.
29. ELIAS, Larissa Santana Arantes; COSTA, Rafael Ferreira; CARVALHO, Marco Aurélio; BATISTA, Aline Carvalho; SILVA, Tarcília Aparecida;

- LELES, Cláudio Rodrigues; MENDONÇA, Elismauro Francisco. Markers of bone remodeling in neoplastic and bone-related lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 110, n. 5, p. 624–631, 2010.
30. EL-MOFTY, Samir K. Fibro-osseous lesions of the craniofacial skeleton: an update. *Head and Neck Pathology*, v. 8, n. 4, p. 432–444, 2014.
31. EL-NAGGAR, Adel K. *et al.* *World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours*. 4 ed. Lyon: IARC, 2017.
32. EVERSOLE, L. R.; LEIDER, A. S.; NELSON, K. Ossifying fibroma: a clinicopathologic study of sixty-four cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 60, n. 5, p. 505–511, 1985.
33. FRANCESCHINI, Natasja; LAM, Suk Wai; CLETON-JANSEN, Anne-Marie; BOVÉE, Judith V. M. G.. What's new in bone forming tumours of the skeleton? *Virchows Archiv*, v. 476, n. 1, p. 147-157, 2019.
34. GÁMEZ-POZO, Angelo; SÁNCHEZ-NAVARRO, Iker; CALVO, Enrique; DÍAZ, Esther; MIGUEL-MARTÍN, María; LÓPEZ, Rocío; AGULLÓ, Teresa; CAMAFEITA, Emilio; ESPINOSA, Enrique; LÓPEZ, Juan Antonio. Protein phosphorylation analysis in archival clinical cancer samples by shotgun and targeted proteomics approaches. *Molecular Biosystems*, v. 7, n. 8, p. 2368, 2011.
35. GARCIA, Bruna Goncalves; CALDEIRA, Patricia Carlos; JOHANN, Aline Cristina Batista Rodrigues; SOUSA, Suzana Cantanhede Orsini Machado de; CALIARI, Marcelo Vidigal; CARMO, Maria Auxiliadora Vieira do; MESQUITA, Ricardo Alves. Cellular proliferation markers in peripheral and central fibromas: a comparative study. *Journal of Applied Oral Science*, v. 21, n. 2, p. 106–111, 2013.
36. GATTU, Arijeet K.; SWENSON, E. Scott; IWAKIRI, Yasuko; SAMUEL, Varman T.; TROIANO, Nancy; BERRY, Ryan; CHURCH, Christopher D.; RODEHEFFER, Matthew S.; CARPENTER, Thomas O.; CHUNG, Chuhan. Determination of mesenchymal stem cell fate by pigment epithelium-derived factor (PEDF) results in increased adiposity and reduced bone mineral content. *The FASEB Journal*, v. 27, n. 11, p. 4384-4394, 2013.
37. OLLIN, Susanne M.; STORTO, Patrick D.; MALONE, Patrick S.;

- WASHINGTON, Janice A.; CHIDAMBARAM, Abirami; BARNES, Leon; JANECKA, Ivo P.. Cytogenetic abnormalities in an ossifying fibroma from a patient with bilateral retinoblastoma. *Genes, Chromosomes and Cancer*, v. 4, n. 2, p. 146–152, 1992.
38. GOMES, Carolina Cavalieri; GAYDEN, Tenzin; BAJIC, Andrea; HARRAZ, Osama F.; PRATT, Jonathan; NIKBAKHT, Hamid; BAREKE, Eric; DINIZ, Marina Gonçalves; CASTRO, Wagner Henriques; ST-ONGE, Pascal. *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.
39. GONDIVKAR, Shailesh M.; GADBAIL, Amol R.; CHOLE, Revant; PARIKH, Rima V.; BALSARAF, Swati. Ossifying fibroma of the jaws: report of two cases and literature review. *Oral Oncology*, v. 47, n. 9, p. 804–809, 2011.
40. 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.
41. GOULART-FILHO, João Augusto Vianna; MONTALLI, Victor Angelo Martins; PASSADOR-SANTOS, Fabrício; SOARES, Andresa Borges; ARAÚJO, Ney Soares de; ARAÚJO, Vera Cavalcanti de. Microvessel density and cell proliferation in juvenile ossifying fibroma: A comparative study with central ossifying fibroma. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 36, p. 44–49, 2018.
42. GREENBLATT, Matthew B.; SHIM, Jae-Hyuck; GLIMCHER, Laurie H. Mitogen-Activated Protein Kinase pathways in osteoblasts. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, v. 29, n. 1, p. 63–79, 2013.
43. HASIN, Yehudit; SELDIN, Marcus; LUSIS, Aldons. Multi-omics approaches to disease. *Genome Biology*, v. 18, n. 1, p. 83, 2017.
44. HATANO, Hiroko; OGAWA, Ikuko; SHIGEISHI, Hideo; KUDO, Yasusei; OHTA, Kouji; HIGASHIKAWA, Koichiro; TAKECHI, Masaaki; TAKATA, Takashi; KAMATA, Nobuyuki. Expression of receptor for hyaluronan-mediated motility (RHAMM) in ossifying fibromas. *Histology and histopathology*, v. 28, n. 4, p. 473–480, 2013.
45. HATANO, Hiroko; SHIGEISHI, Hideo; KUDO, Yasusei; HIGASHIKAWA,

- Koichiro; TOBIUME, Kei; TAKATA, Takashi; KAMATA, Nobuyuki. RHAMM/ERK interaction induces proliferative activities of cementifying fibroma cells through a mechanism based on the CD44-EGFR. *Laboratory Investigation*, v. 91, n. 3, p. 379–391, 2011.
46. HO, Jennifer Hui-Chun; MA, Wei-Hsien; SU, Yeu; TSENG, Kuang-Ching; KUO, Tom Kwang-Chun; LEE, Oscar Kuang-Sheng. Thymosin beta-4 directs cell fate determination of human mesenchymal stem cells through biophysical effects. *Journal of Orthopaedic Research*, p. 131-138, 2009.
47. HORVAI, Andrew; JORDAN, Richard. Fibro-osseous lesions of the craniofacial bones: β -catenin immunohistochemical analysis and CTNNB1 and APC mutation analysis. *Head and Neck Pathology*, v. 8, n. 3, p. 291–297, 2014.
48. HOUSCHYAR, Khosrow S.; TAPKING, Christian; BORRELLI, Mimi R.; POPP, Daniel; DUSCHER, Dominik; MAAN, Zeshaan N.; CHELLIAH, Malcolm P.; LI, Jingtao; HARATI, Kamran; WALLNER, Christoph. Wnt pathway in bone repair and regeneration – what do we know so far. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, v. 6, p. 170, 2019.
49. IBRAHEM, Hazim M. Ossifying fibroma of the jaw bones in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: Analysis of 24 cases retrieved from literatures. *Journal of Dental Sciences*, v. 15, n. 4, p. 426-432, 2020.
50. JENDI, Shoeb Kasim; KHATIB, Shuaib; MISTRY, Jagruti; WAGH, Ashwin; VAIDYA, Kedar; KOKANE, Gauri. Ossifying fibroma of maxilla in a female affected by neurofibromatosis type 1. *Indian Journal of Otolaryngology and Head and Neck Surgery*, v. 71, n. Suppl 3, p. 2087-2090, 2018.
51. KARCZEWSKI, Konrad J.; SNYDER, Michael P. Integrative omics for health and disease. *Nature Reviews Genetics*, v. 19, n. 5, p. 299–310, 2018.
52. KATO, Chiyu; KOJIMA, Takehisa; KOMAKI, Motohiro; MIMORI, Kaori; DUARTE, Wagner R.; TAKENAGA, Keizo; ISHIKAWA, Isao. S100A4 inhibition by RNAi up-regulates osteoblast related genes in periodontal ligament cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 326, n. 1, p. 147-153, 2004.

53. KHAN, Suleman Abbas; SHARMA, Nareshkumar; RAJ, Vineet; SETHI, Tarun. Ossifying fibroma of maxilla in a male child: Report of a case and review of the literature. *National journal of maxillofacial surgery*, v. 2, n. 1, p. 73–9, 2011.
54. KIM, Bong Chul; LEE, Jun; CHOI, Boyoung; MIN, Seung-Ki; YOON, Jung-Hoon. Synchronous Central Giant Cell Granuloma and Ossifying Fibroma of the Mandible. *Journal of Craniofacial Surgery*, v. 23, n. 6, p. 645-647, 2012.
55. KIM, Haemin; LEE, Yong Deok; KIM, Min Kyung; KWON, Jun-Oh; SONG, Min-Kyoung; LEE, Zang Hee; KIM, Hong-Hee. Extracellular S100A4 negatively regulates osteoblast function by activating the NF- κ B pathway. *BMB Reports*, v. 50, n. 2, p. 97-102, 2017.
56. KISS, János; BALLA, Bernadett; KÓSA, János P.; BORSY, Adrienn; PODANI, János; TAKÁCS, István; LAZÁRY, Áron; NAGY, Zsolt; BÁCSI, Krisztián; KIS, Adrián. Gene expression patterns in the bone tissue of women with fibrous dysplasia. *American Journal of Medical Genetics Part A*, v. 152, n. 9, p. 2211-2220, 2010.
57. KOBOLDT, Daniel C.; STEINBERG, Karyn Meltz; LARSON, David E.; WILSON, Richard K.; MARDIS, Elaine R.. The next-generation sequencing revolution and its impact on genomics. *Cell*, v. 155, n. 1, p. 27-38, 2013.
58. KOSAKO, Hidetaka; NAGANO, Kohji. Quantitative phosphoproteomics strategies for understanding protein kinase-mediated signal transduction pathways. *Expert Review of Proteomics*, v. 8, n. 1, p. 81-94, 2011.
59. KU, Chee-Seng; COOPER, David N.; POLYCHRONAKOS, Constantin; NAIDOO, Nasheen; WU, Mengchu; SOONG, Richie. Exome sequencing: dual role as a discovery and diagnostic tool. *Ann Neurol*, v. 71, n.1, p-7-14, 2012.
60. KUDO, Y; HIRAOKA, M; KITAGAWA, S; MIYAUCHI, M; KAKUO, S; ZHAO, M; IDE, T; TAKATA, T. Establishment of human cementifying fibroma cell lines by transfection with temperature-sensitive simian virus-40 T-antigen gene and hTERT gene. *Bone*, v. 30, n. 5, p. 712–7, 2002.
61. KULKARNI, Rasika R; SARVADE, Sriranjani D; BOAZ, Karen; N, Srikant; KP, Nandita; LEWIS, Amitha J. Polarizing and light microscopic

- analysis of mineralized components and stromal elements in fibrous ossifying lesions. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, v. 8, n. 6, p. ZC42–45, 2014.
62. LAPPALAINEN, Tuuli; SCOTT, Alexandra J.; BRANDT, Margot; HALL, Ira M.. Genomic analysis in the age of human genome sequencing. *Cell*, v. 177, n. 1, p. 70-84, 2019.
63. LAM, Suk Wai; VAN IJZENDOORN, David G. P.; CLETON-JANSEN, Anne-Marie; SZUHAI, Karoly; BOVÉE, Judith V. M. G.. Molecular pathology of bone tumors. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 21, n. 2, p. 171-182, 2019.
64. LEE, Dave C. H.; JONES, Andrew R.; HUBBARD, Simon J.. Computational phosphoproteomics: from identification to localization. *Proteomics*, v. 15, n. 5-6, p. 950-963, 2015.
65. LEE, S; LIU, P; TEINTURIER, R; JAKOB, J; TSCHAFFON, M; A TASDOGAN,; WITTIG, R; HOELLER, S; BAUMHOER, D; FRAPPART, L. Deletion of menin in craniofacial osteogenic cells in mice elicits development of mandibular ossifying fibroma. *Oncogene*, v. 37, n. 5, p. 616–626, 2018.
66. LI, H.; DURBIN, R.. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform. *Bioinformatics*, v. 25, n. 14, p. 1754-1760, 2009a.
67. LI, H.; HANDSAKER, B.; WYSOKER, A.; FENNELL, T.; RUAN, J.; HOMER, N.; MARTH, G.; ABECASIS, G.; DURBIN, R.. The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics*, v. 25, n. 16, p. 2078-2079, 2009b.
68. LI, Marilyn M.; DATTO, Michael; DUNCAVAGE, Eric J.; KULKARNI, Shashikant; LINDEMAN, Neal I.; ROY, Somak; TSIMBERIDOU, Apostolia M.; VNENCAK-JONES, Cindy L.; WOLFF, Daynna J.; YOUNES, Anas. Standards and guidelines for the interpretation and reporting of sequence variants in cancer. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 19, n. 1, p. 4-23, 2017.
69. LI, Yasha; WAGNER, Eric R.; YAN, Zhengjian; WANG, Zhonliang; LUTHER, Gaurav; JIANG, Wei; YE, Jixing; WEI, Qiang; WANG, Jing; ZHAO, Lianggong. The calcium-binding protein S100A6 accelerates

- human osteosarcoma growth by promoting cell proliferation and inhibiting osteogenic differentiation. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 37, n. 6, p. 2375-2392, 2015.
70. LIANG, Qi; WEI, Minqi; HODGE, Leann; FANBURG-SMITH, Julie C.; NELSON, Ann; MIETTINEN, Markku; FOSS, Robert D.; WANG, Guanghua. Quantitative analysis of activating alpha subunit of the G protein (Gsa) mutation by pyrosequencing in fibrous dysplasia and other bone lesions. *Journal of Molecular Diagnostics*, v. 13, n. 2, p. 137–142, 2011.
71. MA, Ming; LIU, Lu; SHI, Ruirui; ZHANG, Jianyun; LI, Xiaotian; LI, Xuefen; BAI, Jiaying; WANG, Jianbin; HUANG, Yanyi; LI, Tiejun. Copy number alteration profiling facilitates differential diagnosis between ossifying fibroma and fibrous dysplasia of the jaws. *International Journal of Oral Science*, v. 13, n. 1, p. 21, 2021.
72. MACKIE, E J; THESLEFF, I; CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascin is associated with chondrogenic and osteogenic differentiation in vivo and promotes chondrogenesis in vitro. *Journal of Cell Biology*, v. 105, n. 6, p. 2569-2579, 1987.
73. MACLAREN, M. J.P.; KLUIJT, I.; KOOLE, F. D. Ophthalmologic abnormalities in encephalocraniocutaneous lipomatosis. *Documenta Ophthalmologica*, v. 90, n. 1, p. 87–98, 1995.
74. MAES, Evelyne; MERTENS, Inge; VALKENBORG, Dirk; PAUWELS, Patrick; ROLFO, Christian; BAGGERMAN, Geert. Proteomics in cancer research: are we ready for clinical practice? *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 96, n. 3, p. 437–448, 2015.
75. MAHOMED, Farzana; RIKHOTSO, Ephraim. Ossifying fibroma in a patient with oculocerebrocutaneous (Delleman) syndrome. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 73, n. 7, p. 1314–1319, 2015.
76. MAJEWSKI, J.; SCHWARTZENTRUBER, J.; LALONDE, E.; MONTPETIT, A.; JABADO, N. What can exome sequencing do for you? *Journal of Medical Genetics*, v. 48, n. 9, p. 580–589, 2011.
77. MAJIDINIA, Maryam; SADEGHPOUR, Alireza; YOUSEFI, Bahman. The roles of signaling pathways in bone repair and regeneration. *Journal of cellular physiology*, v. 233, n. 4, p. 2937–2948, 2018.

78. MASI, Giulia; IACOBONE, Maurizio; SINIGAGLIA, Alessandro; MANTELLI, Barbara; PENNELLI, Gianmaria; CASTAGLIUOLO, Ignazio; PALÙ, Giorgio; BARZON, Luisa. Characterization of a new CDC73 missense mutation that impairs parafibromin expression and nucleolar localization. *Plos One*, v. 9, n. 5, p. e97994, 2014.
79. MCKENNA, A.; HANNA, M.; BANKS, E.; SIVACHENKO, A.; CIBULSKIS, K.; KERNYTSKY, A.; GARIMELLA, K.; ALTSHULER, D.; GABRIEL, S.; DALY, M.. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Research*, v. 20, n. 9, p. 1297-1303, 2010.
80. MELO-BRAGA, Marcella Nunes; IBÁÑEZ-VEA, María; KULEJ, Katarzyna; LARSEN; Martin R. comprehensive protocol to simultaneously study protein phosphorylation, acetylation, and N-linked sialylated glycosylation. In: POSCH, Anton. *Proteomic Profiling: methods and protocols*. 125. ed. Nova Iorque: Humana Press, 2015. Cap. 21. p. 275-292.
81. MERTINS, Philipp; TANG, Lauren C.; KRUG, Karsten; CLARK, David J.; GRITSENKO, Marina A.; CHEN, Lijun; CLAUSER, Karl R.; CLAUSS, Therese R.; SHAH, Punit; GILLETTE, Michael A. Reproducible workflow for multiplexed deepscale proteome and phosphoproteome analysis of tumor tissues by liquid chromatography–mass spectrometry. *Nature Protocols*, v. 13, n. 1, p. 1632-1661, 2018.
82. MEYERSON, Matthew; GABRIEL, Stacey; GETZ, Gad. Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 10, p. 685–696, 2010.
83. MINTZ, Sheldon; VELEZ, Ines. Central ossifying fibroma: an analysis of 20 cases and review of the literature. *Quintessence international*, v. 38, n. 3, p. 221–7, 2007.
84. MORGAN, Jessica M.; WONG, Alice; YELLOWLEY, Clare E.; GENETOS, Damian C.. Regulation of tenascin expression in bone. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 112, n. 11, p. 3354-3363, 2011.
85. MOORCRAFT, Sing Yu; GONZALEZ, David; WALKER, Brian A. Understanding next generation sequencing in oncology: a guide for oncologists. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, v. 96, n. 3, p.

- 463–474, 2015.
86. MURAMATSU, Y; A KAMEGAI,; SHIBA, T; SHRESTHA, P; TAKAI, Y; MORI, M; ILG, E; SCHAFFER, B; HEIZMANN, C. Histochemical characteristics of calcium binding S100 proteins and bone morphogenetic proteins in chondro-osseous tumors. *Oncology Reports*, v. 4, n. 1, p. 49–53, 1997.
87. NELSON, Brenda L.; PHILLIPS, Billy J. Benign Fibro-Osseous Lesions of the Head and Neck. *Head and Neck Pathology*, v. 13, n. 1, p. 466–475, 2019.
88. ONO, Akiko; TSUKAMOTO, Goichi; NAGATSUKA, Hitoshi; YOSHIHAMA, Yasuto; RIVERA, Rosario Santos; KATSURANO, Miki; YAO, Mayumi; SASAKI, Akira. An immunohistochemical evaluation of BMP-2, -4, osteopontin, osteocalcin and PCNA between ossifying fibromas of the jaws and peripheral cemento-ossifying fibromas on the gingiva. *Oral Oncology*, v. 43, n. 4, p. 339–344, 2007.
89. OSTASIEWICZ, Paweł; ZIELINSKA, Dorota F.; MANN, Matthias; WIŚNIEWSKI, Jacek R.. Proteome, phosphoproteome, and N-glycoproteome are quantitatively preserved in formalin-fixed paraffin-embedded tissue and analyzable by high-resolution mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, v. 9, n. 7, p. 3688-3700 2010.
90. PEREIRA, Thaís dos Santos Fontes; DINIZ, Marina Gonçalves; FRANÇA, Josiane Alves; MOREIRA, Rennan Garcias; MENEZES, Grazielle Helena Ferreira de; SOUSA, Sílvia Ferreira de; CASTRO, Wagner Henriques de; GOMES, Carolina Cavaliéri; GOMEZ, Ricardo Santiago. The Wnt/ β -catenin pathway is deregulated in cemento-ossifying fibromas. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 125, n. 2, p. 172–178, 2018a.
91. PEREIRA, Thaís dos Santos Fontes; BRITO, João Artur Ricieri; GUIMARÃES, André Luiz Sena; GOMES, Carolina Cavaliéri; LACERDA, Júlio Cesar Tanos de; CASTRO, Wagner Henriques de; COIMBRA, Roney Santos; DINIZ, Marina Gonçalves; GOMEZ, Ricardo Santiago. MicroRNA profiling reveals dysregulated microRNAs and their target gene regulatory networks in cemento-ossifying fibroma. *Journal of Oral*

- Pathology and Medicine*, v. 47, n. 1, p. 78–85, 2018b.
92. PEREIRA, Thaís dos Santos Fontes; GOMES, Carolina Cavalieri; A BRENNAN, Peter; FONSECA, Felipe Paiva; GOMEZ, Ricardo Santiago. Fibrous dysplasia of the jaws: Integrating molecular pathogenesis with clinical, radiological, and histopathological features. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 48, n. 1, p. 3-9, 2019a.
93. PEREIRA, Thaís dos Santos Fontes; AMORIM, Larissa Steffhane Damasceno; PEREIRA, Núbia Braga; VITÓRIO, Jéssica Gardone; DUARTE-ANDRADE, Filipe Fideles; GUIMARÃES, Letícia Martins; DINIZ, Marina Gonçalves; GOMES, Carolina Cavaliéri; GOMEZ, Ricardo Santiago. Oral pyogenic granulomas show MAPK/ERK signaling pathway activation, which occurs independently of BRAF, KRAS, HRAS, NRAS, GNA11, and GNA14 mutations. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 48, n. 10, p. 906-910, 2019b.
94. PIEHOWSKI, Paul D.; PETYUK, Vladislav A.; SONTAG, Ryan L.; GRITSENKO, Marina A.; WEITZ, Karl K.; FILLMORE, Thomas L.; MOON, Jamie; MAKHLOUF, Hala; CHUAQUI, Rodrigo F.; BOJA, Emily S. Residual tissue repositories as a resource for population-based cancer proteomic studies. *Clinical Proteomics*, v. 15, p. 26, 2018.
95. PIMENTA, Flávio Juliano; SILVEIRA, Letícia Ferreira Gontijo; TAVARES, Gabriela Cordeiro; SILVA, Andreza Campos; PERDIGÃO, Paolla Freitas; CASTRO, Wagner Henriques; GOMEZ, Marcus Vinícius; TEH, Bin Tean; MARCO, Luiz de; GOMEZ, Ricardo Santiago. HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. *Oral Oncology*, v. 42, n. 7, p. 735–739, 2006.
96. PINTO, Wladimir Bocca Vieira De Rezende; DE SOUZA, Paulo Victor Sgobbi; DOS SANTOS, Adrialdo José. Ossifying fibroma of the maxilla and tuberous sclerosis complex. *Neurology*, v. 84, n. 15, p. 1611–1612, 2015.
97. QURESHI, Madiha Bilal; TARIQ, Muhammad Usman; ABDUL-GHAFAR, Jamshid; RAZA, Muhammad; DIN, Nasir Ud. Concomitant bilateral mandibular cemento-ossifying fibroma and cementoblastoma: case report of an extremely rare occurrence. *BMC Oral Health*, v. 21, n. 1, p. 437, 2021.

98. POCATERRA, Arianna; ROMANI, Patrizia; DUPONT, Sirio. YAP/TAZ functions and their regulation at a glance. *Journal of Cell Science*, v. 133, n. 2, p. jcs230425, 2020.
99. RAIMONDO, Domenico; REMOLI, Cristina; ASTROLOGO, Letizia; BURLA, Romina; LATORRE, Mattia; VERNÌ, Fiammetta; TAGLIAFICO, Enrico; CORSI, Alessandro; GIUDICE, Simona del; PERSICHETTI, Agnese. Changes in gene expression in human skeletal stem cells transduced with constitutively active G α correlates with hallmark histopathological changes seen in fibrous dysplastic bone. *Plos One*, v. 15, n. 1, p. e0227279, 2020.
100. REGARD, J. B.; CHERMAN, N.; PALMER, D.; KUZNETSOV, S. A.; CELI, F. S.; GUETTIER, J.-M.; CHEN, M.; BHATTACHARYYA, N.; WESS, J.; COUGHLIN, S. R.. Wnt/ β -catenin signaling is differentially regulated by G proteins and contributes to fibrous dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 108, n. 50, p. 20101-20106, 2011.
101. REIMANN, Ene; KÖKS, Sulev; HO, Xuan Dung; MAASALU, Katre; MÄRTSON, Aare. Whole exome sequencing of a single osteosarcoma case--integrative analysis with whole transcriptome RNA-seq data. *Hum Genomics*, v. 8, n. 1, p. 20, 2014.
102. ROTROFF, Daniel M.; MOTSINGER-REIF, Alison A. Embracing integrative multiomics approaches. *International Journal of Genomics*, v. 2016, p. 1715985, 2016.
103. RUGGIERI, Martino; PAVONE, Vito; TINÉ, Alessandra; POLIZZI, Agata; MAGRO, Gaetano; DURAY, Paul H.; MERINO, Maria; ALBANESE, Vincenzo. Ossifying fibroma of the skull in a patient with neurofibromatosis type 1. *Journal of Neurosurgery*, v. 85, n. 5, p. 941–944, 2009.
104. SCHMIDT, Andreas; FORNE, Ignasi; IMHOF, Axel. Bioinformatic analysis of proteomics data. *BMC systems biology*, v. 8, n. Suppl 2, p. S3, 2014.
105. SHI, Rui-Rui; LI, Xue-Fen; ZHANG, Ran; CHEN, Yan; LI, Tie-Jun. GNAS mutational analysis in differentiating fibrous dysplasia and ossifying fibroma of the jaw. *Modern Pathology*, v. 26, n. 8, p. 1023–

- 1031, 2013.
106. SHMULY, Tom; ALLON, Dror M.; VERED, Marilena; CHAUSHU, Gavriel; SHLOMI, Benjamin; KAPLAN, Ilana. Can differences in vascularity serve as a diagnostic aid in fibro-osseous lesions of the jaws? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 75, n. 6, p. 1201-1208, 2017.
107. SPEIGHT, Paul M.; TAKATA, Takashi. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. *Virchows Archiv*, v. 472, n. 3, p. 331–339, 2018.
108. SOLARI, Fiorella A.; DELL'AICA, Margherita; SICKMANN, Albert; ZAHEDI, René P.. Why phosphoproteomics is still a challenge. *Molecular Biosystems*, v. 11, n. 6, p. 1487-1493, 2015.
109. STEPHENS, Philip J.; GREENMAN, Chris D.; FU, Beiyuan; YANG, Fengtang; BIGNELL, Graham R.; MUDIE, Laura J.; PLEASANCE, Erin D.; LAU, King Wai; BEARE, David; STEBBINGS, Lucy A.. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*, v. 144, n. 1, p. 27-40, 2011.
110. SU, Lan; WEATHERS, Dwight R.; WALDRON, Charles A. Distinguishing features of focal cemento-osseous dysplasia and cemento-ossifying fibromas I. A pathologic spectrum of 316 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, v. 84, n. 3, p. 301–309, 1997a.
111. SU, Lan; WEATHERS, Dwight R.; WALDRON, Charles A. Distinguishing features of focal cemento-osseous dysplasia and cemento-ossifying fibromas II. A clinical and radiologic spectrum of 316 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, v. 84, n. 5, p. 540–549, 1997b.
112. 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, 2016.
113. TABAREAU-DELALANDE, Flore; COLLIN, Christine; GOMEZ-BROUCHET, Anne; BOUVIER, Corinne; DECOUVELAERE, Anne-

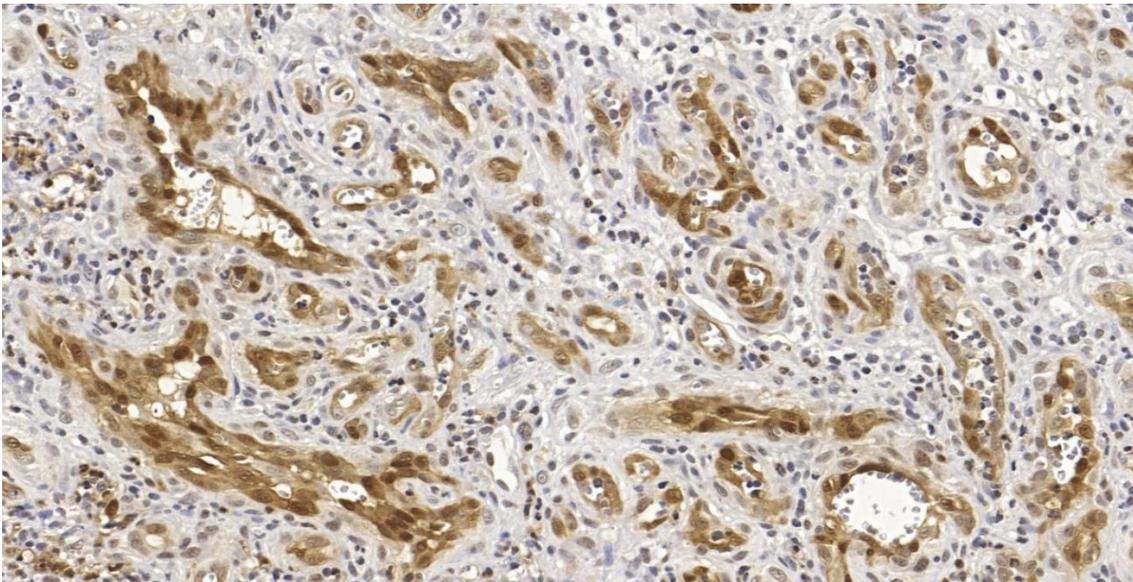
- Valérie; MURET, Anne de; PAGÈS, Jean-Christophe; PINIEUX, Gonzague de. Chromosome 12 long arm rearrangement covering MDM2 and RASAL1 is associated with aggressive craniofacial juvenile ossifying fibroma and extracranial psammomatoid fibro-osseous lesions. *Modern Pathology*, v. 28, n. 1, p. 48–56, 2015.
114. TABAREAU-DELALANDE, Flore; COLLIN, Christine; GOMEZ-BROUCHET, Anne; DECOUVELAERE, Anne-Valérie; BOUVIER, Corinne; LAROUSSERIE, Frédérique; MARIE, Béatrice; DELFOUR, Christophe; AUBERT, Sébastien; ROSSET, Philippe. Diagnostic value of investigating GNAS mutations in fibro-osseous lesions: a retrospective study of 91 cases of fibrous dysplasia and 40 other fibro-osseous lesions. *Modern Pathology*, v. 26, n. 7, p. 911–921, 2013.
115. THOUVEREY, Cyril; CAVERZASIO, Joseph. Focus on the p38 MAPK signaling pathway in bone development and maintenance. *BoneKEy Reports*, v. 4, p. 711, 2015.
116. TITINCHI, Fadi; MORTEL, Jean. Ossifying fibroma: analysis of treatment methods and recurrence patterns. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 74, n. 12, p. 2409–2419, 2016.
117. TOYOSAWA, Satoru; YUKI, Michiko; KISHINO, Mitsunobu; OGAWA, Yuzo; UEDA, Takafumi; MURAKAMI, Shumei; KONISHI, Eiichi; IIDA, Seiji; KOGO, Mikihiko; KOMORI, Toshihisa. Ossifying fibroma vs fibrous dysplasia of the jaw: molecular and immunological characterization. *Modern Pathology*, v. 20, n. 3, p. 389–396, 2007.
118. TRIJOLET, J.-P.; PARMENTIER, J.; SURY, F.; GOGA, D.; MEJEAN, N.; LAURE, B. Cemento-ossifying fibroma of the mandible. *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, v. 128, n. 1, p. 30–33, 2011.
119. VELTRINI, Vanessa Cristina; FIGUEIRA, Jéssica Araújo; SANTIN, Gabriela Cristina; SOUSA, Suzana Cantanhede Orsini Machado de; ARAÚJO, Ney Soares de. Can non-collagenous proteins be employed for the differential diagnosis among fibrous dysplasia, cemento-osseous dysplasia and cemento-ossifying fibroma? *Pathology - Research and Practice*, v. 215, n. 7, p. 152450, 2019.
120. SCHWÄMMLE, Veit; HAGENSEN, Christina E.; ROGOWSKA-

- WRZESINSKA, Adelina; JENSEN, Ole N. PolySTest: robust statistical testing of proteomics data with missing values improves detection of biologically relevant features. *Molecular Cell Proteomics*, v. 19, n. 8, p.1396-1408, 2020.
121. WAKABAYASHI, Masaki; YOSHIHARA, Hiroki; MASUDA, Takeshi; TSUKAHARA, Mai; SUGIYAMA, Naoyuki; ISHIHAMA, Yasushi. Phosphoproteome analysis of formalin-fixed and paraffin-embedded tissue sections mounted on microscope slides. *Journal of Proteome Research*, v. 13, n. 2, p. 915-924, 2013.
122. WAN-IBRAHIM, Wan I.; SINGH, Vivek A.; HASHIM, Onn H.; ABDUL-RAHMAN, Puteri S. Biomarkers for bone tumors: discovery from genomics and proteomics studies and their challenges. *Molecular Medicine*, v. 21, n. 1, p. 861–872, 2015.
123. WANG, Ting-Ting; ZHANG, Ran; WANG, Lin; CHEN, Yan; DONG, Qing; LI, Tie-Jun. Two cases of multiple ossifying fibromas in the jaws. *Diagnostic Pathology*, v. 9, p. 75, 2014.
124. WARR, Amanda; ROBERT, Christelle; HUME, David; ARCHIBALD, Alan; DEEB, Nader; WATSON, Mick. Exome sequencing: current and future perspectives. *G3(Bethesda)*, v. 5, n. 8, p. 1543–1550, 2015.
125. WILLFORSS, Jakob; CHAWADE, Aakash; LEVANDER, 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.
126. WRIGHT, John M.; VERED, Marilena. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. *Head and Neck Pathology*, v. 11, n. 1, p. 68–77, 2017.
127. WU, Ronghu; DEPHOURE, Noah; HAAS, Wilhelm; HUTTLIN, Edward L.; ZHAI, Bo; SOWA, Mathew E.; GYGI, Steven P. Correct interpretation of comprehensive phosphorylation dynamics requires normalization by protein expression changes. *Mol Cell Proteomics*, v. 10, n. 8, p. M111.009654, 2011.
128. YIH, Wei-Yung; PEDERSON, Gary T.; BARTLEY, Murray H..

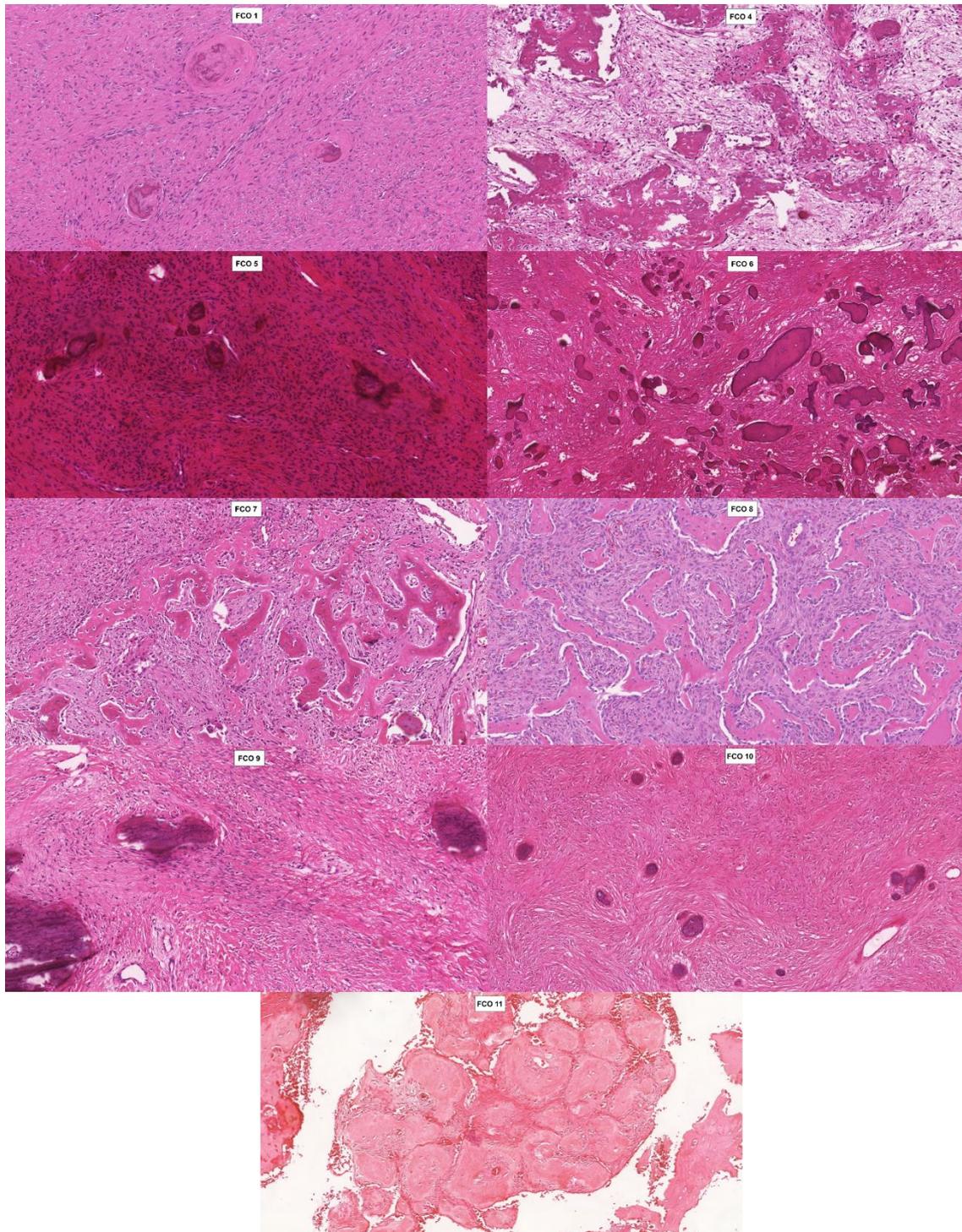
- Multiple familial ossifying fibromas: relationship to other osseous lesions of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 68, n. 6, p. 754-758, 1989.
129. YOHE, Sophia; THYAGARAJAN, Bharat. Review of clinical next-generation sequencing. *Arch Pathol Lab Med*, v. 141, n.11 p. 1544–1557, 2017.
130. ZHANG, Jun; CHIODINI, Rod; BADR, Ahmed; ZHANG, Genfa. The impact of next-generation sequencing on genomics. *J Genet Genomics*, v. 38, p. 95-109, 2011.
131. ZHANG, Tong-Han; LIU, Hai-Chao; LIAO, Gui-Qing; LIANG, Yu-Jie; CHU, Mei; WAN, Chang-Qing; LIANG, Li-Zhong; ZHENG, Guang-Sen. Detection of Notch signaling molecules in cemento-ossifying fibroma of the jaws. *J Oral Pathol Med*, v. 39, n. 3, p. 263–268, 2010.
132. ZHOU, Shang-Hui; YANG, Wen-Jun; LIU, Sheng-Wen; LI, Jiang; ZHANG, Chun-Ye; ZHU, Yun; ZHANG, CP. Gene expression profiling of craniofacial fibrous dysplasia reveals ADAMTS2 overexpression as a potential marker. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 7, n. 12, p. 8532-41, 2014.
133. ZEGALIE, Nour; SPEIGHT, Paul M.; MARTIN, Lisette. Ossifying fibromas of the jaws and craniofacial bones. *Diagnostic Histopathology*, v. 21, n. 9, p. 351–358, 2015.
134. ZENEYEDPOUR, Lona; STINGL, Christoph; DEKKER, Lennard J. M.; MUSTAFA, Dana A. M.; KROS, Johan M.; LUIDER, Theo M.. Phosphorylation ratio determination in fresh-frozen and formalin-fixed paraffin-embedded tissue with targeted mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, v. 19, n. 10, p. 4179-4190, 2020.

APÊNDICES

Apêndice 1 - Imagem representativa da análise da expressão imunohistoquímica de fosfo-Erk1/2 (fosfo-p42/44) em granuloma piogênico, que foi utilizado como controle positivo de marcação pelos anticorpos empregados no presente estudo.



Apêndice 2 - Imagens histopatológicas representativas dos casos de FCO empregados no estudo. Devido à dificuldade de aquisição de imagens com qualidade a partir de tecidos com alto grau de mineralização, alguns casos não estão representados no painel. Aumento de 10x.



Apêndice 3 - Lista dos genes envolvidos na patogênese de síndromes neurocutâneas

Síndrome	Gene(s) envolvido(s)
Buschke-Ollendorff	<i>LEMD3</i>
Complexo esclerose tuberosa	<i>TSC1, TSC2</i>
Lipomatose encefalocrâniocutânea	<i>FGFR1</i>
Neurofibromatose tipo 1	<i>NF1</i>
Retinoblastoma	<i>RB1</i>
Síndrome de Delleman	Desconhecido. Hipótese: herança ligada ao X
Síndrome HPT-JT	<i>CDC73</i>

A lista de genes foi obtida por meio de informações disponíveis no *OMIM*: <https://www.omim.org/> | *MedlinePlus*: <https://medlineplus.gov/> | *Genetic and Rare Diseases Information Center (GARD)*: <https://rarediseases.info.nih.gov/> e na literatura.

Apêndice 4 - Coletânea de informações relativas às implicações dos genes e as suas respectivas variantes que foram detectados como potencialmente envolvidos na patogênese do FCO. As informações utilizadas para construção desse painel foram obtidas de publicações científicas e também bases de dados públicas de dados.

<p>RANBP9</p> <p>Regulação negativa da cascata ERK1 AND ERK2 Organização do citoesqueleto Via de sinalização do receptor da superfície celular Regulação de desenvolvimento da medula óssea Alta expressão no osteossarcoma</p>	<p>p.Q11delinsPQ</p> <p>Detectada nos casos: FCO3, FCO4, FCO5 Adenocarcinoma de intestino grosso</p>	<p>ITGBL1</p> <p>Via de sinalização mediada por integrina Adesão focal Adesão célula-matriz Invasão e migração tumoral Imunomodulação tumoral Proliferação tumoral Metástase óssea</p>	<p>p.G86R</p> <p>Detectada no caso: FCO5</p> <p>COSMIC: Carcinoma adenoescamoso misto de pulmão Carcinoma de células escamosas de pulmão Carcinoma mucoepidermoide de pulmão</p>
<p>FGFR1</p> <p>Via de sinalização do receptor do fator de crescimento de fibroblastos Regulação positiva da via de sinalização MAP quinase Regulação positiva da proliferação da população celular Regulação positiva da diferenciação celular Gene altamente mutado em processos neoplásicos</p>	<p>p.P26L</p> <p>Detectada no caso: FCO2</p>	<p>ESX1</p> <p>Vias de sinalização regulando a pluripotência de células-tronco Gene mutado em amostras de osteossarcoma</p>	<p>p.P347R</p> <p>Detectada nos casos: FCO3, FCO7, FCO9, FOC10, FCO11</p> <p>COSMIC: Carcinoma hepatocelular Leucemia mieloide aguda Câncer de tireoide Sarcoma Melanoma maligno Carcinoma da vesícula biliar Carcinoma adenoescamoso misto de pulmão</p>
<p>KRAS</p> <p>Regulação positiva da proliferação da população celular Regulação negativa da diferenciação celular Regulação positiva da senescência celular Regulação positiva da expressão gênica Cascata MAPK Gene altamente mutado em processos neoplásicos</p>	<p>p.L19F</p> <p>Detectada no caso: FCO8</p> <p>COSMIC: Leucemia mielomonocítica crônica Síndrome mielodisplásica Adenocarcinoma da vesícula biliar Linfoma difuso de grandes células B Adenocarcinoma de intestino grosso Leucemia linfocítica crônica - linfoma linfocítico de pequenas células Adenocarcinoma de pulmão</p>	<p>CDC73</p> <p>Organização do citoesqueleto de actina Ciclo celular Via de sinalização WNT Regulação negativa da proliferação de fibroblastos Regulação negativa da proliferação da população celular Altamente mutado no HPT-JT Alterações neste gene já foram descritas em diversos estudos de FCO</p>	<p>p.E24Kfs*2 p.G416_V421delGTAISV</p> <p>Detectada no caso: FCO5</p> <p>COSMIC: Câncer de paratireoide Fibroma cimento-ossificante</p>

LEGENDA

Participação em processos biológicos com potencial relevância à patogênese do FCO

Alteração diferente na mesma posição detectada em amostras de tumores malignos

Descrição no COSMIC da presença da alteração identificada por WES em outros

Compilação de dados da literatura sobre potenciais funções na biologia óssea ou tumorigênese

Apêndice 5 - Lista das vias significativamente enriquecidas utilizando as proteínas mais abundantes na displasia fibrosa

Fonte da via biológica	Nome da via biológica	Valor-p	Valor de FDR
REACTOME	Associação de TriC/CCT com proteínas-alvo durante a biossíntese	7.37x10 ⁻⁰⁷	3.85x10 ⁻⁰⁴
REACTOME	Resposta ao Ca ²⁺ citosólico plaquetário elevado	3.51x10 ⁻⁰⁶	6.11x10 ⁻⁰⁴
REACTOME	Degranulação de plaquetas	2.88x10 ⁻⁰⁶	7.51x10 ⁻⁰⁴
PID	Eventos de sinalização mediados por sindecano-4	2.96x10 ⁻⁰⁵	3.87x10 ⁻⁰³
REACTOME	Ativação, sinalização e agregação plaquetária	9.59x10 ⁻⁰⁵	6.26x10 ⁻⁰³
REACTOME	Dobramento de proteína mediado por chaperonina	7.27x10 ⁻⁰⁵	6.33x10 ⁻⁰³
REACTOME	Dobramento de proteína	7.27x10 ⁻⁰⁵	6.33x10 ⁻⁰³
REACTOME	Cooperação de PDCL (PhLP1) e TriC/CCT no dobramento beta da proteína G	6.77x10 ⁻⁰⁵	7.07x10 ⁻⁰³
REACTOME	Eritrócitos absorvem oxigênio e liberam dióxido de carbono	1.26x10 ⁻⁰⁴	7.29x10 ⁻⁰³
REACTOME	Organização de matriz extracelular	1.55x10 ⁻⁰⁴	8.11x10 ⁻⁰³
REACTOME	Eritrócitos captam oxigênio e liberam dióxido de carbono	2.71x10 ⁻⁰⁴	1.29x10 ⁻⁰²
REACTOME	Trocas de O ₂ /CO ₂ em eritrócitos	2.71x10 ⁻⁰⁴	1.29x10 ⁻⁰²
KEGG	Adesão focal	5.05x10 ⁻⁰⁴	1.55x10 ⁻⁰²
REACTOME	Metabolismo de proteínas	4.02x10 ⁻⁰⁴	1.62x10 ⁻⁰²
KEGG	Interação matriz extracelular-receptor	4.97x10 ⁻⁰⁴	1.62x10 ⁻⁰²
KEGG	Cascatas do complemento e de coagulação	4.45x10 ⁻⁰⁴	1.66x10 ⁻⁰²
WikiPathways	Adesão focal	4.96x10 ⁻⁰⁴	1.72x10 ⁻⁰²
WikiPathways	Sistema do complemento humano	8.11x10 ⁻⁰⁴	2.35x10 ⁻⁰²
REACTOME	Direcionamento de carga ao cílio mediada pelo BBsome	8.68x10 ⁻⁰⁴	2.39x10 ⁻⁰²
REACTOME	Hemostase	1.11x10 ⁻⁰³	2.76x10 ⁻⁰²
KEGG	Secreção de ácido dos ductos coletores	1.20x10 ⁻⁰³	2.85x10 ⁻⁰²
PID	Sinalização endógena de TLR	1.11x10 ⁻⁰³	2.90x10 ⁻⁰²
INOH	Integrina	1.65x10 ⁻⁰³	3.44x10 ⁻⁰²
OntoCancro	Apoptose - expandida	1.58x10 ⁻⁰³	3.45x10 ⁻⁰²
PID	Sinalização por integrina amb2	1.58x10 ⁻⁰³	3.59x10 ⁻⁰²
REACTOME	SLC4A1 defeituoso causa esferocitose hereditária tipo 4 (HSP4), acidose renal tubular distal (dRTA) e dRTA com anemia hemolítica (dRTA-HÁ)	1.91x10 ⁻⁰³	3.70x10 ⁻⁰²
PID	Eventos de sinalização de integrina alfa4 beta 1	1.90x10 ⁻⁰³	3.82x10 ⁻⁰²

Abreviações: PID: *the Pathway Interaction Database*; INOH: *The Integrating Network Objects with Hierarchies*; TLR: *toll like receptors*; TriC/CCT: *TCP1-ring complex or chaperonin containing TCP1*; PDCL: *phosducin-like protein*

Apêndice 6 – Lista dos processos significativamente enriquecidos utilizando as proteínas aumentadas no fibroma cemento ossificante e na displasia fibrosa

Quadro A. Processos potencialmente aumentados no fibroma cemento-ossificante

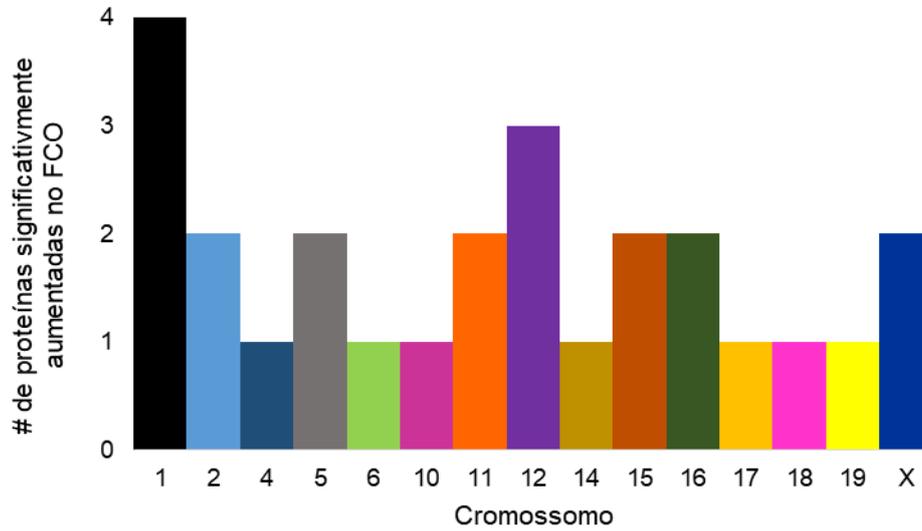
Processo biológico	P-valor	P-valor ajustado
Sequestro de monômeros de actina (GO:0042989)	7.27x10 ⁻⁰⁵	0.019036614
Transporte nuclear (GO:0051169)	1.93x10 ⁻⁰⁴	0.021107346
Direcionamento cotraducional de proteínas à membrana (GO:0006613)	2.42x10 ⁻⁰⁴	0.021107346
Regulação negativa da polimerização de filamentos de actina (GO:0030837)	4.79x10 ⁻⁰⁴	0.031349876
Processo biossintético de macromoléculas celulares (GO:0034645)	6.78x10 ⁻⁰⁴	0.035541788
Expressão gênica (GO:0010467)	0.001082427	0.047265998

Quadro B. Processos potencialmente aumentados na displasia fibrosa

Processo biológico	P-valor	P-valor ajustado
Desmontagem da matriz extracelular (GO:0022617)	0.003064	0.039108
Desmontagem do componente celular (GO:0022411)	0.003064	0.039108
Regulação negativa do processo apoptótico (GO:0043066)	0.002883	0.039104
Organização da estrutura extracelular (GO:0043062)	0.002398	0.034009
Organização de estrutura de encapsulamento externo (GO:0045229)	0.002429	0.034009
Regulação da produção de interleucina-12 (GO:0032655)	0.001842	0.027568
Regulação negativa da coagulação sanguínea (GO:0030195)	0.001136	0.017615
Regulação negativa da adesão célula-substrato (GO:0010812)	0.001136	0.017615
Regulação do pH intracelular (GO:0051453)	9.73x10 ⁻⁰⁴	0.016235
Transporte de bicarbonato (GO:0015701)	8.70x10 ⁻⁰⁴	0.015107
Regulação do pH celular (GO:0030641)	6.82x10 ⁻⁰⁴	0.012336
Regulação da ativação dos macrófagos (GO:0043030)	6.39x10 ⁻⁰⁴	0.012051
Regulação positiva da ativação de leucócito (GO:0002696)	2.53x10 ⁻⁰⁴	0.004995
Regulação positiva da coagulação sanguínea (GO:0030194)	2.02x10 ⁻⁰⁴	0.004168
Regulação positiva da ativação de macrófagos (GO:0043032)	2.02x10 ⁻⁰⁴	0.004168
Regulação da fibrinólise (GO:0051917)	1.16x10 ⁻⁰⁴	0.00265
Regulação positiva da localização da proteína no núcleo (GO:1900182)	8.19x10 ⁻⁰⁵	0.001976
Estabilização de proteína (GO:0050821)	6.78x10 ⁻⁰⁵	0.00173

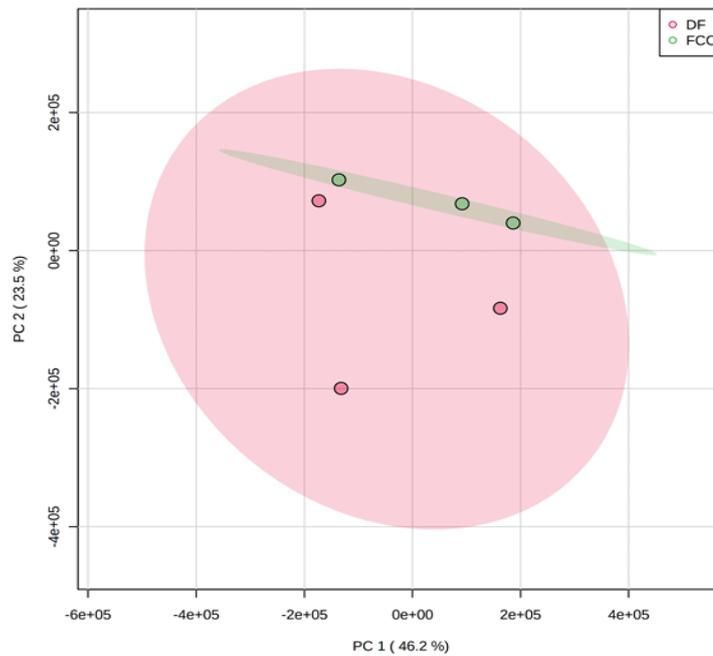
Processo biológico	P-valor	P-valor ajustado
Regulação da manutenção dos telômeros pela telomerase (GO:0032210)	3.66x10 ⁻⁰⁵	0.001135
Organização da matriz extracelular (GO:0030198)	3.05x10 ⁻⁰⁵	0.001018
Regulação da manutenção dos telômeros pelo alongamento dos telômeros (GO:1904358)	1.20x10 ⁻⁰⁵	4.34 x10 ⁻⁰⁴
Regulação da manutenção dos telômeros pela telomerase (GO:0032212)	9.18x10 ⁻⁰⁶	3.62 x10 ⁻⁰⁴
Exocitose regulada (GO:0045055)	2.56x10 ⁻⁰⁶	1.11 x10 ⁻⁰⁴
Regulação positiva do estabelecimento da localização proteica (GO:1904951)	1.65x10 ⁻⁰⁶	7.96 x10 ⁻⁰⁵
Regulação da localização do RNA da telomerase para o corpo de Cajal (GO:1904872)	1.39x10 ⁻⁰⁶	7.54x10 ⁻⁰⁵
Regulação positiva da localização do RNA da telomerase para o corpo de Cajal (GO:1904874)	7.77x10 ⁻⁰⁷	4.82x10 ⁻⁰⁵
Regulação positiva do estabelecimento da localização da proteína no telômero (GO:1904851)	2.06x10 ⁻⁰⁷	3.06x10 ⁻⁰⁵
Regulação do estabelecimento da localização da proteína no telômero (GO:0070203)	2.83x10 ⁻⁰⁷	3.06x10 ⁻⁰⁵
Regulação positiva da proteína no corpo de Cajal (GO:1904871)	2.83x10 ⁻⁰⁷	3.06x10 ⁻⁰⁵
Regulação negativa da proteína no corpo de Cajal (GO:1904869)	2.83x10 ⁻⁰⁷	3.06x10 ⁻⁰⁵
Regulação positiva da localização da proteína no cromossomo, região telomérica (GO:1904816)	3.77x10 ⁻⁰⁷	3.06x10 ⁻⁰⁵
Degranulação de plaquetas (GO:0002576)	4.23x10 ⁻⁰⁷	3.06x10 ⁻⁰⁵
Regulação negativa da fibrinólise (GO:0051918)	5.37x10 ⁻⁰⁵	0.001554
Regulação positiva do processo biossintético do DNA (GO:2000573)	5.92x10 ⁻⁰⁵	0.001605

Apêndice 7 – Avaliação realizada com o intuito de avaliar se as alterações descritas ao nível genômico no FCO são refletidas em seu perfil proteômico. Esse gráfico foi construído com todas as proteínas significativamente mais abundantes no FCO em comparação com a DF.

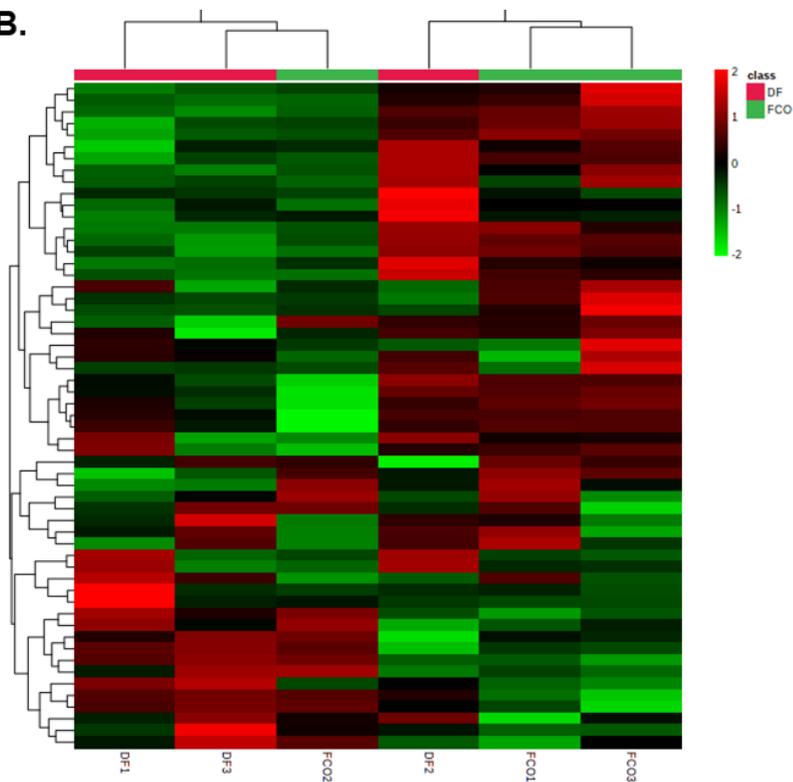


Apêndice 8 – Análises multivariadas demonstram que o perfil fosfoproteômico do FCO e da DF são similares. Gráficos construídos a partir da intensidade normalizada de todos os fosfopeptídeos identificados. **A.** Análise de componentes principais (PCA). **B.** *Heatmap*. Siglas: PC: *Principal component* (componente principal).

A.



B.



ANEXOS

Anexo 1 – Pareceres Consubstanciados do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análises moleculares do fibroma cemento-ossificante

Pesquisador: Ricardo Santiago Gomez

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 99674818.8.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.980.446

Continuação do Parecer: 2.980.446

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1202467.pdf	18/09/2018 12:10:04		Aceito
Outros	Carta_resposta.jpg	18/09/2018 12:09:39	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_corrigido.docx	18/09/2018 12:09:06	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	cartadepartamento.pdf	31/08/2018 11:14:59	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	31/08/2018 11:11:46	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	Parecer.pdf	31/08/2018 11:05:53	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	29/08/2018 15:04:52	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	29/08/2018 14:51:39	Ricardo Santiago Gomez	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 24 de Outubro de 2018

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DO PERFIL MOLECULAR DAS LESÕES FIBRO-ÓSSEAS DO ESQUELETO CRANIOFACIAL POR MEIO DE ENSAIOS ÔMICOS

Pesquisador: Ricardo Santiago Gomez

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 2

CAAE: 43925221.9.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.697.577

Continuação do Parecer: 4.697.577

Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	21/04/2021 14:14:42	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	Termo_biorrepositorio.pdf	01/03/2021 17:47:24	Ricardo Santiago Gomez	Aceito
Outros	Parecer_consubstanciado_departamento.pdf	01/03/2021 17:42:13	Ricardo Santiago Gomez	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 07 de Maio de 2021

Assinado por:
Corinne Davis Rodrigues
(Coordenador(a))