

**THAÍS DOS SANTOS FONTES PEREIRA**

**ESTUDO GENÉTICO E EPIGENÉTICO DO FIBROMA CEMENTO-  
OSSIFICANTE**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2017**

Thaís dos Santos Fontes Pereira

## **ESTUDO GENÉTICO E EPIGENÉTICO DO FIBROMA CEMENTO- OSSIFICANTE**

Tese apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia - área de Concentração em Patologia bucal.

**Orientador: Prof. Ricardo Santiago Gomez.**

**Coorientador: Prof.<sup>a</sup> Marina Gonçalves Diniz**

Belo Horizonte

2017

## Ficha Catalográfica

P436e    Pereira, Thaís dos Santos Fontes .  
2017        Estudo genético e epigenético do fibroma cemento-  
T        ossificante / Thaís dos Santos Fontes Pereira. -- 2017.

135 f. : il.

Orientador: Ricardo Santiago Gomez.  
Coorientadora: Marina Gonçalves Diniz.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

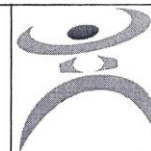
1. Fibroma ossificante. 2. Neoplasias ósseas. 3. MicroRNAs . 4. Beta catenina . I. Gomez, Ricardo Santiago. II. Diniz, Marina Gonçalves . III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



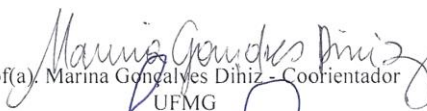
## FOLHA DE APROVAÇÃO

**Estudo genético e epigenético do fibroma cemento-ossificante**


**THAÍS DOS SANTOS FONTES PEREIRA**


Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Doutor, área de concentração Patologia Bucal.

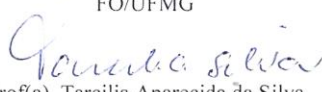
Aprovada em 13 de novembro de 2017, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Marina Gonçalves Diniz - Coorientador  
UFMG

  
Prof(a). Fabrício Rezende do Amaral  
FEAD

  
Prof(a). Jeane de Fátima Correia Silva Alves  
Centro Universitário Newton Paiva

  
Prof(a). Patricia Carlos Caldeira  
FO/UFMG

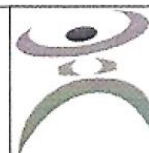
  
Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva  
FO/UFMG

Belo Horizonte, 13 de novembro de 2017.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## ATA DA DEFESA DE TESE DA ALUNA THAÍS DOS SANTOS FONTES PEREIRA

Aos 13 dias de novembro de 2017, às 14:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores Marina Gonçalves Diniz (Coorientadora) – UFMG, Fabrício Rezende do Amaral – FEAD, Jeane de Fátima Correia Silva Alves - Centro Universitário Newton Paiva, Patricia Carlos Caldeira – FO/UFMG e Tarcília Aparecida da Silva – FO/UFMG, para julgamento da tese de Doutorado em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal, intitulada: **Estudo genético e epigenético do fibroma cimento-ossificante**. A Presidente da Banca, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pela aluna e arguição pelos membros da banca, a Comissão Examinadora considerou a tese:

Aprovada

Reprovada

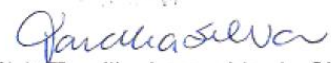
Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 13 de novembro de 2017.

  
Prof(a). Marina Gonçalves Diniz

  
Prof(a). Fabrício Rezende do Amaral

  
Prof(a). Jeane de Fátima Correia Silva Alves

  
Prof(a). Patricia Carlos Caldeira

  
Prof(a). Tarcília Aparecida da Silva

Dedico esse trabalho à minha querida  
família.

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais, Lídia e Éder, minha irmã, Lílian e minha avó, Lourdes, pelo contínuo apoio, educação e valores que me ensinaram através do exemplo.

Ao Pedro pelo carinho e companheirismo.

Ao Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez pela oportunidade e exemplo de profissionalismo.

À Prof. Dr.<sup>a</sup> Marina Diniz Gonçalves pela atenção e por transmitir importantes ensinamentos.

Aos professores Dr.<sup>a</sup> Carolina Cavalieri Gomes, Dr. André Luiz Sena Guimarães e ao pesquisador Dr. Roney Santos Coimbra pela colaboração atenciosa.

Aos professores Dr. Fabrício Amaral e Dr. Dawidson Assis Gomes pela produtiva participação na banca de qualificação.

Aos colegas do laboratório de biologia molecular, em especial João Artur, Silvia e Josiane pela dedicação e por compartilharem sua experiência.

Aos laboratórios multiusuários do departamento de bioquímica e imunologia e de Genômica do ICB pelo uso dos equipamentos e pelo auxílio na técnica de NGS, em especial ao Rennan Garcias Moreira.

Aos professores da Faculdade de Odontologia e do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

Aos colegas de graduação, iniciação científica, mestrado e doutorado pelo apoio e amizade.

Aos funcionários do laboratório de Anatomia Patológica da FO-UFMG, pelo apoio sempre que necessário.

Aos pacientes e familiares que gentilmente colaboraram para a realização desse trabalho.

*“Ao menos que saibamos o que procuramos, o salvemos adequadamente e o contextualizemos, é como se nunca o tivéssemos visto. Não tem sentido termos um monte de dados à disposição se não pudermos entendê-los. E isso exige pensamento, reflexão e investigação.”*

Noam Chomsky



## RESUMO

Fibroma cemento-ossificante (FCO) é uma neoplasia odontogênica benigna cuja patogenia não é bem estabelecida. Para o estudo molecular do FCO realizamos sequenciamento de nova geração (SNG) em sete casos utilizando o painel Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, que investiga 2.855 mutações em 207 amplicons de 50 genes. Uma análise dos níveis transcricionais de 44 genes pertencentes à via Wnt/ $\beta$ -catenina foi realizada em seis espécimes de FCO e em seis de osso saudável. O perfil de expressão de miRNAs foi estabelecido em nove amostras de FCO e dez controles através do painel TaqMan® OpenArray® Human MicroRNA, contendo 754 miRNAs. Ferramentas de bioinformática foram usadas para definição de genes líderes, além da investigação de vias de sinalização reguladas pelo conjunto de miRNAs diferentemente expressos no FCO. O SNG revelou cinco variantes de nucleotídeo único: TP53 (rs1042522), PIK3CA (rs2230461), MET (rs33917957), KIT (rs3822214) e APC (rs33974176), mas nenhuma mutação patogênica. A análise de expressão gênica revelou quatro genes com expressão aumentada (CTNNB1, TCF7, NKD1 e WNT5A) e oito subexpressos no FCO (CTNNBIP1, FRZB, FZD6, RHOA, SFRP4, WNT10A, WNT3A e WNT4), sugerindo ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. O perfil de expressão de miRNAs demonstrou onze miRNAs subexpressos (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, hsa-miR-200c-3p) e cinco superexpressos (hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-199a-3p) no FCO. Os genes alvos de miRNAs, XIAP, EZH2, MET e TGFBR1 foram identificados como genes líderes. Enquanto nenhuma mutação oncogênica foi detectada a desregulação de genes chaves da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina e de miRNAs pode estar envolvida na patogênese do FCO. Os genes XIAP, EZH2, MET e TGFBR são potenciais alvos para validação funcional.

**Palavras-chave:** Fibroma cemento-ossificante; Neoplasias ósseas; MicroRNAs;  $\beta$ -catenina.

## ABSTRACT

### Genetic and epigenetic study of cemento-ossifying fibroma

Cemento-ossifying fibroma (COF) is an odontogenic neoplasm with an uncertain pathogenesis. We performed the next generation sequencing (NGS), using the Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, which investigate 2855 mutations in 207 amplicons of 50 genes in seven COF samples. Moreover, we performed a transcriptional analysis of 44 genes of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in six COF samples and six controls of healthy jaw bones. The miRNAs expression profile was established in nine COF cases and ten control samples using the TaqMan® OpenArray® Human MicroRNA panel containing 754 validated human miRNAs. Bioinformatics tools were used to determinate the leader genes and to investigate the signaling pathways regulated by differently expressed miRNAs in COF. NGS revealed five SNV: *TP53* (rs1042522), *PIK3CA* (rs2230461), *MET* (rs33917957), *KIT* (rs3822214) and *APC* (rs33974176), but no pathogenic mutation. The expression assay revealed twelve genes of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway differentially expressed in COF compared to healthy bone, including up-regulation of *CTNNB1*, *TCF7*, *NKD1* and *WNT5A*, and down-regulation of *CTNNBIP1*, *FRZB*, *FZD6*, *RHOU*, *SFRP4*, *WNT10A*, *WNT3A* and *WNT4*. This gene expression profile suggests the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. Expression profiling revealed eleven down-regulated miRNAs (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, hsa-miR-200c-3p) and five up-regulated (hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-199a-3p) in COF. The miRNAs target genes *XIAP*, *EZH2*, *MET* and *TGFBR1* were defined as leader genes. While no oncogenic mutation was detected in the 50 cancer genes investigated by NGS, deregulation of miRNAs and key genes associated with Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway appears to be relevant to the molecular pathogenesis of COF. The genes *XIAP*, *EZH2*, *MET* and *TGFBR* are potential targets for functional analysis validation.

**Keywords:** Fibroma, cemento-ossifying. Bone Neoplasms. MicroRNAs. Beta Catenin.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b> Caracterização dos casos de FCO incluídos no estudo.....	45
<b>Tabela 2:</b> Características dos indivíduos incluídos no grupo controle.....	46
<b>Tabela 3:</b> Variantes detectadas pelo sequenciamento de nova geração nos casos de FCO.....	47
<b>Tabela 4:</b> Genes diferencialmente expressos no FCO.....	48
<b>Tabela 5:</b> miRNAs significativamente desregulados no FCO.....	51
<b>Tabela 6:</b> Sumário dos genes alvos de miRNAs mais relevantes presentes nos mapas de vias Kegg e expressos no FCO e em tipos celulares presentes no tecido ósseo.....	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Aspecto histopatológico do FCO. ....	24
<b>Figura 2:</b> Esquema do controle do ciclo celular. ....	27
<b>Figura 3:</b> Esquema da via de sinalização Wnt canônica.....	30
<b>Figura 4:</b> Esquema das vias de sinalização Wnt não canônicas. ....	31
<b>Figura 5:</b> Biogênese de miRNAs.....	34
<b>Figura 6:</b> Fluxograma de amostras. ....	38
<b>Figura 7:</b> Quantificação relativa ( <i>fold-change</i> ) média dos genes diferencialmente expressos no FCO.....	49
<b>Figura 8:</b> <i>Box plot</i> do conjunto de valores de <i>threshold</i> relativo ( $C_{RT}$ ) de cada amostra de FCO e de osso sadio. ....	50
<b>Figura 9:</b> Gráfico da expressão de miRNAs.....	52
<b>Figura 10:</b> <i>Volcano plot</i> do grupo FCO, utilizando como grupo de referência as amostras de osso sadio.....	53
<b>Figura 11:</b> Análise de <i>networks</i> , exibindo <i>heatmap</i> e gráfico de conectividade relacionada à doença (WNL, <i>weighted number of links</i> ) versus conectividade global (TIS, <i>Total Interactions Score</i> ).....	54
<b>Figura 12:</b> Análise ontológica.....	55
<b>Figura 13:</b> Análise de enriquecimento de vias. ....	56
<b>Figura 14:</b> Mapa de vias em câncer ( <i>Pathways in cancer</i> , hsa05200).....	59
<b>Figura 15:</b> Mapa de proteoglicanos em câncer ( <i>Proteoglycans in cancer</i> , hsa05205). .....	60

## LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AKT1	<i>AKT serine/threonine kinase 1</i>
AKT2	<i>AKT serine/threonine kinase 2</i>
AKT3	<i>AKT serine/threonine kinase 3</i>
APC	<i>Adenomatous polyposis coli</i>
ATL	<i>Tissue lysis buffer</i>
AXIN1	<i>Axin 1</i>
BCL2	<i>B-cell CLL/lymphoma 2</i>
BCL6	<i>B-cell CLL/lymphoma 6</i>
BMP	<i>Bone morphogenetic protein</i>
C	Célcios
C11orf30	<i>Chromosome 11 open reading frame 30</i>
CAP	<i>Adenylate cyclase-associated protein</i>
CAV2	<i>Caveolin 2</i>
CBL	<i>Cbl proto-oncogene</i>
CDC73	<i>Cell division cycle 73</i>
CDKs	Quinases dependientes de ciclinas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar (DNA complementar)
CK1	Quinase 1
CKIs	Ciclinas e inhibidores de cdk
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
CREG1	<i>Cellular repressor of E1A stimulated genes 1</i>
CRT	<i>Relative treshold</i>
CSNK1A1	<i>Casein kinase 1, alpha 1</i>
Ct	<i>Threshould cycle</i>
CTNNB1	<i>Catenin (cadherin-associated protein), beta 1</i>
CTNNB1	<i>Catenin beta 1</i>
CTNNBIP1	<i>Catenin, beta interacting protein 1</i>
DACT3	<i>Dishevelled-binding antagonist of beta-catenin 3</i>
Dicer	<i>Dicer 1, ribonuclease type III</i>
DKK1	<i>Dickkopf homolog 1</i>

DKKs	<i>Dickkopfs</i>
DMD	<i>Dystrophin</i>
DNA	<i>Ácido desoxirribonucleico</i>
DNAse	<i>Desoxirribonuclease</i>
Drosha	<i>Rnase III endonuclease</i>
DVL	<i>Dishevelled</i>
DVL1	<i>Dishevelled, dsh homolog 1</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGLN2	<i>Egl-9 family hypoxia-inducible factor 2</i>
ERBB2	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERBB2	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2</i>
ERBB3	<i>Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3</i>
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	<i>Enhancer of zeste homolog 2</i>
FCO	Fibroma cemento-ossificante
FGF4	<i>Fibroblast growth factor 4</i>
FN1	<i>Fibronectin 1</i>
FOJ	Fibroma ossificante juvenil
FOXP3	<i>Forkhead box P3</i>
FRAT1	<i>Frequently rearranged in advanced T-cell lymphomas</i>
FRZB	<i>Frizzled-related protein</i>
FZD1	<i>Frizzled family receptor 1</i>
FZD2	<i>Frizzled family receptor 2</i>
FZD3	<i>Frizzled family receptor 3</i>
FZD6	<i>Frizzled family receptor 6</i>
FZD8	<i>Frizzled family receptor 8</i>
g	Grama
G0	<i>Gap 0</i>
G1	<i>Gap 1</i>
G2	<i>Gap 2</i>
GNAS1	<i>Guanine nucleotide binding protein, alpha 1</i>
GSK3A	<i>Glycogen synthase kinase 3 alpha</i>

GSK3B	<i>Glycogen synthase kinase 3 beta</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HRAS	<i>HRas proto-oncogene, GTPase</i>
INDEL	Inserção/deleção
INPPL1	<i>Inositol polyphosphate phosphatase like 1</i>
ISPs	<i>ION sphere particles</i>
KRAS	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
LEF1	<i>Lymphoid enhancer-binding factor 1</i>
LRP1	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 1</i>
LRP5	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
LRP6	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 6</i>
M	Mitose
M	Molar
MAF	<i>Minor allele frequency</i>
MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
MDM2	<i>MDM2 proto-oncogene, E3 ubiquitin protein ligase</i>
MET	<i>MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>
µg	Micrograma
MgCl <sub>2</sub>	Cloreto de magnésio
min	Minuto
miR	miRNA
miRNA	microRNA
MITF	<i>Melanogenesis associated transcription factor</i>
µL	Microlitro
mL	Mililitro
MMP16	<i>Matrix metalloproteinase 16</i>
MMP2	<i>Matrix metalloproteinase 2</i>
mRNA	Ácido ribonucleico mensageiro
MYC	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog</i>
ng	Nano grama
NKD1	<i>Naked cuticle homolog 1</i>
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
NRAS	<i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>

OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial de hidrogênio
PHLPP2	<i>PH domain and leucine rich repeat protein phosphatase 2</i>
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
PITX2	<i>Paired-like homeodomain 2</i>
PLD1	<i>Phospholipase D1</i>
PPP2CA	<i>Protein phosphatase 2, catalytic subunit, alpha isozyme</i>
pre-miRNA	miRNA precursor
pri-miRNA	miRNA primário
PTEN	<i>Phosphatase and tensin homolog</i>
PTK2	<i>Protein tyrosine kinase 2</i>
PTPN11	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>
PTPRM	<i>Protein tyrosine phosphatase, receptor type M</i>
qPCR	PCR quantitativo
RAC1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RASA1	<i>RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1</i>
RASAL1	<i>RAS protein activator like 1</i>
RDX	<i>Radixin</i>
RHO	<i>Rhodopsin</i>
RHOA	<i>Ras homolog family member A</i>
RHOA	<i>Ras homolog family member A</i>
RHOU	<i>Ras homolog gene family, member U</i>
RISC	<i>RNA-induced silencing complex</i>
RNA	Ácido ribonucléico
RNase	Ribonuclease
s	Segundo
S	Síntese
SFRP1	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>
SFRP4	<i>Secreted frizzled-related protein 4</i>
SFRPs	Proteínas secretatas Frizzled relacionadas
SNG	Sequenciamento de nova geração



SMAD1	<i>SMAD family member 1</i>
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
SMO	<i>Smoothened, frizzled class receptor</i>
SNV	<i>Single nucleotide variation</i>
TCF4	<i>Transcription factor 4</i>
TCF7	<i>Transcription factor 7</i>
TCF7L1	<i>Transcription factor 7-like 1</i>
TCLE	<i>Termo de consentimento livre e esclarecido</i>
TGFBR1	<i>Transforming Growth Factor Beta Receptor 1</i>
THBS1	<i>Thrombospondin 1</i>
TLE1	<i>Transducin-like enhancer of split 1</i>
TOC	<i>Tumor odontogênico ceratocístico</i>
Tp53	<i>tumor protein p53</i>
Ubc13	<i>Ubiquitin conjugating enzyme E2N</i>
UFMG	<i>Universidade Federal de Minas Gerais</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFA	<i>Vascular endothelial growth factor A</i>
WIF1	<i>WNT inhibitory factor 1</i>
WNT1	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 1</i>
WNT10A	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 10A</i>
WNT11	<i>Wingless-type MMTV integration site family, member 11</i>
WNT2	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 2</i>
WNT2B	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 2B</i>
WNT3	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 3</i>
WNT3A	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 3A</i>
WNT4	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 4</i>
WNT5A	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 5A</i>
WNT5B	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 5B</i>
WNT6	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 6</i>
WNT8A	<i>Wingless-type MMTV integration site family member 8A</i>
XIAP	<i>X-linked inhibitor of apoptosis protein</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1	Fibroma cemento-ossificante.....	21
2.1.1	Classificação.....	21
2.1.2	Diagnóstico.....	21
2.1.3	Características histopatológicas.....	23
2.1.4	Tratamento e prognóstico.....	25
2.2	Alterações moleculares no fibroma cemento-ossificante.....	25
2.3	Via Wnt/ $\beta$ -catenina.....	29
2.4	miRNA.....	33
3	OBJETIVOS.....	36
3.1	Objetivo geral.....	36
3.2	Objetivos específicos.....	36
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	37
4.1	Aspectos éticos.....	37
4.2	Pacientes e amostras.....	37
4.3	Critérios de elegibilidade.....	38
4.4	Extração de DNA.....	39
4.5	Sequenciamento de Nova Geração.....	39
4.6	Extração de RNA.....	40
4.7	Arrays de PCR quantitativo (qPCR).....	41
4.7.1	Síntese de cDNA.....	41
4.7.2	PCR array.....	41
4.8	Perfil de expressão de miRNAS.....	42
4.9	Bioinformática e análises de interação de vias.....	43
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Caracterização da amostra.....	45

5. 2	Sequenciamento de Nova Geração.....	46
5. 3	Array de qPCR.....	48
5. 4	Perfil de expressão de miRNAs .....	50
5. 5	Bioinformática e análises de interação de vias .....	54
6	DISCUSSÃO.....	61
7	CONCLUSÃO .....	68
	REFERÊNCIAS .....	69
	ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG .....	83
	APÊNDICE A - Artigo .....	84
	APÊNDICE B - Artigo .....	107
	APÊNDICE C – Termos de Consentimento e Assentimento Livre e Esclarecido....	126
	APÊNDICE D - Atividades desenvolvidas durante o doutorado .....	131
	APÊNDICE E - Produção científica durante o doutorado .....	133

## 1 INTRODUÇÃO

As lesões fibro-ósseas benignas foram classificadas por Waldron (1993) em três categorias que abrangiam alterações de desenvolvimento (displasia fibrosa), reativas (displasia cemento-óssea) ou neoplásicas, como o FCO (WALDRON, 1993). A Organização Mundial de Saúde (OMS) redefiniu a classificação em 2005, colocando o FCO, assim como, a displasia fibrosa no grupo de lesões ósseo-relacionadas (SLOOTWEG; EL-MOFTY, 2005). No entanto, a atualização mais recente da OMS incluiu o FCO na classificação de tumores odontogênicos, principalmente pelo fato dessa neoplasia ocorrer exclusivamente nos ossos gnáticos, podendo ter origem a partir do ligamento periodontal (WRIGHT; VERED, 2017).

A definição do diagnóstico de uma lesão fibro-óssea benigna requer a avaliação das características clínicas, radiográficas, histopatológicas e de achados transoperatórios, como a relação da lesão com o osso saudável circunjacente. Quando enucleado, o FCO apresenta-se como uma massa sólida única, enquanto na displasia fibrosa e na displasia cemento-óssea são curetados múltiplos fragmentos (BRANNON; FOWLER, 2001).

A mutação ativadora no gene *GNAS1* é a principal alteração molecular encontrada na displasia fibrosa, sendo um importante marcador molecular coadjuvante no diagnóstico da doença, uma vez que não é encontrada em tecido ósseo normal e em outras lesões fibro-ósseas benignas, como o FCO (LEE, SEUNG EUN *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2010; SAKAMOTO *et al.*, 2000; TABAREAU-DELALANDE, FLORE *et al.*, 2013).

Estudos sobre o perfil de expressão de genes supressores de tumor, por exemplo, o *CDC73*, anteriormente denominado *HRPT2*, e de genes associados à via das proteínas acopladas à proteína G e à codificação de moléculas da matriz extracelular têm sido conduzidos, buscando a diferenciação molecular entre as lesões fibro-ósseas benignas e outras doenças ósseas, embora os resultados ainda

sejam inconclusivos (DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013; MASI *et al.*, 2014). Uma assinatura molecular do FCO ainda não foi determinada.

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é altamente conservada durante a evolução e tem um papel crucial no desenvolvimento embrionário, na regeneração dos tecidos adultos e em muitos outros processos. Mutações ou expressão desregulada de componentes dessa via podem induzir doenças, sendo o câncer uma das mais importantes (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008). O sequenciamento apenas do éxon 3 do gene codificante da  $\beta$ -catenina (*CTNNB1*), e do éxon 15 do gene *APC*, realizado por um grupo de pesquisa em 2014, revelou uma mutação em cada um dos genes, *CTNNB1* e *APC*, em duas amostras de FCO (HORVAI; JORDAN, 2014).

A proteína codificada pelo gene *APC* desempenha um papel crítico em diversos processos celulares atuando como supressor de tumor. Esta proteína interage com outras proteínas envolvidas na adesão celular e sinalização. Uma proteína com a qual a APC se associa é a  $\beta$ -catenina, que participa do controle da expressão de genes envolvidos no crescimento, proliferação e diferenciação celulares (MACDONALD, BRYAN T.; TAMAI; HE, 2009). A existência de indícios sobre a participação da via Wnt/ $\beta$ -catenina na patogênese do FCO (HORVAI; JORDAN, 2014), instiga a investigação de mutações de genes da dessa via, assim como dos níveis de expressão gênica dos seus componentes, visando o melhor entendimento da patogenia molecular do FCO.

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não-codificante que atuam na regulação gênica pós-transcricional (LEE, ROSALIND C.; FEINBAUM; AMBROS, 1993). Essas moléculas têm sido alvo de estudos visando à identificação de potenciais biomarcadores, alvos terapêuticos e indicadores de prognóstico de diversas neoplasias como o osteossarcoma (JONES *et al.*, 2012; ZHOU, GUANGXIN *et al.*, 2015). Os miRNAs também são importantes moduladores na diferenciação celular. A avaliação da função dos miRNAs na diferenciação osteoblástica e sua relação com a via Wnt/ $\beta$ -catenina revelou expressão aumentada de miR-142-3p (HU *et al.*, 2013), miR-27 (WANG, T; XU, 2010) e miR-26a durante esse processo.

O FCO compartilha características histopatológicas com lesões fibro-ósseas benignas, embora sua evolução, tratamento e prognóstico sejam divergentes. O tratamento do FCO consiste em cirurgia conservadora, no entanto, como esse tumor pode atingir grandes dimensões, sua excisão usualmente causa morbidade. Alterações moleculares têm sido estudadas nessas lesões, buscando a elucidação de sua patogênese e a descoberta de marcadores diagnósticos, no entanto, os estudos existentes são escassos e apresentam resultados pouco consistentes. Alterações na via Wnt/ $\beta$ -catenina parecem estar associadas às lesões fibro-ósseas benignas, entretanto, pouco se conhece sobre os mecanismos moleculares envolvidos na biologia dessas lesões. A investigação ampla de mutações nos genes componentes da via Wnt/ $\beta$ -catenina, assim como a investigação dos níveis de expressão gênica destes componentes e da sua regulação epigenética através da ação de miRNAs, possui grande potencial de revelar dados importantes para o entendimento da patogênese molecular e para o levantamento de possíveis alvos moleculares para prognósticos e tratamento do FCO.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2. 1 Fibroma cemento-ossificante

#### 2. 1. 1 Classificação

O FCO é uma neoplasia benigna, constituída por depósitos de material mineralizado, permeados por um tecido fibrocelular, bem delimitada perifericamente. Esse componente mineralizado pode assemelhar-se ao cimento, no entanto, a identificação dessas estruturas em sítios extragnáticos indica tratar-se de uma variação do tecido ósseo (RAJPAL *et al.*, 2014). Dessa forma, a primeira e a segunda edição da classificação da OMS consideraram o FCO como uma neoplasia osteogênica. Em contrapartida, a displasia fibrosa e a displasia cemento-óssea foram incluídas no grupo de lesões ósseas não neoplásicas (KRAMER; PINDBORG; SHEAR, 1992). Em 2005, a OMS redefiniu a classificação, adotando a denominação fibroma ossificante. O fibroma ossificante juvenil trabecular e o fibroma ossificante juvenil psamomatoide foram considerados duas variantes histológicas do fibroma ossificante. Essa edição apresentou o fibroma ossificante, a displasia fibrosa e a displasia cemento-óssea no grupo de lesões ósseo relacionadas (SLOOTWEG; EL-MOFTY, 2005).

Recentemente o FCO foi classificado pela OMS como um tumor odontogênico (WRIGHT; VERED, 2017). A localização do FCO exclusiva em ossos gnáticos o difere do fibroma ossificante juvenil. Dessa forma, uma origem odontogênica é plausível para o FCO. Essa alteração pretende diferenciar o FCO das categorias juvenis do fibroma ossificante que, por sua vez, foi tratado como lesão fibro-óssea em conjunto com a displasia fibrosa (WRIGHT; VERED, 2017).

#### 2. 1. 2 Diagnóstico

Clinicamente, o FCO apresenta-se como um aumento de volume expansivo e, frequentemente indolor, que afeta principalmente a região posterior da mandíbula,

provocando deslocamento de dentes ocasionalmente. A proporção de indivíduos afetados do sexo masculino e feminino varia de 1: 2,3 a 1: 3,7 (CHANG *et al.*, 2008; OJO *et al.*, 2014). Ao exame radiográfico, observa-se uma imagem bem delimitada por uma borda esclerótica, com aspecto misto em cerca de 60% dos casos, podendo apresentar-se apenas radiolúcida ou radiopaca (CHANG *et al.*, 2008).

O diagnóstico diferencial do FCO deve considerar a displasia fibrosa, as displasias ósseas periapical e focal, além do ameloblastoma desmoplásico, principalmente devido às diferentes abordagens necessárias para o tratamento de cada lesão. Outros tumores odontogênicos com aspecto radiográfico misto, como o cisto odontogênico calcificante, o tumor odontogênico epitelial calcificante (Tumor de Pindborg) e o tumor odontogênico adenomatoide, também devem ser considerados no diagnóstico diferencial do FCO (MAINVILLE; TURGEON; KAUZMAN, 2016; MINTZ; VELEZ, 2007). O ameloblastoma desmoplásico é um tumor odontogênico que afeta principalmente a região anterior de mandíbula e se assemelha radiograficamente ao FCO por apresentar-se como uma lesão bem delimitada, com aspecto misto radiolúcido/radiopaco (SAVITHRI *et al.*, 2013).

A displasia fibrosa apresenta aspecto mais homogêneo de “vidro despolido” e bordas mal definidas, dificultando o estabelecimento preciso da transição para o osso normal. O FCO, por sua vez, apresenta-se bem delimitado perifericamente. O exame microscópico revela uma fusão da displasia fibrosa ao osso, enquanto o FCO exibe uma cápsula fibrosa circundante (SPEIGHT; CARLOS, 2006). A distinção entre o FCO e displasia cemento-óssea é essencial para determinar a necessidade ou não de alguma intervenção, uma vez que a displasia óssea usualmente não demanda tratamento, apenas acompanhamento clínico-radiográfico (SUMMERLIN; TOMICH, 1994). A displasia cemento-óssea apresenta uma tendência a localizar-se na região periapical ou em sítios de extração (SU, L; WEATHERS; WALDRON, 1997). Além disso, essa lesão apresenta-se como um tecido de consistência heterogênea e fragmentável durante a biópsia, sendo removido em múltiplos fragmentos, enquanto o FCO é mais homogêneo e pode ser enucleado sem se fragmentar (SU, LAN; WEATHERS; WALDRON, 1997).

O FOJ ocorre geralmente em crianças e jovens, principalmente antes dos 15 anos de idade, com uma leve predileção pelo sexo masculino e envolve os ossos

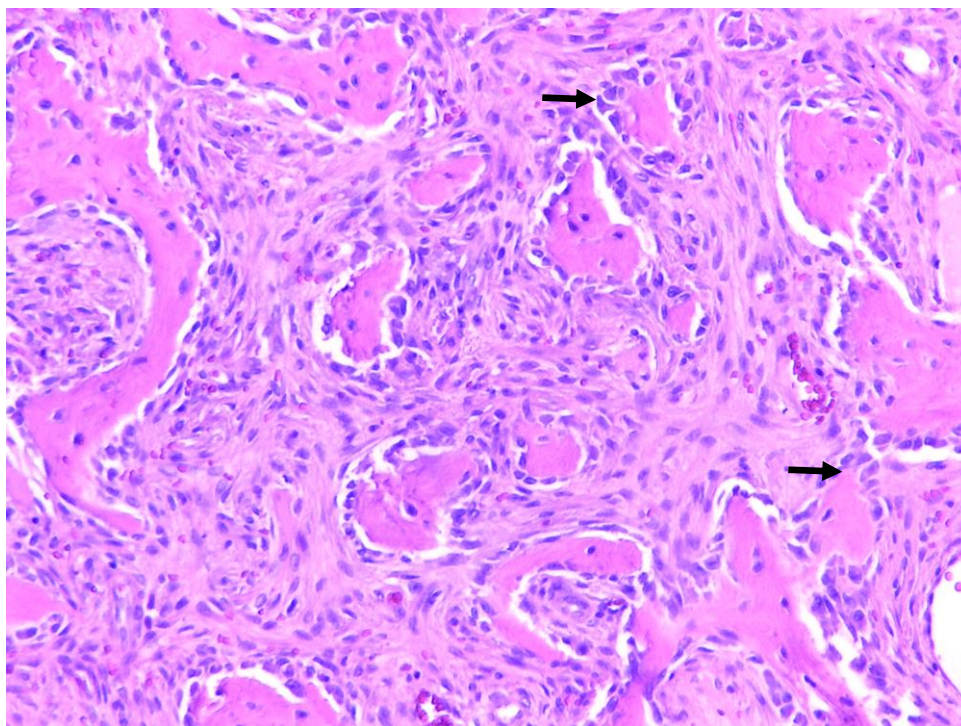


maxilares e outras regiões craniofaciais. O FOJ é bem definido perifericamente assim como o FCO. No entanto, radiograficamente, é possível observar um fino halo radiolúcido que representa cápsula fibrosa no FCO, que não é visível no FOJ (MACDONALD, 2015; URS, KUMAR, ARORA, & AUGUSTINE, 2013).

### 2. 1. 3 Características histopatológicas

Microscopicamente o FCO apresenta-se como uma proliferação de tecido fibrocelular contendo uma quantidade variável de material mineralizado. O componente mineralizado pode apresentar-se em forma de trabéculas de osteoide ou em formato ovoide, basofílico, semelhante ao cimento. As estruturas trabeculares podem exibir bordas de osteoide “em escova” ou osteoblastos circunjacentes em cerca de 40% dos casos (EVERSOLE; LEIDER; NELSON, 1985) (FIGURA 1). Em comparação, a displasia fibrosa não apresenta trabéculas circundadas por osteoblastos usualmente (BRANNON; FOWLER, 2001). Apesar de ser bem vascularizado o FCO não apresenta focos de hemorragia, comumente observados na displasia cemento-óssea focal (Su, Weathers, & Waldron, 1997; Waldron, 1993). O grau de vascularização assim como o diâmetro dos vasos podem ser maiores na displasia fibrosa em comparação com FCO (SHMULY *et al.*, 2015). Uma cápsula de tecido conjuntivo fibroso circunda a lesão delimitando-a perifericamente, separando do osso normal adjacente (Waldron, 1985).

Figura 1 - Aspecto histopatológico do FCO



Legenda: Fotomicrografia em maior aumento exibindo tecido conjuntivo altamente celularizado formando trabéculas de osteoide. Notam-se osteoblastos circundando as trabéculas (setas).

Fonte: Arquivo próprio do autor

São descritas duas variantes histológicas do FOJ: trabecular e psamomatoide (EL-MOFTY, 2002; STÖRKEL; WAGNER; MAKEK, 1987). A forma trabecular ocorre mais precocemente (média de 8,5 a 12 anos) do que a psamomatoide (média de 16 a 33 anos). Microscopicamente, observam-se trabéculas anastomosadas de tecido osteoide imaturo e infiltração da estrutura óssea adjacente com neoformação óssea reacional. O estroma é composto por tecido conjuntivo fibroso, células fibroblásticas e colágeno. A forma psamomatoide apresenta, microscopicamente, massas de osteoide formando esferas, de tamanho uniforme, dispersas em um estroma fibroblástico e, exibindo calcificações concêntricas (EL-MOFTY, 2002).

## 2. 1. 4 Tratamento e prognóstico

O tratamento do FCO envolve a excisão cirúrgica seguida de acompanhamento clínico e radiográfico em longo prazo. A abordagem cirúrgica conservadora é a primeira escolha de tratamento (CHANG *et al.*, 2008; EL-MOFTY, 2002). A presença de uma cápsula fibrosa permite a separação da lesão do osso adjacente, removendo-a em uma peça única. Essa característica transoperatória é importante para o diagnóstico diferencial com a displasia fibrosa e displasia óssea focal e/ou periapical (WALDRON, 1993). Curetagem conservadora deve ser reservada para o tratamento de FCO bem definidos e pequenos. Lesões maiores e com bordas bem definidas podem ser tratadas por meio de enucleação. Em casos extensos, com comportamento agressivo, que envolvam a região basilar da mandíbula ou seio maxilar e com limites imprecisos, recomenda-se a ressecção cirúrgica com margens de até 5 mm em osso normal (TITINCHI; MORTEL, 2016). Em casos agressivos de FOJ é sugerida a utilização de solução de Carnoy (RAJESHKUMAR *et al.*, 2013).

A taxa de recorrência do FCO varia de 6,7 a 28% de acordo com estudos prévios (EVERSOLE; LEIDER; NELSON, 1985; MACDONALD-JANKOWSKI, 2009; TITINCHI; MORTEL, 2016). A síndrome do hiperparatireoidismo-tumores dos maxilares, causada por uma mutação no gene *CDC73*, deve ser investigada em pacientes com FCO que apresentem simultaneamente hiperparatireoidismo e/ou tumor de Wilms (CHEN, J. D. *et al.*, 2003).

## 2. 2 Alterações moleculares no fibroma cemento-ossificante

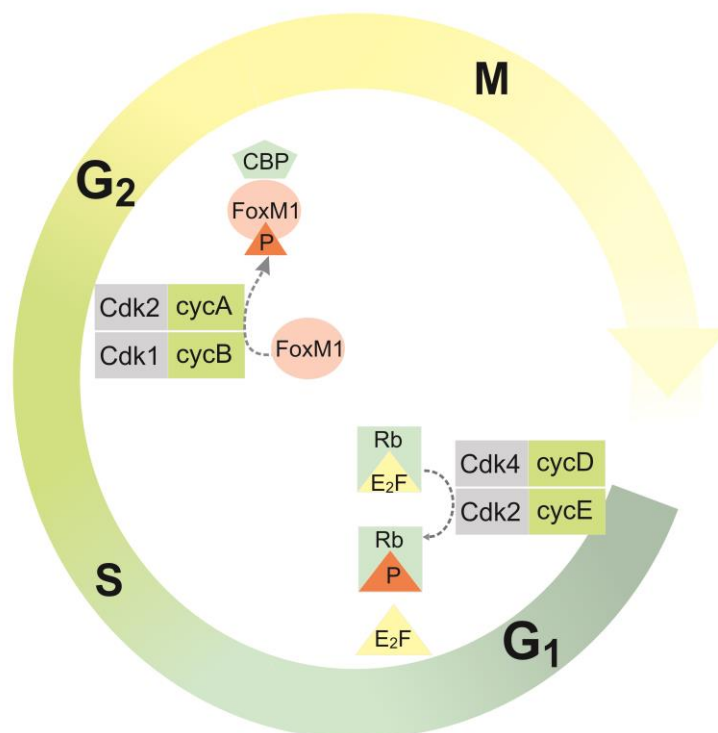
Os genes envolvidos no ciclo celular têm sido amplamente estudados e estão associadas à patogênese de diferentes neoplasias. Alterações genéticas envolvendo esses genes foram descritas no osteossarcoma (YANG *et al.*, 2014), na displasia fibrosa (DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013) e no FCO (DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013; TABAREAU-DELALANDE, F *et al.*, 2014). O ciclo celular ativo é constituído de quatro fases, denominadas G<sub>1</sub> (gap 1), S (síntese), G<sub>2</sub> (gap 2) e M (mitose). A fase G<sub>0</sub> corresponde à quiescência celular (GILLET; BARNES, 1998). Nas transições G<sub>1</sub>-S e G<sub>2</sub>-M, encontram-se os pontos de checagem do DNA, onde

ocorre a verificação da sua integridade (FIGURA 2) (HARTWELL; KASTAN, 1994). As proteínas reguladoras do ciclo celular, quinases dependentes de ciclinas (CDKs), ciclinas e inibidores de CDKs (CKIs), atuam de forma coordenada durante a passagem do ciclo (HARTWELL; KASTAN, 1994).

Na progressão da fase  $G_1$  para a fase S a proteína do retinoblastoma (Rb) é ativada, através da fosforilação pelo complexo CDK4 dependente de ciclina D, resultando na liberação do fator E2F que ativa a transcrição de genes necessários para entrada das células na fase S (FIGURA 2) (HARTWELL; KASTAN, 1994; LEW; DULIC; REED, 1991; SHERR; ROBERTS, 1999). A superexpressão de parafibromina provoca a inibição de Ciclina D1 e da proliferação celular, induzindo a parada do ciclo celular na fase  $G_1$  (ZHANG, CHUN *et al.*, 2006).

Mutações no gene supressor de tumor *CDC73*, que codifica a proteína parafibromina, foram descritas na síndrome hiperparatireoidismo-tumores dos maxilares. Cerca de 40% dos indivíduos com a síndrome desenvolvem FCO nos ossos gnáticos, que não regridem após o tratamento cirúrgico da paratireoide, diferentemente do tumor marrom do hiperparatireoidismo (JACKSON *et al.*, 1990).

Figura 2 - Esquema do controle do ciclo celular.



Legenda: Na fase G<sub>1</sub>, os complexos Cdk4 - Ciclina D e Cdk2 – Ciclina E promovem a fosforilação da proteína do retinoblastoma (Rb), resultando na liberação do fator E<sub>2</sub>F que ativa a transcrição de genes necessários para entrada das células na fase S. Na fase S, os complexos Cdk4 - Ciclina D e Cdk2 – Ciclina E continuam a promover a fosforilação da Rb. Na fase G<sub>2</sub>, os complexos Cdk2 - Ciclina A e Cdk1 – Ciclina B promovem a fosforilação de FoxM1, que torna-se ativo e recruta a proteína ligante da histona deacetilase p300/CREB (CBP), que ativa a transcrição dos genes relacionados a FoxM1.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Recentemente, uma nova mutação somática *missense* em *CDC73* (Ile60Asn) foi identificada em um FCO mandibular de um paciente com a síndrome do hiperparatireoidismo-tumores dos maxilares que possuía a mutação germinativa c. (136\_144) del5 inativadora de *CDC73*. A mutação encontrada no tumor é uma transversão heterozigótica T>A na posição 179 (c.179 T>A) do éxon 2, resultando na substituição Ile60Asn. Essa mutação afeta um aminoácido conservado na porção N-terminal de parafibromina que resulta em aumento da proliferação celular e redução da expressão de parafibromina e de sua localização nucleolar (MASI *et al.*, 2014).

Alterações no gene *CDC73* foram observadas no FCO, na displasia fibrosa e no osteossarcoma. No entanto, apenas um caso de FCO esporádico apresentou uma mutação inativadora no éxon 1 de *CDC73* (c.70delG) (DE MESQUITA NETTO *et al.*, 2013) que havia sido descrita previamente no mesmo caso (PIMENTA *et al.*, 2006). Recentemente, duas novas mutações somáticas no éxon 1 do gene *CDC73* (c.13\_16delCTTA e c.8\_10delAC- GinsCT) foram descritas em dois casos de FCO esporádicos. Apesar das mutações, a expressão de parafibromina não foi alterada nesses casos (CHEN, YAN *et al.*, 2016).

Os níveis transcricionais dos receptores *NOTCH1* e *NOTCH3* e dos ligantes *JAGGED1* e *JAGGED2* encontram-se elevados no FCO em comparação com o osso normal. A expressão de proteínas NOTCH apresenta um padrão de marcação intenso e difuso em osteoblastos e fibroblastos no FCO comparado ao osso normal, em que a marcação é fraca ou negativa em células estromais da medula óssea e focalmente intensa em osteoblastos. Essas características sugerem que a sinalização de NOTCH pode estar envolvida na patogênese do FCO (ZHANG, TONG-HAN *et al.*, 2010).

A amplificação do gene *MDM2* está associada à recorrência, metástase e progressão do osteossarcoma e foi identificado como regulador negativo de Tp53 (LADANYI *et al.*, 1993; OLINER *et al.*, 1992). Recentemente, a interação MDM2-Tp53 tem sido alvo de estudos farmacológicos que visam a sua inibição com propósito de ação antitumoral (GONZALEZ *et al.*, 2014). A amplificação simultânea dos genes *RASAL1* e *MDM2*, no braço longo do cromossomo 12, foi considerada a primeira alteração molecular descrita no FOJ que permite a sua diferenciação da displasia fibrosa e de outras lesões fibro-ósseas craniofaciais, sendo um potencial marcador diagnóstico e indicador de comportamento agressivo com maior risco de recorrência (TABAREAU-DELALANDE, F *et al.*, 2014).

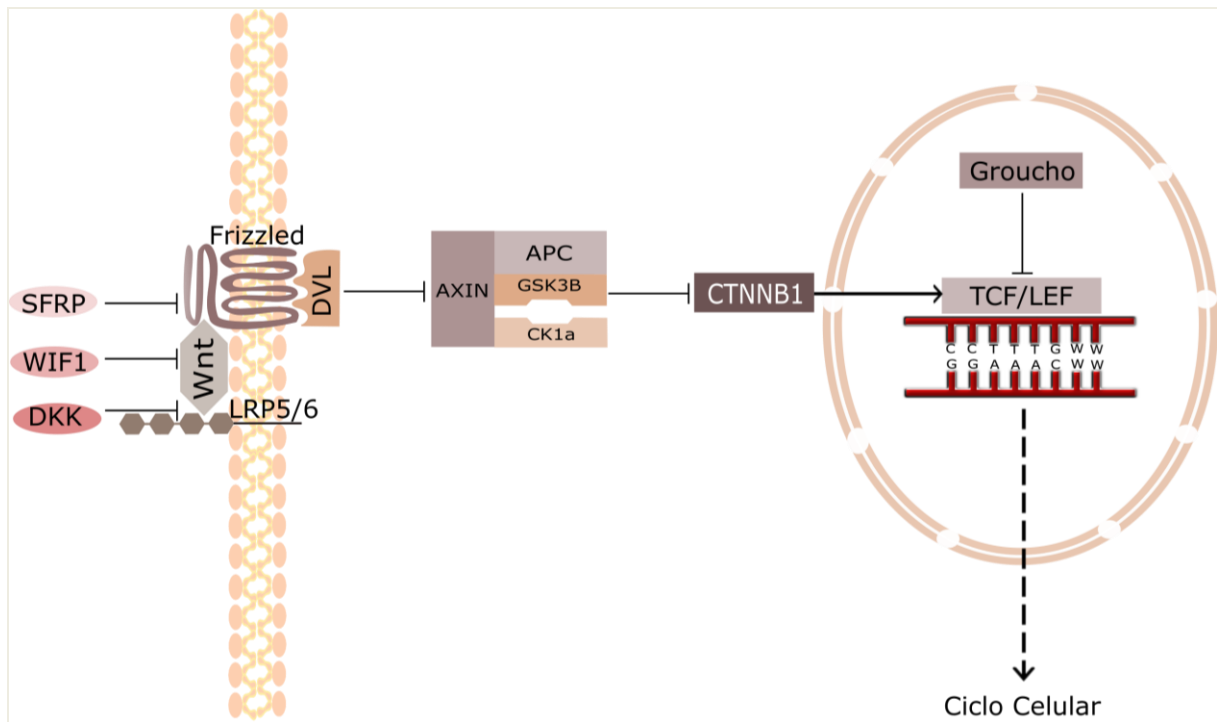
Uma mutação pontual em cada um dos genes *CTNNB1* (éxon 3) e *APC* (éxon 15) foi identificada por Horvai & Jordan (2014) em dois casos de FCO. Estes achados indicam que a via Wnt/ $\beta$ -catenina pode estar relacionada à biologia dessa neoplasia.

### 2.3 Via Wnt/ $\beta$ -catenina

A ativação de receptores Wnt pode ativar diferentes vias de sinalização importantes durante a embriogênese e em diversos processos biológicos, como a via canônica Wnt dependente de  $\beta$ -catenina. Essa via está envolvida tanto em eventos fisiológicos como a diferenciação celular (SONG, LIGE *et al.*, 2012), o desenvolvimento embrionário e a odontogênese (CHEN, JIANQUAN *et al.*, 2009), quanto em diversas neoplasias como os carcinomas gastrointestinais (PAI *et al.*, 2015). Além da via de sinalização Wnt canônica (FIGURA 3), os ligantes Wnt podem ativar vias independentes de  $\beta$ -catenina, denominadas não canônicas, que são classificadas como “polaridade celular planar” e “via Wnt/ $\text{Ca}^{2+}$ ” (FIGURA 4) (KOMIYA; HABAS, 2008).

As proteínas Wnt ligam-se a receptores Frizzled e co-receptores LRP5–LRP6 na membrana plasmática. A sinalização por Wnt é inibida através da ligação de antagonistas como proteínas secretadas Frizzled relacionadas (SFRPs), Dickkopfs (DKKs) e fator 1 inibidor de Wnt (WIF1) (FINCH *et al.*, 1997; GLINKA *et al.*, 1998; HSIEH *et al.*, 1999). Na ausência de ligantes Wnt,  $\beta$ -catenina citoplasmática é recrutada por um complexo de destruição multiproteico constituído de duas proteínas matriciais (APC e AXIN) e duas quinases (GSK3 $\beta$  e CK1). O complexo leva à fosforilação constitutiva da  $\beta$ -catenina e à sua degradação proteossomal (LI, VIVIAN S W *et al.*, 2012). Nesse contexto, a interação de TLE com LEF1 inibe a transcrição de LEF1 dependente de  $\beta$ -catenina (LEVANON *et al.*, 1998). Na presença de ligantes Wnt, há translocação de AXIN para a membrana plasmática, com consequente desativação do complexo de destruição, permitindo a estabilização de  $\beta$ -catenina e sua translocação para o núcleo (HUBER *et al.*, 1996).

Figura 3 - Esquema da via de sinalização Wnt canônica.

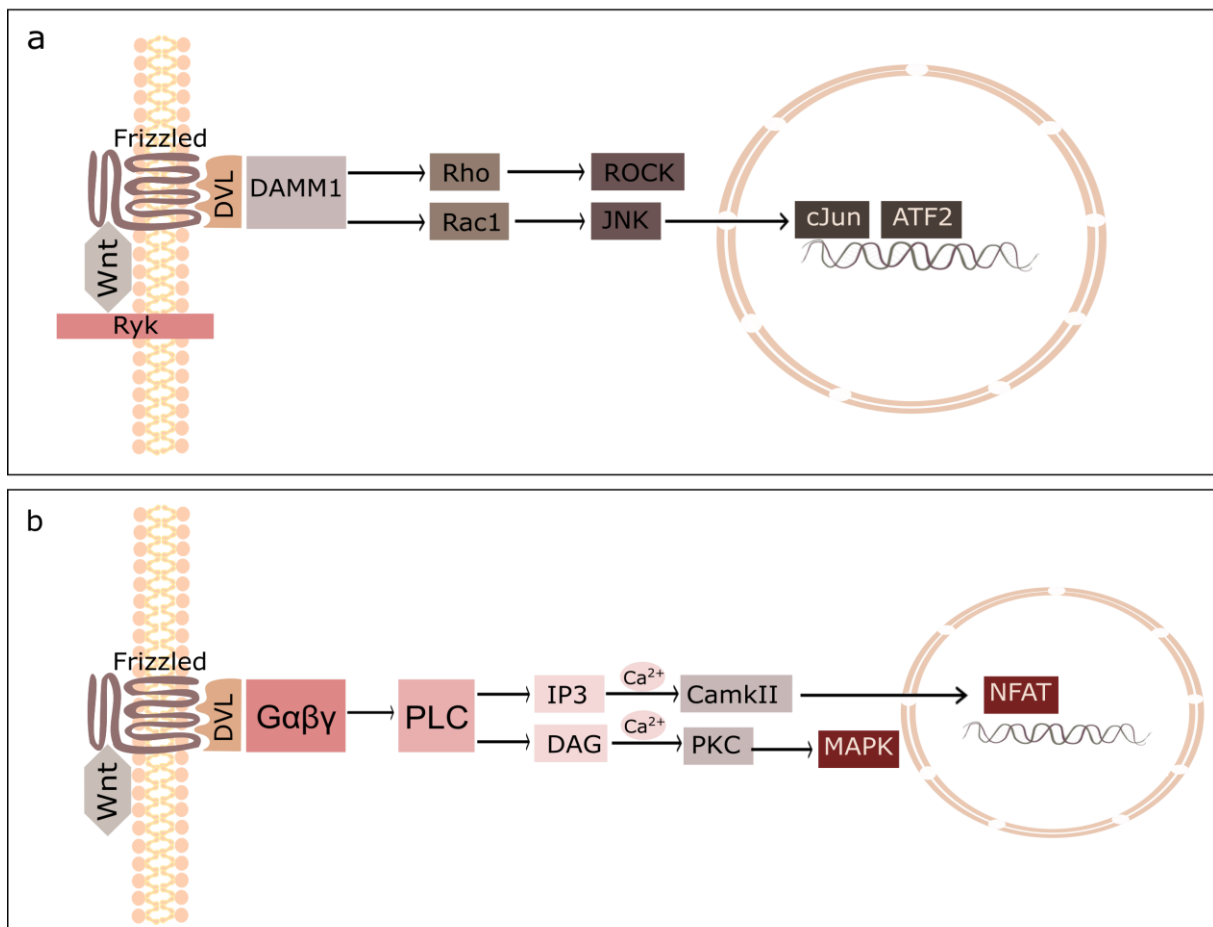


Legenda: Ligantes da família Wnt ligam-se aos receptores transmembrana Frizzled e co-receptores LRP5/6. A sinalização resulta na fosforilação das proteínas Dishevelled (Dsh / Dvl), conduzindo à ligação de Axin à LRP5/6 e, conseqüentemente, inativando o complexo proteico citoplasmático que catalisa a fosforilação e subsequente degradação de  $\beta$ -catenina. Dessa forma,  $\beta$ -catenina é estabilizada e se transloca para o núcleo.

Fonte: Elaborado pelo autor.



Figura 4 - Esquema das vias de sinalização Wnt não canônicas.



Legenda: (a) Na via Polaridade Celular Planar, WNT se liga ao receptor de tirosina quinase do tipo 2 (ROR2) ou ao co-receptor transmembranar de tirosina quinase (RYK). Neste caso, o deslocamento de DSH para Frizzled resulta no recrutamento do ativador de morfogênese 1, DAMM1, e, conseqüentemente na ativação da proteína G Rho ou Rac1. Rho ativa a proteína quinase associada a Rho (ROCK) e Rac1 ativa a quinase amino-terminal c-Jun (JNK) e posteriormente os fatores de transcrição c-Jun e ATF2.

(b) Na via Wnt/Ca<sup>2+</sup>, o recrutamento de DSH para FZD resulta no recrutamento da proteína G trimérica Ga/Gb/Gc e posterior ativação da fosfolipase C (PLC). Esta enzima atua sobre fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato em membranas celulares produzindo inositol trifosfato (IP3) e diacilglicerol (DAG). O IP3 liberta cálcio dos estoques intracelulares resultando na ativação da proteína quinase II dependente do cálcio / calmodulina (CamKII) e do fator de transcrição NFAT que controla a adesão celular e a migração celular. DAG ativa proteína quinase C (PKC) e proteína quinases mitogênicas (MAPKs) envolvidas no controle de diferentes atividades celulares.

Fonte: Elaborado pelo autor.

Diversos genes alvos de Wnt foram descritos, indicando o papel da via Wnt/ $\beta$ -catenina na diferenciação, proliferação e adesão celular, na embriogênese, assim como no câncer (KLAUS; BIRCHMEIER, 2008). O protooncogene *MYC* foi identificado como um de seus alvos transcricionais diretos, instigando a pesquisa da participação da via no câncer (HE, 1998).

A via Wnt/ $\beta$ -catenina participa do desenvolvimento craniofacial e dos tecidos bucais. A perda da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina direciona a diferenciação de pré-osteoblastos para adipócitos ao invés de osteoblastos (SONG, LIGE *et al.*, 2012). A ligação de Wnt inibe a atividade de GSK3 $\beta$ , levando à acumulação e translocação nuclear de  $\beta$ -catenina, que funciona como coativador transcricional e promove a transcrição de genes essenciais para a diferenciação osteoblástica (HERR; HAUSMANN; BASLER, 2012).

A função da via Wnt/ $\beta$ -catenina também foi estudada em linhagem de células ameloblásticas expostas a fluoreto de sódio. As vias Wnt e RHO encontram-se super-reguladas durante a exposição ao fluoreto de sódio (SHUSTERMAN *et al.*, 2014). Modificações na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina em células tronco de ratos cultivadas em meio condicionante de folículo dental demonstraram a importância dessa via na diferenciação cementoblástica. A suplementação das células com DKK1 promoveu a inibição da translocação nuclear de  $\beta$ -catenina e subexpressão dos níveis de mRNA de TCF4 e LEF1 (LIU, NA *et al.*, 2014).

O papel da via Wnt/ $\beta$ -catenina foi investigado em tumores odontogênicos. A imunexpressão de Wnt1, Wnt5a e  $\beta$ -catenina foi analisada em casos de ameloblastoma e tumor odontogênico cístico calcificante. A expressão de Wnt1 e Wnt5a foi observada nas células epiteliais dos dois tumores odontogênicos. Por outro lado, enquanto no ameloblastoma, a expressão de  $\beta$ -catenina ocorreu no citoplasma das células tumorais, no tumor odontogênico cístico calcificante sua expressão foi detectada tanto no citoplasma quanto no núcleo das células neoplásicas (DUTRA *et al.*, 2017). Nesse contexto, o estudo da imunexpressão de Wnt5a e MMPs demonstrou maior expressão de Wnt5a em tumores odontogênicos e cistos de origem inflamatória comparado aos cistos de desenvolvimento.

Observou-se expressão forte de MMP7 e ausente de MMP20 no cisto odontogênico calcificante. Pode-se inferir que a expressão de Wnt5a contribui para a formação de calcificações presentes nesse tumor (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

BMP-2 regula positivamente a expressão de Wnt-3A e  $\beta$ -catenina que são essenciais para a neoformação óssea. Porém, a sinalização de BMP pode antagonizar Wnt, promovendo interação com SMAD1 e DVL que restringe a acumulação de  $\beta$ -catenina em células esqueléticas progenitoras. Ou seja, Wnt e BMP podem atuar de forma sinérgica ou antagônica na diferenciação dessas células. Níveis aberrantes de Wnt e BMP em células-tronco mesenquimais de murinos provocam a diminuição no potencial de diferenciação osteogênica. Por outro lado, a supressão de APC resulta em uma super-regulação das vias Wnt/ $\beta$ -catenina e BMP/SMAD, no entanto, há uma completa inibição da diferenciação osteogênica. Esse efeito é recuperado pela exposição a altos níveis de BMP-7 (MICLEA *et al.*, 2011).

A superexpressão de hsa-miR-31-5p diminui significativamente os níveis de expressão de DKK1 no epitélio respiratório e em células neoplásicas de câncer de pulmão (XI *et al.*, 2010). Esse gene codifica uma proteína inibidora da via de sinalização Wnt, que se liga ao domínio LRP5/6 (BAO; ZHENG; WU, 2012; MAO *et al.*, 2001), sendo um potente inibidor da neoformação óssea. Os níveis séricos de DKK1 encontram-se significativamente elevados em mulheres com osteoporose pós-menopausa. Além disso, há uma correlação negativa entre os níveis de DKK1 com  $\beta$ -catenina e densidade mineral óssea (TIAN *et al.*, 2015).

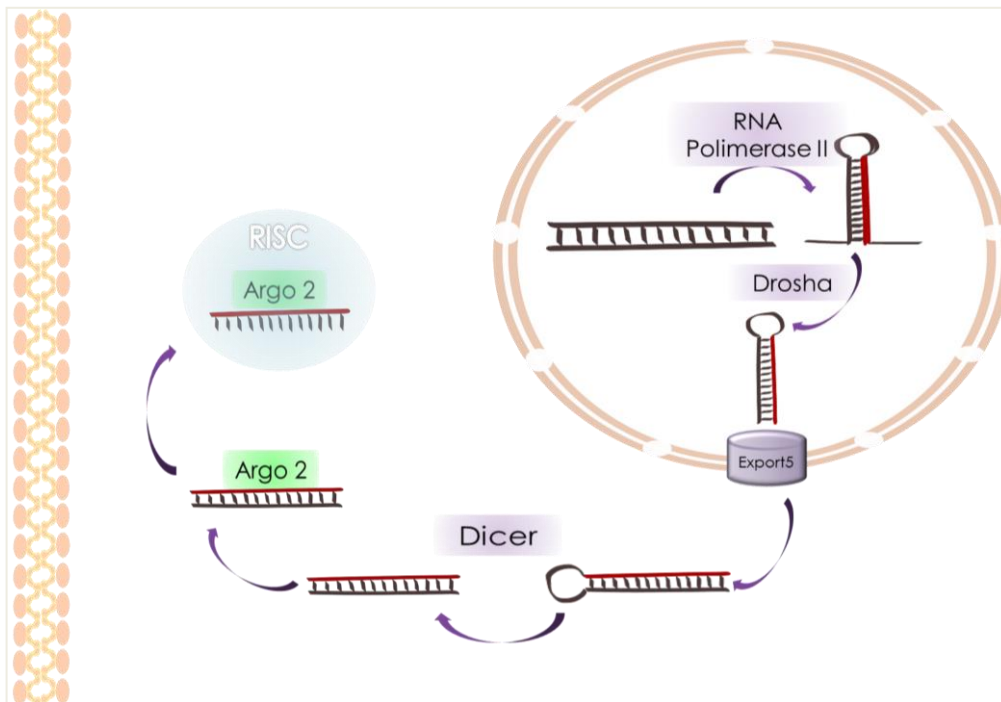
## 2.4 miRNA

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificante constituídas por cerca de 22 nucleotídeos. Os miRNAs atuam na regulação gênica pós-transcricional (LEE, ROSALIND C.; FEINBAUM; AMBROS, 1993) degradando ou inibindo o RNA mensageiro (mRNA) através do pareamento de bases em sítios complementares (BARTEL, 2004).

O processo de síntese de miRNAs inicia-se com a transcrição pela RNA polimerase II, resultando no miRNA primário (pri-miRNA). O pri-miRNA é clivado no

núcleo pela RNase III endonuclease (Drosha), cujo produto é o miRNA precursor (pre-miRNA) constituído por cerca de 60 a 75 nucleotídeos (LEE, YOONTAE *et al.*, 2003). O pre-miRNA é exportado do núcleo para o citoplasma por Ran-GTP e pelo receptor exportin-5. No citoplasma, é então clivado pela enzima Dicer (RNase III), resultando no miRNA maduro (YI *et al.*, 2003). O miRNA é então incorporado ao complexo RISC (RNA-induced silencing complex) e levado à região alvo do RNA mensageiro (mRNA). Esse complexo identifica os alvos através da complementariedade com mRNA (ELBASHIR *et al.*, 2001) (FIGURA 5).

Figura 5: Biogênese de miRNAs.



Legenda: RNA polimerase II realiza a transcrição gênica para a produção de miRNAs, originando o miRNA primário (pri-miRNA) que, é clivado pela RNase III (Drosha) no núcleo. O produto da clivagem é o micro-RNA precursor (pré-miRNA), que apresenta um formato denominado hairpin, e é exportado para o citoplasma pelo receptor exportina-5. A enzima Dicer cliva o pré-miRNA, gerando um miRNA maduro. O complexo de silenciamento RISC (RNA-Induced Silencing Complex) é constituído pela Argonata (Ago2) e outras proteínas e permite o pareamento do miRNA com região 3'UTR do mRNA-alvo por complementariedade de bases.

Fonte: Elaborado pelo autor.

O estudo de miRNAs tem possibilitado a identificação de potenciais biomarcadores e indicadores de prognóstico. A alta expressão de miR-27a e miR-181c foi observada em casos metastáticos de osteossarcoma (JONES *et al.*, 2012). A superexpressão de miR-199a-5p foi constatada em plasma de pacientes com osteossarcoma comparados aos controles (ZHOU, GUANGXIN *et al.*, 2015).

A função dos miRNAs na patogênese de neoplasias pode diferir de acordo com o tipo celular envolvido ou a via regulatória estudada. No osteossarcoma, miR-199a-3p apresenta-se como supressor de tumor. Sua superexpressão proporcionou aumento da sensibilidade das células neoplásicas a fármacos (GAO *et al.*, 2015).

O efeito da expressão de miRNAs sobre a apoptose foi avaliado no ceratocisto odontogênico. Foi observado um perfil antiapoptótico, caracterizado pela alta expressão de BCL2 aos níveis transcricional e proteico, associado à subexpressão de miR-15a/16-1. Demonstrou-se ainda, que há um aumento da expressão desses miRNAs após a marsupialização. Esse procedimento converte o cisto em uma bolsa e frequentemente resulta em regressão da cavidade cística, espessamento da cápsula e resolução da lesão. Dessa forma, a expressão de miR-15a/16-1 representa um potencial alvo terapêutico para o ceratocisto (DINIZ *et al.*, 2012).

miRNAs são mediadores essenciais na diferenciação celular. Estudos que avaliaram o papel de miRNAs na diferenciação osteoblástica e sua relação com a via Wnt/ $\beta$ -catenina relataram expressão aumentada de miR-142-3p (HU *et al.*, 2013), miR-27 (WANG, T; XU, 2010) e miR-26a durante esse processo. Tamura *et al.* (2013) estudaram o perfil de miRNAs no processo de modulação da expressão gênica em osteoblastos e na diferenciação dessas células. Foi realizada uma transfecção com plasmídeo expressando Wnt3a para ativação da via de sinalização Wnt. Foi constatada um aumento da expressão de miR-34b/c ao decorrer do processo de diferenciação osteoblástica. A supressão do miRNA aumentou a expressão do mRNA de osteocalcina e diminuiu a expressão do mRNA da fosfatase alcalina (TAMURA *et al.*, 2013).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Investigar alterações genéticas e epigenéticas no FCO.

#### 3.2 Objetivos específicos

Investigar 2.855 mutações *hotspot* em 50 oncogenes e supressores de tumor de vias envolvidas com neoplasias humanas, incluindo a via Wnt/ $\beta$ -catenina.

Avaliar a expressão relativa de 44 genes da via Wnt/ $\beta$ -catenina no FCO, comparando com osso normal.

Investigar alterações na expressão de 754 miRNAs no FCO, comparando com osso normal.

Avaliar *in silico* o envolvimento dos miRNAs diferencialmente expressos no FCO com genes alvos e vias de sinalização celular.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

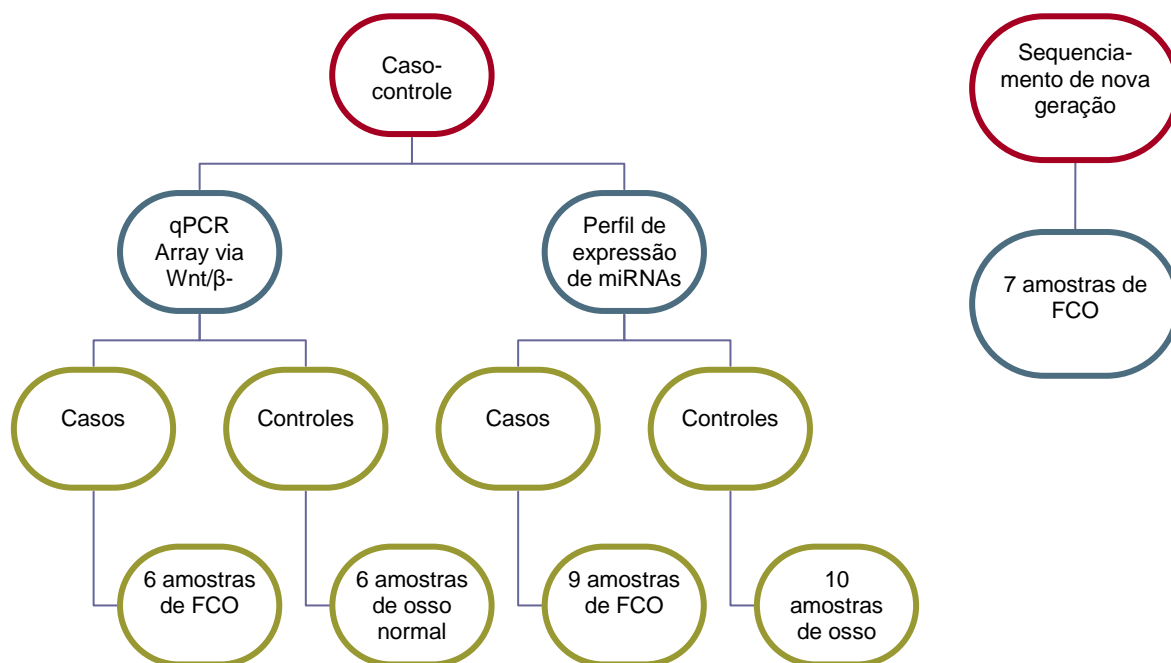
Os pacientes selecionados foram informados sobre os objetivos do estudo, tendo a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas. Foi solicitada a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo paciente ou responsável caso concordasse em participar. O paciente também foi informado que durante qualquer etapa do projeto de pesquisa ele teria o direito de desistir e não sofreria nenhuma penalização, nem seriam interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética de pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CAAE: 44483515.0.0000.5149).

### 4.2 Pacientes e amostras

Foram incluídos no estudo indivíduos, em qualquer faixa etária, com o diagnóstico de FCO. Amostras de tecido fresco foram coletadas na clínica de Semiologia e Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da UFMG. O material foi obtido durante os procedimentos cirúrgicos de biópsia. O fragmento foi coletado do interior da lesão e acondicionado em criotubos contendo as soluções *RNA later®* e *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, CA, EUA), sendo ambos armazenados a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Um fragmento adicional foi fixado em formol tamponado a 10%, processado e incluído em parafina para avaliação histopatológica.

O grupo controle foi constituído por indivíduos saudáveis com indicação de remoção de terceiro molar incluso ou de cirurgia ortognática. Fragmentos de osso medular sadio removidos durante os procedimentos de osteotomia e osteoplastia foram coletados, acondicionados e armazenados da mesma forma que os do grupo caso. A quantidade de amostras inserida em cada grupo foi determinada de acordo com a disponibilidade de material biológico para realização dos experimentos propostos (FIGURA 6).

Figura 6 - Fluxograma de amostras. Distribuição das amostras de acordo com os experimentos realizados.



#### 4.3 Critérios de elegibilidade

Foram incluídos no estudo, pacientes com diagnóstico clínico, radiográfico e histopatológico de FCO que possuíam exames radiográficos, descrição clínica e lâmina corada em H&E disponíveis para consulta e confirmação do diagnóstico. Os exames laboratoriais como níveis séricos de fosfatase alcalina, fósforo e cálcio apresentavam-se dentro dos padrões de normalidade. Os indivíduos do grupo controle eram saudáveis, não apresentavam distúrbios ósseos ou utilizavam quaisquer medicamentos nos últimos três meses.

Foram excluídos os casos com informações incompletas ou inconsistentes e indivíduos que utilizaram medicamentos que poderiam interferir no metabolismo ósseo.



#### 4. 4 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em amostras de tecido fresco armazenado em *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, CA, EUA), a -80°C. Para essas amostras foi utilizado o *kit Dneasy Tissue Kit* (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante.

O DNA resultante foi avaliado quantitativamente e qualitativamente através dos instrumentos Nanodrop 2000 e Qubit® 2.0.

#### 4. 5 Sequenciamento de Nova Geração

O sequenciamento de nova geração foi realizado, utilizando o pool de primers *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O painel foi utilizado em uma PCR multiplex para preparação de bibliotecas de amplicons de regiões genômicas frequentemente mutadas no câncer. Este painel investiga mutações em 207 amplicons dos seguintes 50 genes: *SMARCB1, RB1, TP53, ERBB4, FBXW7, BRAF, KIT, GNAS, HRAS, EGFR, PDGFRA, PIK3CA, CDKN2A, ERBB2, ABL1, JAK2, KRAS, NRAS, NOTCH1, ATM, FGFR1, STK11, PTPN11, APC, SMAD4, PTEN, SMO, CTNNB1, RET, IDH2, SRC, EZH2, VHL, MPL, NPM1, FLT3, FGFR3, CDH1, KDR, HNF1A, MLH1, ALK, IDH1, GNAQ, AKT1, JAK3, FGFR2, GNA11, MET e CSF1R*.

Inicialmente, no preparo das bibliotecas, foi realizada uma reação de PCR para amplificar regiões alvo do DNA genômico, utilizando *Ion AmpliSeq™ HiFi Mix, Ion AmpliSeq™ Primer Pool* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), DNA da amostra, e água *nuclease-free*. Após a termociclagem, foi realizada uma digestão parcial das sequências dos primers, adicionando-se o reagente *FuPa* e submetendo a outra termociclagem. A etapa seguinte consistiu na ligação dos adaptadores aos amplicons, utilizando-se os reagentes: *Switch Solution, barcode adapter mix e DNA Ligase* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguida de nova termociclagem. Posteriormente, foi realizada a purificação das bibliotecas amplificadas, utilizando o reagente *Agencourt® AMPure® XP* (Beckmancoulter, Beverly, Ma, EUA), etanol 70% e uma raque magnética. As bibliotecas foram quantificadas por PCR em tempo

real, usando *Ion Library Quantitation Kit* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e diluídas a uma concentração de 100 pM.

As amostras foram então amplificadas através de PCR em emulsão no instrumento *Ion One Touch 2*. Após amplificação, as amostras foram submetidas ao controle de qualidade, usando o teste *Ion Sphere™ quality control* e aquelas adequadas foram enriquecidas no *OneTouch™ ES* de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento utilizou *Ion 314™ Chip v2* e *Ion 316™ Chip v2* no equipamento *Ion Personal Genome Machine System (Ion PGM™ System)* (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

O programa *Ion Reporter* (5.2) foi utilizado para o alinhamento das leituras ao genoma humano (hg19). Variantes missense e somáticas foram filtradas considerando variantes de nucleotídeo único, inserções ou deleções, variantes de múltiplos nucleotídeos e longas deleções. As variantes resultantes foram visualmente analisadas através do programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV 2.3) para avaliar a representatividade bidirecional e identificar eventuais falsos achados (THORVALDSDÓTTIR; ROBINSON; MESIROV, 2013). Selecionamos as variantes que apresentaram profundidade de sequenciamento maior que x500 e frequência superior a 5%. As ferramentas *online* PolyPhen-2 (*Polymorphism Phenotyping v2*) e SIFT (*Sorting Tolerant From Intolerant*) foram usadas para predição *in silico* do possível impacto funcional da substituição de um aminoácido na constituição da proteína. Estabelecemos como critério que validação ortogonal (sequenciamento de Sanger) seria realizada somente em amostras que apresentassem mutações patogênicas.

#### 4.6 Extração de RNA

O RNA total foi extraído utilizando o *kit mirVana™ miRNA Isolation Kit* (Ambion, Vilvius, LT) de acordo com as recomendações do fabricante. O tecido foi macerado com um pistilo em um gral, desinfetado e livre de RNase. O material resultante foi colocado em um eppendorf de 1,5ml, contendo 1ml de *Lysis/ Binding buffer* para cada 0,1g de tecido. Após homogeneização, foram adicionados 1/10 do volume de *miRNA Homogenate additive*, deixando no gelo por 10 minutos. Em seguida, foi adicionado o mesmo volume de *Lysis/ Binding buffer de Acid-*

*phenol:Chloroform*. O conteúdo foi homogeneizado em *vortex* por 30 a 60s e centrifugado por 5 min a 10.000g. A solução sobrenadante foi transferida a outro tubo de 1,5ml, adicionando 1,25 do volume de etanol 100%. O conteúdo foi colocado em *Filter cartridge*, de acordo com o protocolo do fabricante para extração de RNA total. A amostra foi, então, quantificada em *Nanodrop 2000* (Wilmington, DE, EUA) e analisada através do *Bioanalyser Agilent 2100*, utilizando o *kit Agilent RNA 6000 Nano Kit* (Waldbronn, Alemanha).

#### 4. 7 Arrays de PCR quantitativo (qPCR)

##### 4. 7. 1 Síntese de cDNA

O RNA total obtido de seis amostras de osso saudável e seis de FCO foi tratado com DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Em seguida, 2,5µg de RNA foi adicionado na reação de transcrição reversa, utilizando SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Master Mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e a reação foi submetida a termociclagem sugerida pelo fabricante.

##### 4. 7. 2 PCR array

Inicialmente, foi realizada uma revisão da literatura, visando identificar os genes pertencentes à via Wnt/β-catenina que estão associados à biologia de fibroblastos, osteoblasto e osteoclastos, assim como a desordens e neoplasias ósseas. Solicitou-se, então, a confecção de placas *TaqMan® Array Fast Plates* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) customizadas contendo 48 genes, sendo 4 genes de referência (*18S*, *GAPDH*, *GUSB* e *HRPT1*) e 44 associados à via Wnt/β-catenina e também à biologia do tecido ósseo (*APC*, *AXIN1*, *CCND1*, *CSNK1A1*, *CTNNB1*, *CTNNBIP1*, *DKK1*, *DVL1*, *FGF4*, *FOSL1*, *FRZB*, *FZD1*, *FZD2*, *FZD6*, *FZD8*, *GSK3B*, *LEF1*, *LRP5*, *LRP6*, *MYC*, *NKD1*, *NLK*, *PITX2*, *PPP2CA*, *RHOU*, *SFRP1*, *SFRP4*, *TCF7*, *TCF7L1*, *TLE1*, *WIF1*, *WNT1*, *WNT10A*, *WNT11*, *WNT16*, *WNT2*, *WNT2B*, *WNT3*, *WNT3A*, *WNT4*, *WNT5A*, *WNT5B*, *WNT6*, *WNT8A*).

O ensaio de expressão gênica foi conduzido de acordo com o protocolo do fabricante. Para cada reação, foram utilizados 5µL de Master Mix para 5µL de cDNA de cada amostra com concentração de 50ng em 10µL de reação. As reações ocorreram no termociclador *Step One Plus* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Quatro genes de referência (*18S*, *GAPDH*, *GUSB* e *HPRT1*) foram usados para normalização, considerando seus valores de estabilidade gênica. Esse método de normalização determina os genes de referência com menor variabilidade e expressão gênica mais estável em comparação a todos os outros alvos (VANDESOMPELE *et al.*, 2002).

Os dados foram analisados no programa Applied biosystems® analysis software, v. 1.0. O método de Ct comparativo ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) e o teste T de *Student* foram usados. Uma fold-change  $\leq 0,5$  ou  $\geq 2,0$  e valor de  $P < 0,05$  foram considerados para determinar os genes diferencialmente expressos.

#### 4. 8 Perfil de expressão de miRNAS

O painel *TaqMan® OpenArray® Human MicroRNA* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) foi utilizado para avaliação da expressão de 754 miRNAs em nove amostras de FCO e dez de osso normal. As reações de PCR em tempo real foram conduzidas no aparelho *QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA).

Cada amostra foi dividida e processada em paralelo utilizando *Megaplex™ Primer Pools A e B* e o *kit MicroRNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. Foram utilizados 100ng em 3µL de RNA total extraído de cada amostra. O cDNA resultante da etapa anterior foi amplificado antes da reação de PCR em tempo real através dos pool de primer *Megaplex™ PreAmp Pools A e B* e da solução *TaqMan® PreAmp Master Mix* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA). O cDNA amplificado previamente foi diluído e adicionado ao *TaqMan® OpenArray® Real-Time PCR Master Mix* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) na placa de 384 poços. Em seguida a lâmina contendo o painel *TaqMan® OpenArray® Human MicroRNA* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) foi carregada automaticamente através do sistema *AccuFill™* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA). A lâmina selada foi levada ao aparelho

*QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System* (Applied Biosystems, Foster city, CA, EUA) onde ocorreram as reações de PCR em tempo real. As análises dos resultados foram conduzidas no programa Applied Biosystems® analysis, v. 1.0, aplicando normalização global, teste T de *Student* e a correção de Benjamini e Hochberg (BENJAMINI; HOCHBERG, 1995).

#### 4. 9 Bioinformática e análises de interação de vias

A análise utilizando bioinformática foi descrita previamente como método de genes líderes (BRAGAZZI; SIVOZHELEZOV; NICOLINI, 2011; COVANI *et al.*, 2008; GIACOMELLI; NICOLINI, 2006; ORLANDO; BRAGAZZI; NICOLINI, 2013; POSWAR, FABIANO DE OLIVEIRA *et al.*, 2015). Foi realizada uma busca nas plataformas *miRTarBase* (CHOU *et al.*, 2016) e *TargetScan*, 7.1 (AGARWAL *et al.*, 2015) para determinar o conjunto inicial de genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos no FCO. O critério de inclusão para alvos preditos pelo *TargetScan* foi *total context++ score*  $\geq 1.0$ . Os genes alvos que apresentavam interação funcional com miRNA (MTI, *miRNA-target interactions*) de acordo com *miRTarBase* também foram selecionados. Desse conjunto de alvos, consideramos apenas os genes alvos tanto para os miRNAs superexpressos quanto subexpressos. O programa STRING foi usado para pontuar cada interação e construir um mapa de interações. Os valores WNL (*Weighted Number of Links*) e TIS (*Total Interaction Score*) foram usados para agrupar e determinar os genes líderes como descrito previamente (Poswar *et al.*, 2017). O programa Cytoscape (SHANNON *et al.*, 2003) foi usado para análise topológica. A análise foi complementada pelo estudo ontológico, utilizando o programa BiNGO (*Biological Networks Gene Ontology*) (MAERE; HEYMANS; KUIPER, 2005).

A análise de enriquecimento de vias foi realizada através da ferramenta *DIANA-miRPath*, v 3.0 (VLACHOS *et al.*, 2015). Todos os miRNAs significativamente diferencialmente expressos foram inseridos na análise simultaneamente. As interações de miRNAs validadas experimentalmente provenientes da base de dados DIANA-TarBase foram submetidas ao teste exato de Fisher (distribuição hipergeométrica), adotando a correção FDR (*false discovery rate*), e limite de valor de p de 0,05. O algoritmo de fusão de resultados usado foi a união de vias. Os

genes alvos componentes das vias KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes), altamente enriquecidas, resultantes foram buscados na literatura a fim de levantar sua função gênica e possíveis associações à biologia óssea. Categorizaram-se esses genes alvos de acordo com sua participação na biologia do FCO e dos tipos celulares mesenquimais (osteoblastos, osteoclastos e fibroblastos), segundo estudos prévios de expressão gênica e sequenciamento genético.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

Foram incluídos nove casos de FCO e dez amostras de osso saudável como controles. A média de idade dos indivíduos foi  $37,1 \pm 13,5$  (24 - 58) anos (TABELA 1). Os indivíduos incluídos como controles apresentam média de idade de  $29,7 \pm 15,2$  (18 – 59) anos (TABELA 2).

**Tabela 1:** Caracterização dos casos de FCO incluídos no estudo.

<b>Caso</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Localização</b>
1	F	31	Região periapical do dente 36
2	F	32	Sínfise mandibular, estendendo-se do dente 34 ao 45
3	F	29	Ramo mandibular do lado esquerdo
4	F	57	Região anterior de mandíbula do lado esquerdo
5	F	48	Região de pré-molares do lado esquerdo
6	F	25	Região posterior de mandíbula e ramo ascendente esquerdo
7	M	30	Região posterior de mandíbula e ramo ascendente esquerdo
8	F	58	Região posterior de mandíbula do lado direito
9	F	24	Região de pré-molares do lado direito

**Tabela 2:** Características dos indivíduos incluídos no grupo controle.

Controle	Sexo	Idade	Localização
1	F	59	Osso alveolar do dente 48 incluso
2	M	23	Osso alveolar do dente 18 incluso
3	F	25	Osso alveolar do dente 18 incluso
4	F	21	Osso alveolar do dente 38 incluso
5	F	27	Corpo mandibular em osteotomia sagital
6	F	56	Osso alveolar do dente 38 incluso
7	M	30	Corpo mandibular em osteotomia sagital
8	M	18	Maxila em osteotomia Le Fort 1
9	M	20	Corpo mandibular em osteotomia sagital
10	F	18	Maxila em osteotomia Le Fort 1

## 5.2 Sequenciamento de Nova Geração

Sete amostras de FCO foram sequenciadas (casos #1 a #7). Os indivíduos apresentavam mediana de idade de 31 anos (29 a 57 anos). Foram obtidas entre 270.263 a 402.380 *reads* por amostra. O comprimento médio foi de 120pb. O número de bases sequenciadas variou de 32.469.950 a 48.321.880 e cerca de 96% das bases apresentaram valor de qualidade mínimo 20 (Q20).

As análises resultaram nas seguintes variantes missense de nucleotídeo único (TABELA 3): *PIK3CA* (rs2230461), casos #1, #3, #4; *TP53* (rs1042522), casos #3, #5, #7; *MET* (rs3391795), caso #6; *KIT* (rs3822214), caso #7 e *APC* (rs33974176), caso #7. Todas as variantes foram preditas como benignas ou toleráveis pelos programas PolyPhen e SIFT, respectivamente. Nenhuma variante patogênica foi detectada nos casos estudados.



**Tabela 3:** Variantes detectadas pelo sequenciamento de nova geração nos casos de FCO.

Caso	Posição	Genes	Frequência (%)	Exon	Transcrito	Variante	Mudança de amino ácido	dbSNP	MAF*
1	chr3:178927410	PIK3CA	55.12	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
3	chr3:178927410	PIK3CA	55.45	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
	chr17:7579472	TP53	50.86	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
4	chr3:178927410	PIK3CA	100.00	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
5	chr17:7579472	TP53	49.35	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
6	chr7:116340262	MET	52.00	2	NM_001127500.1	c.1124A>G	p.Asn375Ser	rs33917957	0.021
	chr4:55593464	KIT	49.02	10	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	rs3822214	0.064
7	chr5:112173899	APC	53.63	16	NM_000038.5	c.2608C>T	p.Pro870Ser	rs33974176	0.012
	chr17:7579472	TP53	49.87	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398

\*MAF>0.01 (1000 Genomes Project) são consideradas variantes de nucleotídeo único comuns e representam, potenciais polimorfismos.

dbSNP, single nucleotide polymorphism database; MAF, minor allele frequency.

### 5.3 Array de qPCR

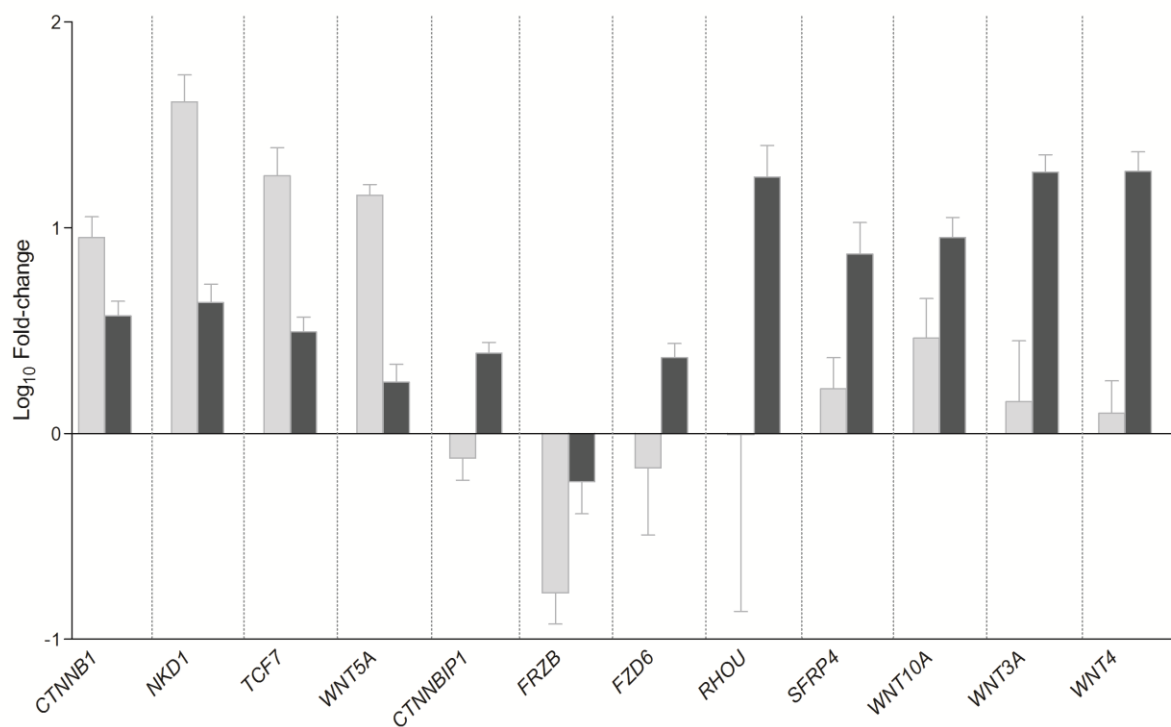
Realizou-se o perfil de expressão de 44 genes em seis amostras de FCO (casos #2, #3, #4, #7,#8, #9) e seis de osso normal (#4, #5, #7, #8, #9, #10) para avaliar o envolvimento da via Wnt/ $\beta$ -catenina na patogenia do FCO.

Os genes *GAPDH*, *GUSB* e *HRPT1* foram selecionados como genes de referência para normalização devido aos menores scores de estabilidade gênica. Doze genes foram diferencialmente expressos no FCO (TABELA 4). A quantificação relativa (*fold-change*) desses genes em todas as amostras, considerando uma amostra de osso normal como amostra de referência (eixo X), foi representada na Figura 7.

**Tabela 4:** Genes diferencialmente expressos no FCO

<b>Gene</b>	<b>Fold-change</b>	<b>Log<sub>10</sub> Fold-change</b>	<b>Valor de p</b>	<b>Regulação</b>
<i>CTNNB1</i>	2,285	0,359	0,047	Superexpresso
<i>NKD1</i>	7,665	0,885	0,004	Superexpresso
<i>TCF7</i>	4,432	0,647	0,012	Superexpresso
<i>WNT5A</i>	7,191	0,857	0,00	Superexpresso
<i>CTNNBIP1</i>	0,283	-0,548	0,003	Subexpresso
<i>FRZB</i>	0,281	-0,551	0,014	Subexpresso
<i>FZD6</i>	0,182	-0,740	0,011	Subexpresso
<i>RHOU</i>	0,017	-1,770	0,002	Subexpresso
<i>SFRP4</i>	0,145	-0,839	0,044	Subexpresso
<i>WNT10A</i>	0,188	-0,726	0,044	Subexpresso
<i>WNT3A</i>	0,008	-2,097	0,043	Subexpresso
<i>WNT4</i>	0,039	-1,409	0,005	Subexpresso

Figura 7 - Quantificação relativa (fold-change) média dos genes diferencialmente expressos no FCO.



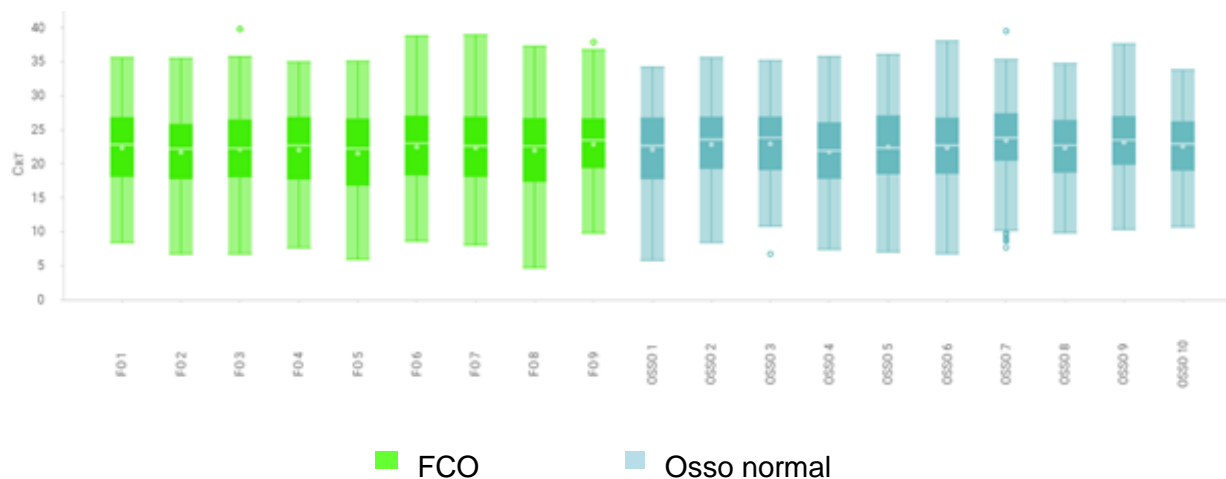
Legenda: As barras de erro representam o erro padrão da média do nível de expressão calculada a partir das seis amostras em cada grupo. Colunas cinza: FCO; Colunas pretas: osso normal (grupo controle); Eixo X: amostra de osso normal utilizada como amostra de referência.

Fonte: Elaborada pelo autor.

#### 5. 4 Perfil de expressão de miRNAs

O nível de expressão de 754 miRNAs foi avaliado em nove amostras de FCO (#1 - #9) e dez amostras controles de osso normal (#1 - #10). A distribuição do conjunto de valores de *threshold* relativo ( $C_{RT}$ ) dos miRNAs avaliados em cada amostra foi representada na Figura 8. Dentre os 16 miRNAs diferencialmente expressos no FCO, cinco foram superexpressos e 11 subexpressos ( $p < 0.05$ ) em comparação com o grupo controle (TABELA 5).

Figura 8 - *Box plot* do conjunto de valores de *threshold* relativo ( $C_{RT}$ ) de cada amostra de FCO e de osso sadio.



Fonte: *Output* do módulo de análise do programa Applied Biosystems® analysis software, v. 1.0.

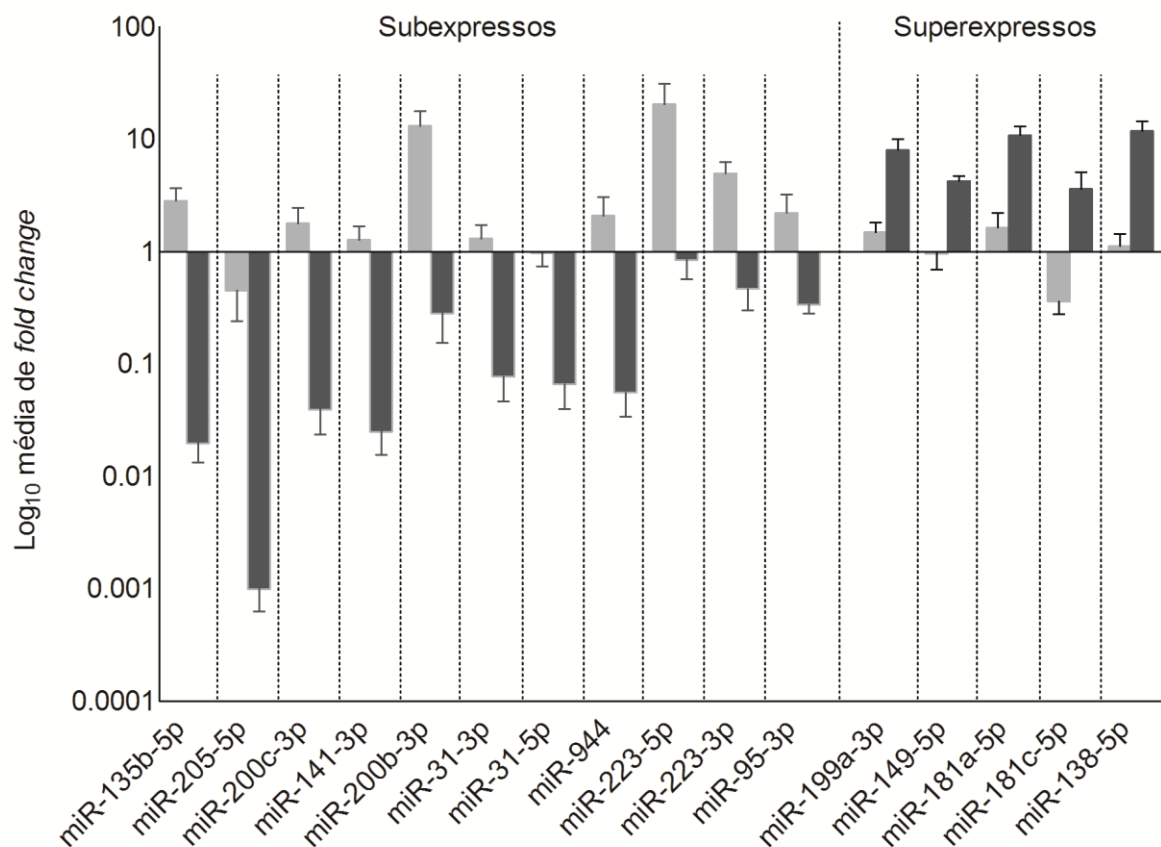
**Tabela 5:** miRNAs significativamente desregulados no FCO.

miRNA	Sequência	Log <sub>10</sub> Fold Change	Valor de p corrigido*	Regulação
hsa-miR-135b-5p	UAUGGCUUUUCAUUCCUAUGUGA	-2,15	0,037	Subexpresso
hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUUCCACCGGAGUCUG	-2,15	0,015	Subexpresso
hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAUAUGAUGGA	-1,80	0,015	Subexpresso
hsa-miR-141-3p	UACACUGUCUGGUAAAGAUGG	-1,68	0,015	Subexpresso
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAAUGAUGA	-1,64	0,027	Subexpresso
hsa-miR-31-3p	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCA	-1,38	0,024	Subexpresso
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	-1,36	0,015	Subexpresso
hsa-miR-944	AAAUUAUUGUACAUCGGAUGAG	-1,29	0,037	Subexpresso
hsa-miR-223-5p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	-1,07	0,037	Subexpresso
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	-0,94	0,028	Subexpresso
hsa-miR-95-3p	UUCAACGGGUUUUAUUGAGCA	-0,64	0,039	Subexpresso
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	0,72	0,037	Superexpresso
hsa-miR-149-5p	UCUGGCUCCGUGUCUUCACUCCC	0,79	0,015	Superexpresso
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	0,90	0,015	Superexpresso
hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU	0,93	0,015	Superexpresso
hsa-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	1,01	0,015	Superexpresso

\*Valor de *P* com correção de Benjamini-Hochberg

A Figura 9 demonstra a quantificação relativa dos miRNAs diferencialmente expressos no FCO, considerando uma amostra de osso normal como amostra de referência.

Figura 9 - Gráfico da expressão de miRNAs.

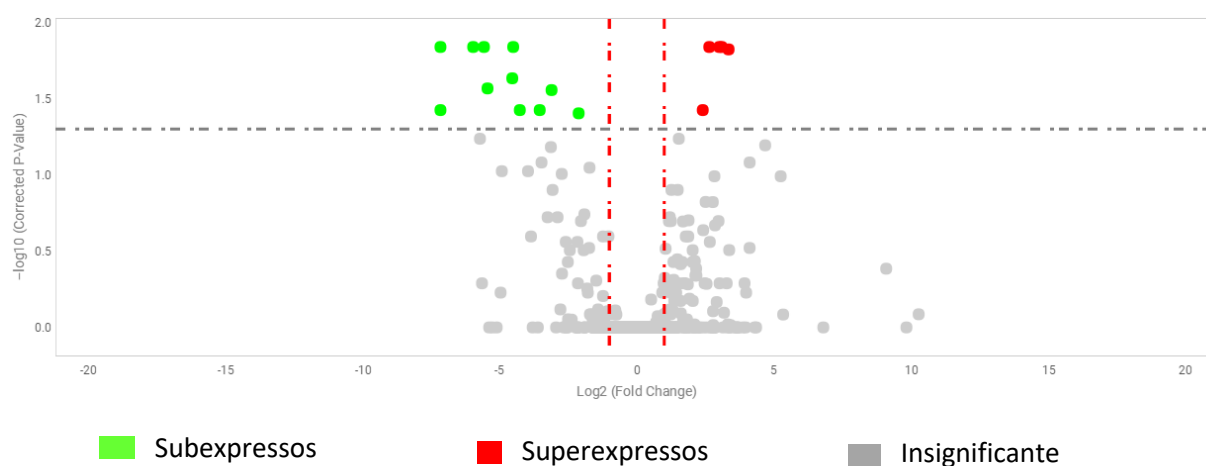


Legenda: Quantificação relativa (*fold change*) média, em escala logarítmica, das amostras de osso normal e de FCO para os miRNAs significativamente desregulados no FCO em relação ao controle. Uma amostra de osso normal foi considerada como amostra de referência (Eixo X). Barras de erro representam o erro padrão do nível de expressão médio calculado de nove amostras de FCO e dez amostras controle. Colunas cinza: controle; Colunas pretas: FCO.

Fonte: Elaborada pelo autor.

A análise estatística dos resultados obtidos no ensaio de perfil de expressão de miRNAs foi representada no gráfico *Volcano* (FIGURA 10) gerado pelo módulo de análise de quantificação relativa do programa *Applied biosystems® analysis software*, versão 1.0. O eixo x indica *fold change* entre os dois grupos, em escala logarítmica, sendo que a superexpressão e a subexpressão aparecem simétricas. O eixo y representa o valor de p para um t-teste de diferenças entre amostras, em escala de log negativo, adotando a correção de Benjamin-Hochberg (Benjamin & Hochberg, 1995).

Figura 10 - *Volcano plot* do grupo FCO, utilizando como grupo de referência as amostras de osso sadio.



Legenda: A linha horizontal representa o valor de  $p = 0,05$ , sendo que os pontos situados acima são miRNAs cujos valores de  $p$  são menores do que 0,05. Os pontos à esquerda da linha vertical vermelha à esquerda representam miRNAs subexpressos e aqueles à direita da segunda linha vertical, representam miRNAs superexpressos. Os localizados entre as duas linhas vermelhas apresentam *fold change* entre 0,5 e 2.

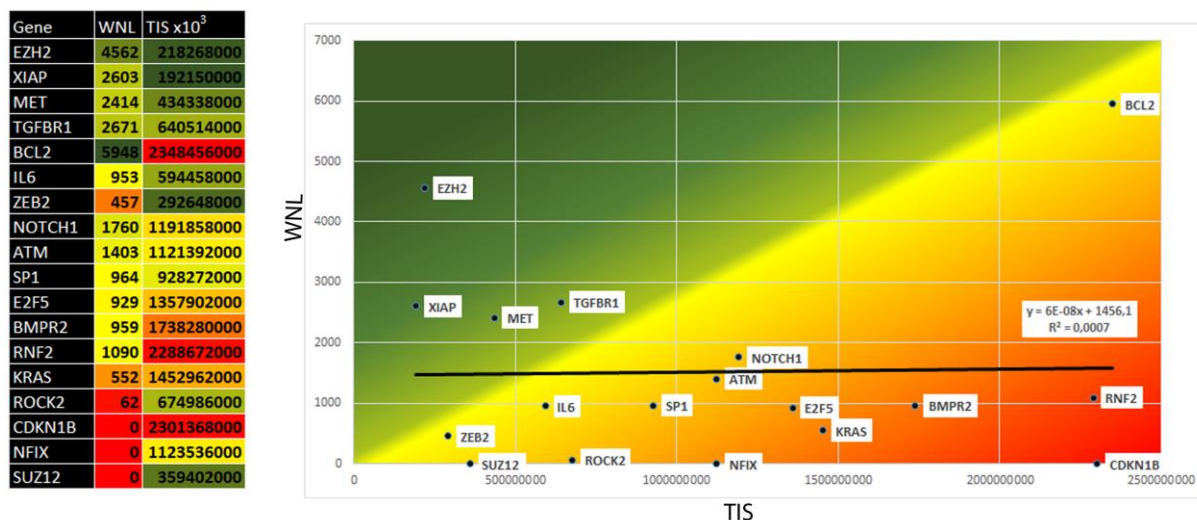
Fonte: *Output* do módulo de análise do programa Applied Biosystems® analysis software, v. 1.0.

## 5. 5 Bioinformática e análises de interação de vias

A pesquisa por genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos no FCO resultou em 322 genes relacionados ao grupo de miRNAs subexpressos e 197 ao grupo superexpresso. A análise de *networks* mostrou que essas proteínas resultantes interagiam mais entre elas mesmas do que o esperado em um conjunto aleatório de proteínas, indicando uma conexão biológica em potencial.

Considerando apenas os genes alvos comuns aos grupos de miRNAs super e subexpressos, 18 genes foram selecionados. A network seguiu a lei de potências (correlação= 0,946;  $R^2= 0,862$ ) em concordância com a teoria topológica de redes livre de escala. Quatro genes (*XIAP*, *EZH2*, *MET* e *TGFBR1*) foram classificados como líderes (FIGURA 11). A análise ontológica mostrou diferentes mecanismos associados a esses genes (FIGURA 12).

Figura 11 - Análise de *networks*

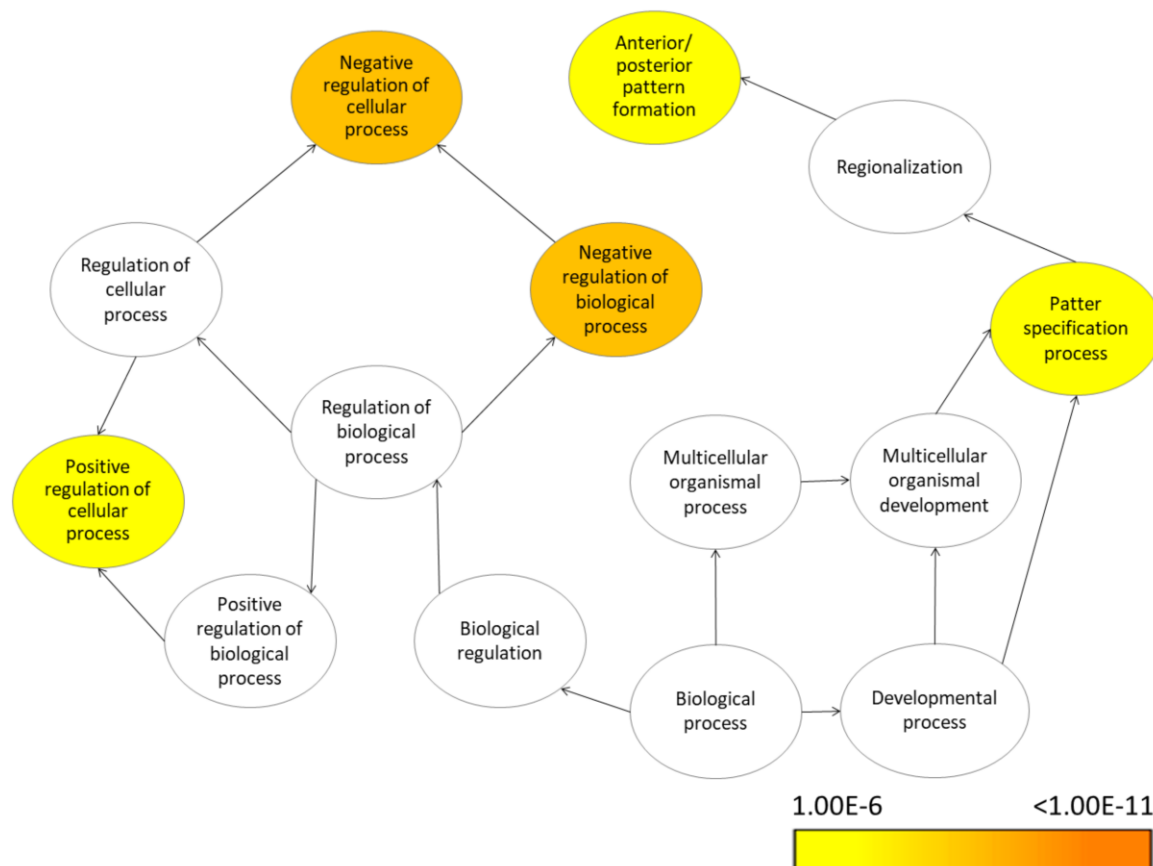


Legenda: Análise de *networks*, exibindo *heatmap* e gráfico de conectividade relacionada à doença (WNL, *weighted number of links*) versus conectividade global (TIS, *Total Interactions Score*). Os eixos Y e X representam os valores de WNL e TIS, respectivamente. *EZH2*, *XIAP*, *MET* e *TGFBR1* foram considerados genes líderes por estarem no cluster com maior razão WNL/TIS e acima da linha de tendência linear. A variação da escala de cor do verde ao vermelho representa os valores crescentes da razão WNL/TIS.

Fonte: Elaborada pelo autor.



Figura 12 - Análise ontológica.



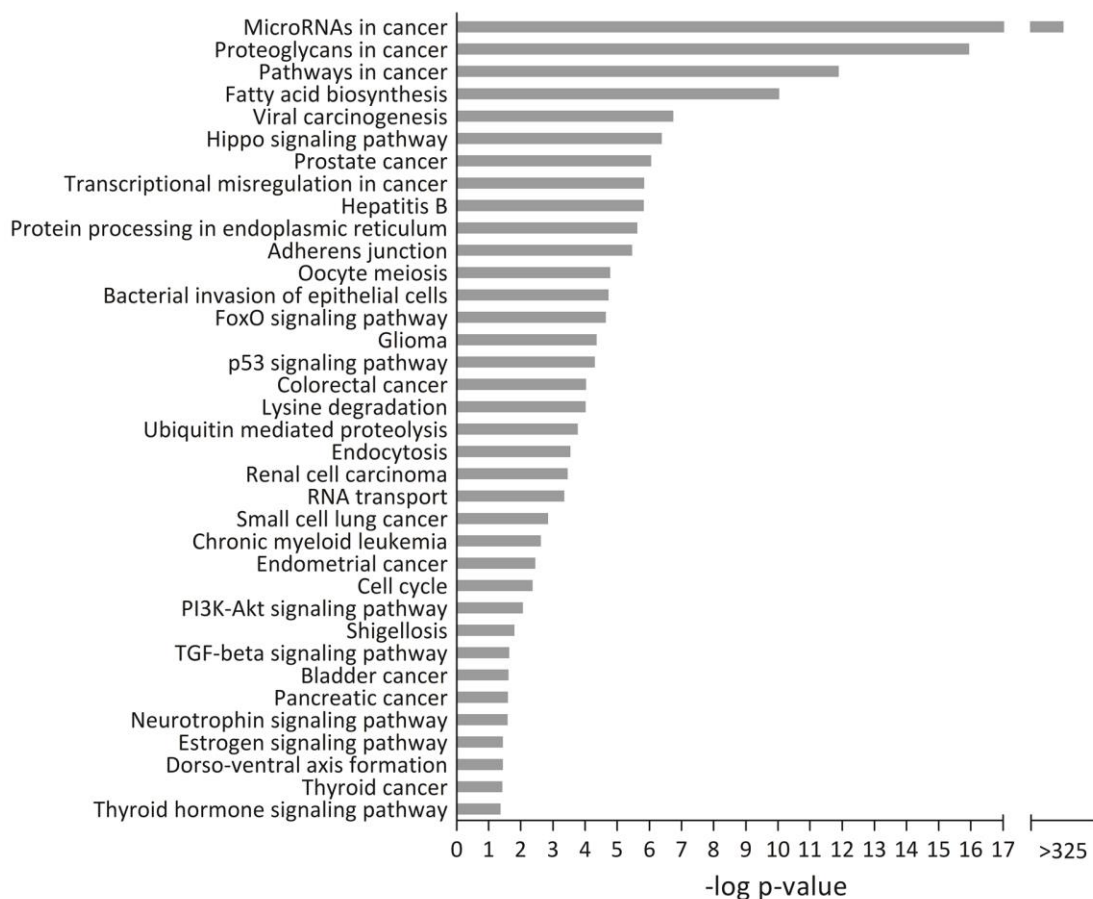
Legenda: O mapa exibe as categorias funcionais predominantes no conjunto de genes alvos dos miRNAs diferencialmente expressos no FCO. As categorias estatisticamente superexpressas são representadas pelos nós amarelos a laranja ( $P \leq 1.00E-6$ , correção de Benjamini-Hochberg, distribuição hipergeométrica). Principais mecanismos envolvidos: regulação negativa de processos celulares, regulação negativa de processos biológicos, regulação positiva de processos celulares, formação anterior/posterior.

Fonte: Programa *Biological Networks Gene Ontology* (modificada para melhor resolução)

A análise de enriquecimento de vias, considerando os mapas de vias KEGG estatisticamente significativos ( $p < 0,05$ ), foi representada na Figura 13. As vias mais relevantes e altamente enriquecidas incluíram: *Proteoglycans in cancer* (hsa05205); *Pathways in cancer* (hsa05200); *Hippo signaling pathway* (hsa04390);

*Transcriptional misregulation in cancer* (hsa05202); *Adherens junction* (hsa04520); *FoxO signaling pathway* (hsa04068) e *p53 signaling pathway* (hsa04115).

Figura 13 - Análise de enriquecimento de vias.



Legenda: Mapas de vias KEGG estatisticamente significativos ( $p < 0.05$ ) resultantes do algoritmo união de vias (Eixo Y). A partir desse conjunto, selecionaram-se as vias KEGG mais relevantes.

Fonte: Elaborada pelo autor.

Analisaram-se também as funções putativas dos genes alvos dos mapas de vias KEGG mais relevantes, identificando na literatura aqueles expressos no FCO e nos tipos celulares osteoblastos, osteoclastos e fibroblastos, de acordo com estudos prévios (Tabela 6) (GRANCHI *et al.*, 2010; MOREAUX *et al.*, 2010; ORNITZ; ITOH, 2015; QI *et al.*, 2003; TONG *et al.*, 2011; ZHANG, XIUQIN *et al.*, 2006).

**Tabela 6:** Sumário dos genes alvos de miRNAs mais relevantes presentes nos mapas de vias KEGG e expressos no FCO e em tipos celulares mesenquimais.

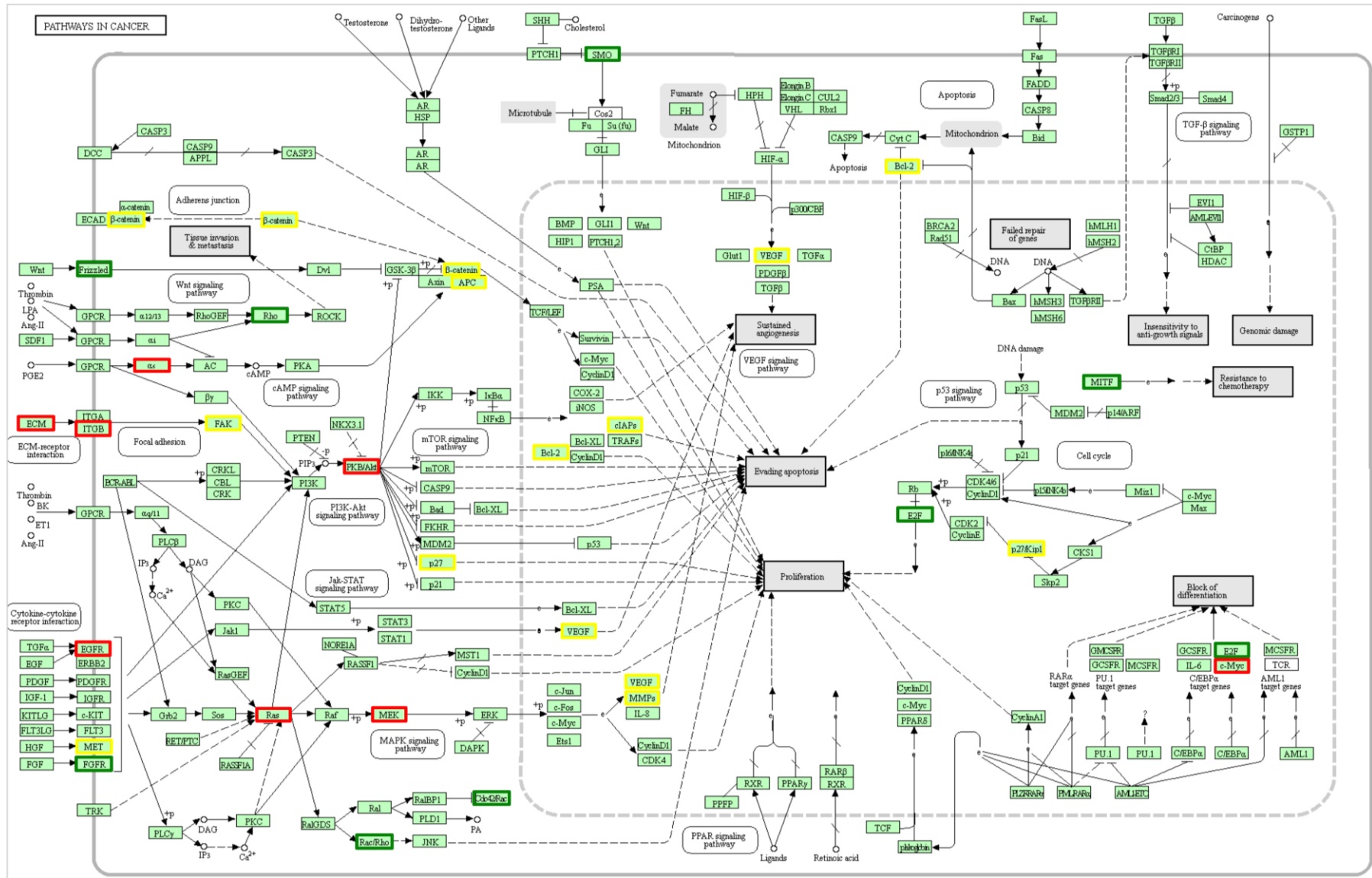
Mapas de vias KEGG	Fibroma cemento-	Tipos celulares		
	ossificante (HORVAI; JORDAN, 2014; ZHANG, TONG-HAN <i>et al.</i> , 2010)	Osteoblasto (GRANCHI <i>et al.</i> , 2010; QI <i>et al.</i> , 2003)	Osteoclasto (MOREAUX <i>et al.</i> , 2010)	Fibroblasto (ORNITZ; ITOH, 2015; TONG <i>et al.</i> , 2011; ZHANG, XIUQIN <i>et al.</i> , 2006)
Proteoglycans in cancer	<i>CTNNB1</i>	<i>AKT1, AKT2, AKT3, CAV2, CBL, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FN1, FZD6, HRAS, KRAS, MAP2K1, MET, MMP2, NRAS, PTK2, PTPN11, RHOA, SMO, THBS1, VEGFA</i>	<i>CBL, RAC1, RDX</i>	<i>FGFR1, VEGFA</i>
MicroRNAs in cancer	<i>APC, NOTCH1</i>	<i>BCL2, CYP1B1, DNMT3A, E2F1, EGFR, ERBB2, FGFR3, HRAS, IRS1, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, RHOA, SOX4, THBS1, VEGFA</i>	<i>RDX</i>	<i>FGFR3, VEGFA</i>
Hippo signaling pathway	<i>APC, CTNNB1</i>	<i>CTNNB1, FZD6, SMAD1, SERPINE1</i>		<i>CTGF</i>
Pathways in cancer	<i>CTNNB1, APC</i>	<i>MET, CBL, FGFR3, BCL2, MMP2, CTNNB1, GNAQ, SMO, VEGFA, E2F1, FZD6, RHOA, KRAS, NRAS, EGFR, PTK2, FN1, HRAS, AKT3, MAP2K1, GNAS, AKT2, COL4A1</i>	<i>CBL, RAC1, PLD1, MITF</i>	<i>FGFR1, FGFR3, VEGFA, IL6</i>
Transcriptional misregulation in cancer		<i>H3F3A, MET, PTK2, SMAD1</i>		<i>IL6</i>
Adherens junction	<i>CTNNB1</i>	<i>EGFR, CTNNB1, MET, PVRL1, RHOA</i>		<i>FGFR1</i>
PI3K-Akt signaling pathway		<i>AKT3, BCL2, COL1A1, COL5A1, EGFR, FGFR3, FN1, HRAS, IRS1, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PTK2, THBS1, VEGFA</i>	<i>RAC1</i>	<i>FGFR1, FGFR3, VEGFA</i>
TGF-beta signaling pathway		<i>RHOA</i>		
FoxO signaling pathway		<i>AKT3, EGFR, HRAS, IRS1, KRAS, MAP2K1, NRAS, SMAD4</i>		<i>IL6</i>

<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #f4a460; border: 1px solid black;"></span>	Gene presente em 4 mapas de vias Kegg relevantes
<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #ff0000; border: 1px solid black;"></span>	Gene presente em 5 mapas de vias Kegg relevantes
<span style="display: inline-block; width: 15px; height: 10px; background-color: #800000; border: 1px solid black;"></span>	Gene presente em 6 mapas de vias Kegg relevantes

Dois mapas de vias KEGG estatisticamente significativos e biologicamente relevantes (*Pathways in cancer*, hsa05200, e *Proteoglycans in cancer*, hsa05205) foram analisados de acordo com o papel das vias na biologia óssea, identificando os genes alvos (TABELA 6) nos mapas e destacando sua regulação pelos miRNAs diferencialmente expressos no FCO (FIGURAS 14 e 15). Observando o mapa *Pathways in câncer* (hsa05200), nota-se que as vias de sinalização MAPK, Mtor, Wnt, PI3K-Akt e de adesão focal apresentam genes chave regulados por miRNAs diferencialmente expressos no FCO (FIGURA 14). O mapa de Proteoglicanos em câncer (FIGURA 15) evidencia que miRNAs superexpressos no FCO podem atuar como supressores de tumor ao inibirem CD44 e EGFR, por exemplo.

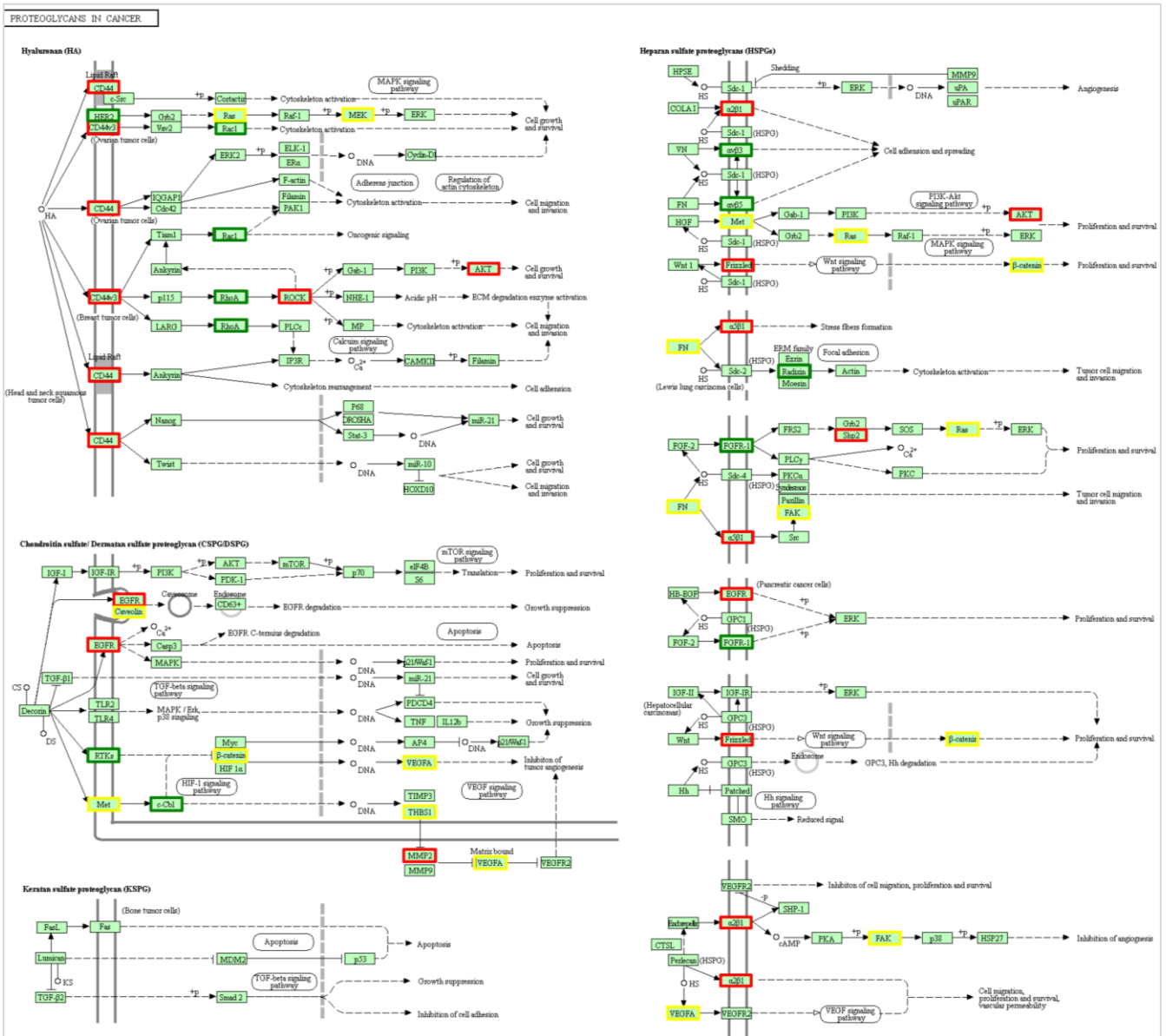
Figura 14 - Mapa de vias em câncer (*Pathways in cancer, hsa05200*)



Legenda: Os genes destacados em vermelho são regulados por miRNAs superexpressos no FCO. Os marcados em amarelo são regulados tanto por miRNAs superexpressos quanto subexpressos no FCO. E os genes em verde são regulados por miRNAs subexpressos no FCO.

Fonte: Plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) modificada pelo autor.

Figura 15 - Mapa de proteoglicanos em câncer (*Proteoglycans in cancer, hsa05205*)



Legenda: Os genes destacados em vermelho são regulados por miRNAs superexpressos no FCO. Os marcados em amarelo são regulados tanto por miRNAs superexpressos quanto subexpressos no FCO. E os genes em verde são regulados por miRNAs subexpressos no FCO.

Fonte: Plataforma Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) modificada pelo autor.

## 6 DISCUSSÃO

Mutações pontuais em Asp56 de *CTNNB1* e Glu1229 de *APC* foram descritas em casos de FCO por Horvai & Jordan (Horvai & Jordan, 2014). No presente trabalho, encontrou-se uma variante não patogênica no gene *APC* em um caso de FCO que apresentou simultaneamente variantes nos genes *KIT* e *TP53*. As variantes citadas representam potencialmente polimorfismos, por apresentarem uma frequência do alelo minoritário (MAF) maior que 1%. No entanto, como não se encontraram outras mutações nos genes pertencentes à via Wnt/ $\beta$ -catenina estudados (*APC* e *CTNNB1*) nas amostras de FCO, esses eventos genéticos parecem ter um papel minoritário no desenvolvimento dessa neoplasia. O painel genético analisado inclui apenas mutações *hotspot*, restringindo os resultados a mutações já descritas em genes supressores de tumor ou oncogenes.

Os resultados do sequenciamento de nova geração também revelaram uma variante no gene *PIK3CA*, não patogênica e sugestiva de polimorfismo genético. Essa variante também foi descrita em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço e em amostras correspondentes de tecido normal (QIU, WANGLONG *et al.*, 2006). Várias mutações em *PIK3CA* foram descritas em neoplasias humanas, predominantemente em duas regiões *hotspot* nos éxons 9 e 20 (BACHMAN *et al.*, 2004). Mutações nesse gene também foram descritas no osteossarcoma (CHOY *et al.*, 2012; MÜLLER *et al.*, 2007) e no ameloblastoma (BROWN *et al.*, 2014).

Outra variante missense foi detectada no protooncogene *MET*, que está associado a receptores de fatores de crescimento (DEAN *et al.*, 1985). Essa variante não foi predita como patogênica pela análise *in silico* e foi relatada previamente como germinativa em outras neoplasias (LIU, YAO *et al.*, 2012). A sinalização mediada por MET é reguladora do processo de osteogênese, e mutações nesse gene foram descritas como causadoras da displasia osteofibrosa (GRAY *et al.*, 2015). Como nenhuma mutação recorrente foi encontrada no presente estudo, o sequenciamento completo do exoma seria necessário para decifrar as bases genéticas dessa condição neoplásica.

A via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é essencial para o desenvolvimento craniofacial, principalmente por controlar a diferenciação de osteoblastos a partir de células tronco mesenquimais humanas. A ligação de Wnt inibe a atividade de GSK3 $\beta$ , resultando no acúmulo de  $\beta$ -catenina e sua translocação para o núcleo.  $\beta$ -catenina funciona como um coativador transcricional para genes associados à diferenciação osteoblástica (HERR; HAUSMANN; BASLER, 2012). A falta de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina direciona a diferenciação de células precursoras de osteoblastos para adipócitos ao invés de osteoblastos (SONG, LIGE *et al.*, 2012).

Essa via de sinalização é necessária para diferenciação celular de progenitores esqueléticos e formação óssea. No entanto, níveis muito elevados de sinalização também podem potencialmente suprimir a maturação de osteoblastos, como sugerido na displasia fibrosa esquelética (REGARD *et al.*, 2011). Apesar das mutações ativadoras em G $\alpha$ (s) descritas na displasia fibrosa potencializarem a sinalização Wnt,  $\beta$ -catenina nuclear não foi observada em displasias fibrosas craniofaciais (Horvai & Jordan, 2014).

Além da via de sinalização dependente de  $\beta$ -catenina (sinalização Wnt canônica), os ligantes Wnt também podem sinalizar através de vias independentes de  $\beta$ -catenina (sinalização Wnt não-canônica) que podem ser ainda classificadas em polaridade celular planar e via Wnt/Ca<sup>2+</sup> (KOMIYA; HABAS, 2008). Em relação ao FCO, os resultados do presente estudo mostraram superexpressão de *WNT5A* e subexpressão de *WNT3A*. Wnt5a é um ligante com dupla função; dependendo do receptor disponível, ele pode ativar ambas as vias de sinalização canônica e não-canônica. Esse ligante pode induzir uma diminuição dose-dependente da ativação por Wnt3a e conseqüentemente inibir a via Wnt/ $\beta$ -catenina. Apesar de os resultados mostrarem subexpressão de Wnt3a no FCO, a ativação da via canônica ainda é possível quando as células expressam os receptores mFz4 e LRP5. Nesse contexto,  $\beta$ -catenina finalmente acumula-se no núcleo (MIKELS; NUSSE, 2006). O perfil encontrado no presente estudo é consistente com a habilidade de Wnt5a suprimir a expressão de Wnt3a. Por outro lado, a superexpressão de *CTNNB1* e *TCF7* sugerem a ativação da via canônica Wnt/ $\beta$ -catenina, mas estudos funcionais são necessários para elucidar essa ativação.



TCF7 é um fator de transcrição a jusante na via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina. A diferenciação osteoblástica de células-tronco da medula óssea induzida pela ativação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina resultou no aumento da expressão de  $\beta$ -catenina e Tcf7 (ZHOU, RI *et al.*, 2016). No FCO, *TCF7* e *CTNNB1* encontraram-se simultaneamente superexpressos. A superexpressão desses genes e da proteína  $\beta$ -catenina pode ser inibida por antagonistas da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina como as proteínas secretadas relacionadas a Frizzled (secreted Frizzled-related protein - SFRP) (ZHOU, RI *et al.*, 2016). Os presentes resultados também mostraram subexpressão de *SFRP4* no FCO. A perda funcional de *SFRP4* pode causar alterações significativas na estrutura óssea, caracterizadas pelo aumento da massa óssea trabecular devido à deposição excessiva de osso e supressão da reabsorção óssea. Esse fenótipo foi atribuído a uma resposta celular osteogênica à sinalização Wnt (HARAGUCHI *et al.*, 2016). Estudos adicionais são necessários para demonstrar a possível relevância desse mecanismo no desenvolvimento do FCO.

O gene *RHOA* é importante para a diferenciação de osteoclastos e foi subexpresso nas amostras de FCO. Durante a osteoclastogênese induzida por RANKL, há superexpressão de *RHOA*. Além disso, sua supressão impede a fusão dos precursores de osteoclastos (BRAZIER *et al.*, 2006). *RHOA* potencialmente modula a sinalização  $\alpha\beta3$  para regular a adesão dos precursores de osteoclastos e permitir a fusão dos mesmos (BRAZIER *et al.*, 2009). A subexpressão de *RHOA* pode comprometer a absorção e o remodelamento ósseo através da regulação da diferenciação de osteoclastos no FCO. No entanto, estudos adicionais são necessários para mostrar a relevância desse processo no FCO.

A ativação ou não da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina é um aspecto controverso em neoplasias ósseas em humanos (DU *et al.*, 2014; GBDUPS *et al.*, 2009). O presente estudo mostrou superexpressão de genes a jusante da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina (*CTNNB1* e *TCF7*) além de subexpressão de antagonistas dessa via (*SFRP4*, *FRZB* e *CTNNBIP1*). Em adição, componentes celulares do FCO exibiram expressão nuclear de  $\beta$ -catenina em 25% dos tumores estudados por Horvai & Jordan (Horvai & Jordan, 2014).

Por outro lado, *NKD1*, um antagonista passivo que inibe a via Wnt canônica ao prevenir a entrada de  $\beta$ -catenina no núcleo (ANGONIN; VAN RAAY, 2013), apresentou-se superexpresso no presente trabalho. *NKD1* atua como regulador de *feedback* negativo de Wnt e sua interação com  $\beta$ -catenina é especificamente dependente da ativação da via pela ligação de Wnt (LARRAGUIBEL *et al.*, 2015). Além disso, *NKD1* é ativado apenas quando os níveis de sinalização por Wnt excedem os limites homeostáticos (ANGONIN; VAN RAAY, 2013). Portanto, a superexpressão de *NKD1* no FCO pode ser um resultado da ativação excessiva da via Wnt/ $\beta$ -catenina. Em conjunto, esses achados sugerem a ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina no FCO. No entanto, estudos ainda são necessários para determinar a complexa regulação dessa via de sinalização no FCO.

Diferenças nos níveis de expressão de miRNAs representam uma variedade de funções regulatórias pós-transcricionais dessas pequenas moléculas de RNA não codificante. Análises de bioinformática permitem a interpretação de uma grande quantidade de dados obtidos em experimentos biológicos. O método de identificação de genes líderes objetivou revelar os genes alvos mais relevantes na patogênese do FCO: *EZH2*, *XIAP*, *MET* e *TGFBR1*.

O primeiro gene líder, *EZH2*, é responsável pela trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27). Codifica, portanto, uma proteína metiltransferase que forma a subunidade catalítica do complexo proteico PRC2 (*polycomb repressive complex 2*), essencial para a dinâmica de expressão e silenciamento de genes (Cao *et al.*, 2002). Estudos prévios mostraram que hsa-miR-138-5p tem esse regulador epigenético como alvo, através da ligação à região 3' não traduzida (3' UTR), suprimindo sua expressão tanto ao nível de mRNA quanto ao nível proteico (LIU, XIQIANG *et al.*, 2011; ZHANG, HUIJUN *et al.*, 2013). Apesar de hsa-miR-138-5p encontrar-se subexpresso em neoplasias malignas como carcinoma de células escamosas (LIU, XIQIANG *et al.*, 2011), câncer de pulmão (ZHANG, HUIJUN *et al.*, 2013) e glioblastoma multiforme (QIU, SHUWEI *et al.*, 2013), esse miRNA encontra-se superexpresso no FCO.

O segundo gene descrito no presente estudo como líder no FCO, *XIAP*, codifica uma proteína capaz de inibir diretamente as caspases de morte celular 3, 7 e 9. Essas proteases são efetores importantes de apoptose. Dessa forma, *XIAP*

pode ser um inibidor de morte celular (DEVERAUX *et al.*, 1997; SRINIVASULA *et al.*, 2001). Esse gene é alvo de miRNAs diferencialmente expressos no FCO. Has-miR-181a-5p e miR-200bc/429 regulam a expressão de *XIAP* pela ligação direta à 3'UTR (ZHU, DAN XIA *et al.*, 2012; ZHU, WEI *et al.*, 2012). A superexpressão de has-miR-181a-5p no FCO pode favorecer a apoptose, uma vez que esse miRNA é inibidor de *XIAP*. Por outro lado, a subexpressão de miR-200bc observada no FCO pode resultar em um efeito antiapoptótico. A expressão de miR-200bc/429 reduz os níveis proteicos de *XIAP* e sensibiliza linhagens celulares de câncer gástrico e de pulmão a fármacos antineoplásicos que induzem apoptose (ZHU, WEI *et al.*, 2012). Estudos funcionais podem revelar o efeito desses miRNAs sobre o controle da apoptose no FCO.

O terceiro gene apontado como líder na patobiologia do FCO, oncogene *MET*, é homólogo às tirosinas quinases e está relacionado a receptores de fatores de crescimento (DEAN *et al.*, 1985). Gray *et al.* (2015) demonstrou a imunoexpressão de *MET* em osteoblastos e osteoclastos de tecidos lesionais de displasia osteofibrosa, e mostrou seu papel como regulador da osteogênese no osso cortical (GRAY *et al.*, 2015). No presente estudo, dois miRNAs diferencialmente expressos no FCO participam da regulação de *MET*. Hsa-miR-199a encontra-se superexpresso no FCO e hsa-miR-31-5p está subexpresso. Enquanto a superexpressão de hsa-miR-199a inibe a expressão de *MET* em linhagens celulares de fibroblastos (KIM *et al.*, 2008), a subexpressão de hsa-miR-31-5p em linhagens celulares de melanoma parece contribuir para a expressão de *MET* (ASANGANI *et al.*, 2012). Estudos adicionais são necessários para demonstrar quais desses mecanismos são relevantes para o desenvolvimento e progressão do FCO.

O quarto gene líder, *TGFBR1*, codifica um receptor de quinase serina/treonina que realiza a transdução de sinal de TGF- $\beta$ . A ligação é dependente da expressão do receptor tipo II, formando um complexo heteromérico (FRANZÉN *et al.*, 1993). *TGFBR1* é um dos alvos de hsa-miR-181a-5p. A superexpressão desse miRNA bloqueia a via de sinalização TGF- $\beta$ , resultando na subexpressão de *TGFBR1* aos níveis de mRNA e proteico em células tronco mesenquimais (LIU, LIU *et al.*, 2012). Além disso, hsa-miR-181a-5p foi descrito como um promotor da diferenciação osteoblástica, através de regulação negativa de moléculas sinalizadoras da via TGF- $\beta$ , como *TGFBR1* (BHUSHAN *et al.*, 2013). Esse último achado alinha-se aos

nossos resultados, de forma que a superexpressão de hsa-miR-181a-5p, possivelmente promove a diferenciação osteoblástica no FCO. Esse gene é também alvo de has-miR-135b-5p que se liga diretamente ao sítio complementar na 3'UTR em células tronco embrionárias humanas (BHINGE *et al.*, 2014). Os presentes resultados mostraram subexpressão de has-miR-135b-5p, mas o papel desse fenômeno no contexto tumoral do FCO é incerto.

A análise de enriquecimento de vias revelou mapas KEGG associados ao conjunto de miRNAs diferencialmente expressos no FCO. De acordo com a biologia óssea e do FCO, selecionaram-se as vias mais significativas. A relevância das vias “Proteoglicanos em câncer” (GAO *et al.*, 2015; HAMEETMAN *et al.*, 2007; PAULIS *et al.*, 2015), “MicroRNAs em câncer” (JONES *et al.*, 2012; LIAN *et al.*, 2015) “Vias em câncer”, vias de sinalização p53, PI3K-Akt (CHEN, YANG *et al.*, 2017; KEREMU *et al.*, 2017; NORD *et al.*, 2013; SONG, RUIPENG *et al.*, 2015; WANG, JIN *et al.*, 2017), Hippo (CHAI; XU; GUO, 2017; MA *et al.*, 2017), FoxO (GUAN *et al.*, 2015; WANG, YU; ZHOU; GRAVES, 2014) e TGF-beta (KARATHANASI *et al.*, 2013; LI, SHAOHUA; LI; CHENG, 2014; SUN *et al.*, 2017; ZHOU, LU *et al.*, 2013) foi avaliada previamente em neoplasias ósseas, tumores odontogênicos e na osteogênese. Análises funcionais e proteômicas devem ser realizadas em estudos futuros para demonstrar a possível relevância de alguma dessas vias no desenvolvimento do FCO.

Corroborando com os resultados do método de genes líderes, os genes *XIAP* e *MET* identificados como líderes no FCO foram também descritos como alvos de miRNAs em vias KEGG estatisticamente significativas e relevantes associadas ao conjunto de miRNAs diferencialmente expressos no FCO. *MET* foi observado na maioria dessas vias (*Proteoglycans in cancer*, *MicroRNAs in cancer*, *Pathways in cancer* e *PI3K-Akt*) como alvo de of hsa-miR-181a-5p (KORHAN; ERDAL; ATABEY, 2014) e hsa-miR-199a-3p (KIM *et al.*, 2008). *XIAP* foi demonstrado como um alvo de hsa-miR-200bc (ZHU, WEI *et al.*, 2012) e miR-181a-5p (ZHU, DAN XIA *et al.*, 2012) no mapa *Pathways in cancer*.

Conforme citado anteriormente, mutações pontuais em *CTNNB1* e *APC* foram identificadas no FCO (HORVAI; JORDAN, 2014). Em coerência com ativação da via Wnt/ $\beta$ -catenina, células do FCO exibiram expressão nuclear de  $\beta$ -catenina em 25%

dos tumores (HORVAI; JORDAN, 2014). A análise de enriquecimento de vias revelou esses dois genes como alvos de miRNAs nas vias *Proteoglycans in cancer*, *MicroRNAs in cancer*, *Hippo signalling pathway* e *Pathways in cancer*. No entanto, essa interação alvo-miRNA (MTI) de ambos os genes não foi validada funcionalmente (BALAKRISHNAN *et al.*, 2014; PILLAI *et al.*, 2014), restringindo possíveis inferências sobre o efeito da desregulação desses miRNAs no FCO.

Apesar de o tamanho amostral ser limitado, considerando o amplo painel avaliado assim como o fato das amostras utilizadas serem constituídas de tecido fresco, os resultados apresentados trazem um novo entendimento do FCO em relação à sua patobiologia. A pesquisa de mutações hotspot em 50 genes foi incapaz de detectar as bases genéticas da patogênese do FCO. No entanto, o presente trabalho fornece evidências da desregulação da via de sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina no FCO.

FCO apresentou uma expressão aberrante de miRNAs. Análises dos genes alvos desses miRNAs diferencialmente expressos no FCO revelou potenciais vias e mecanismos envolvidos na patogênese do FCO. Apesar de o presente trabalho apresentar resultados robustos, trata-se de uma pesquisa inicial das alterações moleculares presentes no FCO e mais estudos são necessários para elucidar o papel dessas alterações na origem e progressão do FCO.

Estudos futuros como o sequenciamento completo do exoma poderiam revelar alterações genômicas ainda não encontradas que fundamentem a patogênese do FCO. Da mesma forma, análises proteômicas viabilizariam o entendimento não apenas da expressão de proteínas, mas também de modificações pós-traducionais que possam justificar o fenótipo do FCO.

## 7 CONCLUSÃO

Variantes genéticas potencialmente patogênicas em genes comumente mutados no câncer não são encontradas em FCO

A via Wnt/ $\beta$ -catenina se encontra hiperativa no FCO, indicando possível mecanismo envolvido na patogênese do FCO.

Alguns miRNAs estão expressos de forma aberrante no FCO, revelando o envolvimento de regulação epigenética de importantes vias no desenvolvimento dessa neoplasia. O conjunto de miRNAs diferencialmente expressos no FCO participa da regulação de importantes vias de sinalização envolvidas em processos neoplásicos, como controle do ciclo celular, da regulação de fatores de crescimento e do microambiente tumoral, além de mecanismos fisiológicos como a diferenciação osteoblástica e osteogênese.

Os genes líderes alvos dos miRNAs diferencialmente expresso no FCO incluem EZH2, XIAP, MET e TGFBR1, e são potenciais alvos para validação funcional.

## REFERÊNCIAS

AGARWAL, Vikram *et al.* Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *eLife*, v. 4, n. AUGUST2015, p. 1–38, 2015.

ANGONIN, Diane; VAN RAAJ, Terence J. Nkd1 Functions as a Passive Antagonist of Wnt Signaling. *PLoS ONE*, v. 8, n. 8, p. 1–9, 2013.

ASANGANI, Irfan A *et al.* Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget*, v. 3, n. 9, p. 1011–25, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3663613&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

BACHMAN, Kurtis E *et al.* The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer biology & therapy*, v. 3, n. 8, p. 772–775, 2004.

BALAKRISHNAN, Ilango *et al.* Genome-Wide Analysis of miRNA-mRNA Interactions in Marrow Stromal Cells. *STEM CELLS*, v. 32, n. 3, p. 662–673, mar. 2014. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/stem.1531>>.

BARTEL, David P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*, v. 116, n. 2, p. 281–297, 2004.

BENJAMINI, Yoav; HOCHBERG, Yosef. *Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society B.* [S.l.: s.n.]. Disponível em: <[http://www.stat.purdue.edu/~doerge/BIOINFORM.D/FALL06/Benjamini and Y FDR.pdf](http://www.stat.purdue.edu/~doerge/BIOINFORM.D/FALL06/Benjamini%20and%20Y%20FDR.pdf)> <[http://engr.case.edu/ray\\_soumya/mlrg/controlling\\_fdr\\_benjamini95.pdf](http://engr.case.edu/ray_soumya/mlrg/controlling_fdr_benjamini95.pdf)>. , 1995

BHINGE, Akshay *et al.* MiR-135b is a direct PAX6 target and specifies human neuroectoderm by inhibiting TGF- $\beta$ /BMP signaling. *EMBO Journal*, v. 33, n. 11, p. 1271–1283, 2014.

BHUSHAN, Raghu *et al.* MiR-181a promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- $\beta$  signaling molecules. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 45, n. 3, p. 696–705, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biocel.2012.12.008>>.

BRAGAZZI, Nicola Luigi; SIVOZHELEZOV, Victor; NICOLINI, Claudio. LeaderGene : A Fast Data-mining Tool for Molecular Genomics. v. 4, n. 4, p. 83–86, 2011.

BRANNON, Robert B; FOWLER, Craig B. Benign Fibro-Osseous Lesions : A Review of

Current Concepts. v. 8, n. 3, p. 126–143, 2001.

BRAZIER, Hélène *et al.* Expression profile of RhoGTPases and RhoGEFs during RANKL-stimulated osteoclastogenesis: identification of essential genes in osteoclasts. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research*, v. 21, n. 9, p. 1387–1398, 2006.

BRAZIER, Hélène *et al.* The Rho GTPase Wrch1 regulates osteoclast precursor adhesion and migration. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, v. 41, n. 6, p. 1391–1401, 2009.

BROWN, Noah A. *et al.* Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clinical Cancer Research*, v. 20, n. 21, p. 5517–5526, 2014.

CHAI, Jiwei; XU, Shijie; GUO, Fengbo. TEAD1 mediates the oncogenic activities of Hippo-YAP1 signaling in osteosarcoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, p. 2–7, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X17308914>>.

CHANG, Chia Chuan *et al.* Central ossifying fibroma: A clinicopathologic study of 28 cases. *Journal of the Formosan Medical Association*, v. 107, n. 4, p. 288–294, 2008.

CHEN, J. D. *et al.* Hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. *Journal of Internal Medicine*, v. 253, n. 6, p. 634–642, 2003.

CHEN, Jianquan *et al.* Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Developmental Biology*, v. 334, n. 1, p. 174–185, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2009.07.015>>.

CHEN, Yan *et al.* CDC73 gene mutations in sporadic ossifying fibroma of the jaws. *Diagnostic Pathology*, v. 11, n. 1, p. 91, 2016. Disponível em: <<http://diagnosticpathology.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13000-016-0532-0>>.

CHEN, Yang *et al.* Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via PI3K/AKT/GSK3 / -catenin pathway. *Cell Biology International*, v. 9999, p. 1–11, 2017. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1002/cbin.10779>>.

CHOU, Chih Hung *et al.* miRTarBase 2016: Updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Research*, v. 44, n. D1, p. D239–D247, 2016.

CHOY, Edwin *et al.* High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes. *Cancer*, v. 118, n. 11, p. 2905–2914, 2012.



COVANI, Ugo *et al.* Bioinformatic prediction of leader genes in human periodontitis. *The Journal of periodontology*, v. 79, n. 10, p. 1974–1983, 2008.

DE MESQUITA NETTO, Ana Carolina *et al.* 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. 359–67, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23453027>>.

DEAN, M *et al.* The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature*, v. 318, n. 6044, p. 385–388, 1985. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/4069211>>.

DEVERAUX, Q L *et al.* X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*, v. 388, n. 6639, p. 300–304, 1997.

DINIZ, Marina Gonçalves *et al.* MiR-15a/16-1 influences BCL2 expression in keratocystic odontogenic tumors. *Cellular Oncology*, v. 35, n. 4, p. 285–291, 2012.

DU, Xiaoling *et al.* The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma. *BMC cancer*, v. 14, n. 1, p. 450, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4074405&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

DUTRA, Sabrina Nogueira *et al.* Immunoexpression of Wnt/??-catenin signaling pathway proteins in ameloblastoma and calcifying cystic odontogenic tumor. *Journal of Clinical and Experimental Dentistry*, v. 9, n. 1, p. e136–e140, 2017.

EL-MOFTY, Samir. Psammomatoid and trabecular juvenile ossifying fibroma of the craniofacial skeleton: Two distinct clinicopathologic entities. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics*, v. 93, n. 3, p. 296–304, 2002.

ELBASHIR, S M *et al.* RNA interference is mediated 1- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.*, v. 15, p. 188–200, 2001.

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.

FINCH, P W *et al.* Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 94, n. 13, p. 6770–5, 1997. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9192640>%5Cnhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC21233>.

FRANZÉN, Petra *et al.* Cloning of a TGF $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF $\beta$  type II receptor. *Cell*, v. 75, n. 4, p. 681–692, 1993.

GAO, Y *et al.* CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma. *Scientific reports*, v. 5, n. January, p. 11365, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep11365>>.

GBDUPS, Joijcupsz *et al.* Tjmfodfe Jo lvnbo Ptufptbsdpm Boe Ptufptbsdpmhfoftjt Jo Njdf. v. 119, n. 4, p. 837–851, 2009.

GIACOMELLI, Luca; NICOLINI, Claudio. Gene expression of human T lymphocytes cell cycle: Experimental and bioinformatic analysis. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 99, n. 5, p. 1326–1333, 2006.

GILLETT, C E; BARNES, D M. Cell cycle. *Mol Pathol.*, v. 51, n. 6, p. 310–6, 1998.

GLINKA, A *et al.* Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature*, v. 391, n. 6665, p. 357–362, 1998. Disponível em: <<http://www.nature.com/nature/journal/v391/n6665/pdf/391357a0.pdf>>.

GONZALEZ, Ana Z. *et al.* Novel Inhibitors of the MDM2-p53 Interaction Featuring Hydrogen Bond Acceptors as Carboxylic Acid Isosteres. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 57, n. 7, p. 2963–2988, 2014. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jm401911v>>.

GRANCHI, D *et al.* Gene Expression Patterns Related to Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells During Ex Vivo Expansion. *Tissue engineering. Part C*, v. 16, n. 3, p. 511–524, 2010. Disponível em: <<http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/ten.TEC.2009.0405>>.

GRAY, Mary J. *et al.* Mutations Preventing Regulated Exon Skipping in MET Cause Osteofibrous Dysplasia. *American Journal of Human Genetics*, v. 97, n. 6, p. 837–847, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2015.11.001>>.

GUAN, H *et al.* FOXO1 inhibits osteosarcoma oncogenesis via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway suppression. *Oncogenesis*, v. 4, n. 9, p. e166, 2015. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/abs/10.1038/oncsis.2015.25>>.

GUIMARÃES, Douglas Magno *et al.* Immunohistochemical expression of WNT5A and MMPs in odontogenic epithelial tumors and cysts. *Acta Histochemica*, v. 117, n. 8, p. 667–674, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2015.10.006>>.

HAMEETMAN, Liesbeth *et al.* The role of EXT1 in nonhereditary osteochondroma: Identification of homozygous deletions. *Journal of the National Cancer Institute*, v. 99, n. 5, p.

396–406, 2007.

HARAGUCHI, Ryuma *et al.* sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. *Scientific reports*, v. 6, n. April, p. 25198, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27117872>>.

HARTWELL, L.; KASTAN, M. Cell cycle control and cancer. *Science*, v. 266, n. 5192, p. 1821–1828, 16 dez. 1994. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.7997877>>.

HE, T. Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science*, v. 281, n. 5382, p. 1509–1512, 1998. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.281.5382.1509>>.

HERR, Patrick; HAUSMANN, George; BASLER, Konrad. WNT secretion and signalling in human disease. *Trends in Molecular Medicine*, v. 18, n. 8, p. 483–493, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.molmed.2012.06.008>>.

HORVAI, Andrew; JORDAN, Richard. Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Bones:  $\beta$ -Catenin Immunohistochemical Analysis and CTNNB1 and APC Mutation Analysis. *Head and Neck Pathology*, v. 8, n. 3, p. 291–297, 2014.

HSIEH, J C *et al.* A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature*, v. 398, n. April, p. 431–436, 1999.

HU, Weihua *et al.* MiR-142-3p promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Molecular Medicine Reports*, v. 7, n. 2, p. 689–693, 2013.

HUBER, O *et al.* Nuclear localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mechanisms of development*, v. 59, n. 1, p. 3–10, 1996.

JACKSON, C E *et al.* Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: a clinically and genetically distinct syndrome. *Surgery*, v. 108, n. 6, p. 1003–1006, 1990. Disponível em: <[http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list\\_uids=2123361](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=2123361)>.

JONES, Kevin B. *et al.* miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Research*, v. 72, n. 7, p. 1865–1877, 2012.

KARATHANASI, Vasiliki *et al.* TGF- $\beta$ 1, Smad-2/-3, Smad-1/-5/-8, and Smad-4 signaling factors are expressed in ameloblastomas, adenomatoid odontogenic tumors, and calcifying cystic odontogenic tumors: An immunohistochemical study. *Journal of Oral Pathology and Medicine*, v. 42, n. 5, p. 415–423, 2013.

KATHRIN PLATH, JIA FANG, SUSANNA K. MLYNARCZYK-EVANS, RU CAO, KATHLEEN A. WORRINGER, Hengbin Wang; CECILEC. DELA CRUZ, ARIEP. OTTE, BARBARA PANNING, Yi Zhang. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. *Science*, v. 298, n. 5616, p. 1039–1043, 2002. Disponível em: <[http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/300/5616/131%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1084274/DC1%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/content/full/300/5616/131#otherarticles%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/collection/molec\\_biol](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/300/5616/131%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/content/full/1084274/DC1%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/content/full/300/5616/131#otherarticles%5Cnhttp://www.sciencemag.org/cgi/collection/molec_biol)>.

KEREMU, Ajimu *et al.* NRSN2 promotes osteosarcoma cell proliferation and growth through PI3K / Akt / MTOR and Wnt /  $\beta$ -catenin signaling. v. 7, n. 3, p. 565–573, 2017.  
KIM, Seonhoe *et al.* MicroRNA miR-199a \* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *Journal of Biological Chemistry*, v. 283, n. 26, p. 18158–18166, 2008.

KLAUS, Alexandra; BIRCHMEIER, Walter. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nature reviews. Cancer*, v. 8, n. 5, p. 387–398, 2008.

KOMIYA, Yuko; HABAS, Raymond. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis*, v. 4, n. 2, p. 68–75, 2008.

KORHAN, Peyda; ERDAL, Esra; ATABEY, Neşe. MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 450, n. 4, p. 1304–1312, 2014.

KRAMER, I. R H; PINDBORG, J. J.; SHEAR, M. The WHO histological typing of odontogenic tumours: A commentary on the second edition. *Cancer*, v. 70, n. 12, p. 2988–2994, 1992.

LADANYI, Marc *et al.* Advances in Brief MDM2 Gene Amplification in Metastatic D12S2. *Cancer*, n. 2, p. 53–55, 1993.

LARRAGUIBEL, Jahdiel *et al.* Wnt ligand–dependent activation of the negative feedback regulator Nkd1. *Molecular Biology of the Cell*, v. 26, n. 12, p. 2375–2384, 2015. Disponível em: <<http://www.molbiolcell.org/content/26/12/2375.abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4462952/pdf/2375.pdf>>.

LEE, Rosalind C.; FEINBAUM, Rhonda L.; AMBROS, Victor. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, v. 75, n. 5, p. 843–854, 1993.

LEE, Seung Eun *et al.* The diagnostic utility of the GNAS mutation in patients with fibrous dysplasia: Meta-analysis of 168 sporadic cases. *Human Pathology*, v. 43, n. 8, p. 1234–1242, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2011.09.012>>.

LEE, Yoontae *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, v. 425, n. 6956, p. 415–419, 2003. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/nature01957>>.

LEVANON, D *et al.* Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 95, n. 20, p. 11590–11595, 1998.

LEW, Daniel J; DULIC, Vjekoslav; REED, Steven I. Isolation of Three Novel Human Cyclins by Rescue of G1 Cyclin ( Cln ) Function in Yeast. *Cell*, v. 66, n. 6, p. 1197–1206, 1991.

LI, Shaohua; LI, Fengfeng; CHENG, Tao. TGF- $\beta$ 1 promotes osteosarcoma cell migration and invasion through the miR-143-versican pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry*, v. 34, n. 6, p. 2169–2179, 2014.

LI, Vivian S W *et al.* Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell*, v. 149, n. 6, p. 1245–1256, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2012.05.002>>.

LIAN, Feng *et al.* Identification of a plasma four-microRNA panel as potential noninvasive biomarker for osteosarcoma. *PLoS ONE*, v. 10, n. 3, p. 1–12, 2015.

LIU, Liu *et al.* MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*, v. 30, n. 8, p. 1756–1770, 2012.

LIU, Na *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin pathway regulates cementogenic differentiation of adipose tissue-deprived stem cells in dental follicle cell-conditioned medium. *PLoS ONE*, v. 9, n. 5, p. 1–9, 2014.

LIU, Xiqiang *et al.* MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. *The Biochemical journal*, v. 440, n. 1, p. 23–31, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3331719&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

LIU, Yao *et al.* A germline variant N375S in MET and gastric cancer susceptibility in a Chinese population. *Journal of biomedical research*, v. 26, n. 5, p. 315–8, 2012. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3613728&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MA, Jianjun *et al.* The TAZ–miR-224–SMAD4 axis promotes tumorigenesis in osteosarcoma. *Cell Death and Disease*, v. 8, n. 1, p. e2539, 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/doifinder/10.1038/cddis.2016.468>>.

MACDONALD-JANKOWSKI, D. S. Ossifying fibroma: A systematic review. *Dentomaxillofacial Radiology*, v. 38, n. 8, p. 495–513, 2009.

MACDONALD, Bryan T.; TAMAI, Keiko; HE, Xi. Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Developmental Cell*, v. 17, n. 1, p. 9–26, 2009. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.016>>.

MACDONALD, D. S. Maxillofacial fibro-osseous lesions. *Clinical Radiology*, v. 70, n. 1, p. 25–36, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.crad.2014.06.022>>.

MAERE, Steven; HEYMANS, Karel; KUIPER, Martin. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics*, v. 21, n. 16, p. 3448–3449, 2005.

MAINVILLE, G N; TURGEON, D P; KAUZMAN, A. Diagnosis and management of benign fibro-osseous lesions of the jaws: a current review for the dental clinician. *Oral diseases*, p. 440–450, 2016. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12531>%0A<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27387498>>

MASI, Giulia *et al.* Characterization of a new CDC73 missense mutation that impairs Parafibromin expression and nucleolar localization. *PLoS one*, v. 9, n. 5, p. e97994, 2014. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4026411&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

MICLEA, Razvan L. *et al.* Apc bridges Wnt/ $\beta$ -catenin and BMP signaling during osteoblast differentiation of KS483 cells. *Experimental Cell Research*, v. 317, n. 10, p. 1411–1421, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.yexcr.2011.03.007>>.

MIKELS, Amanda J.; NUSSE, Roel. Purified Wnt5a protein activates or inhibits  $\beta$ -catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biology*, v. 4, n. 4, p. 570–582, 2006.

MINTZ, Sheldon; VELEZ, Ines. Central ossifying fibroma: an analysis of 20 cases and review of the literature. *Quintessence international (Berlin, Germany : 1985)*, v. 38, n. 3, p. 221–7, 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17333999>>.

MOREAUX, Jerome *et al.* Osteoclast-gene expression profiling reveals osteoclast-derived CCR2-chemokines promoting myeloma cell migration. v. 117, n. 4, p. 1280–1291, 2010.

MÜLLER, Claudia I. *et al.* Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leukemia Research*, v. 31, n. 1, p. 27–32, 2007.

NORD, Karolin H. *et al.* Recurrent chromosome 22 deletions in osteoblastoma affect inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *PLoS ONE*, v. 8, n. 11, p. 1–7, 2013.

OJO, M. A. *et al.* A clinico-pathologic review of 56 cases of ossifying fibroma of the jaws with emphasis on the histomorphologic variations. *Nigerian Journal of Clinical Practice*, v. 17, n. 5, p. 619–623, 2014.

OLINER, J. D. *et al.* Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcomas. *Nature*. [S.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://www.nature.com/doi/10.1038/358080a0>>. , 1992

ORLANDO, B.; BRAGAZZI, N.; NICOLINI, C. Bioinformatics and systems biology analysis of genes network involved in OLP (Oral Lichen Planus) pathogenesis. *Archives of Oral Biology*, v. 58, n. 6, p. 664–673, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.archoralbio.2012.12.002>>.

ORNITZ, David M.; ITOH, Nobuyuki. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Developmental Biology*, v. 4, n. 3, p. 215–266, 2015.

PAI, Priya *et al.* Mucins and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastrointestinal cancers: An unholy nexus. *Carcinogenesis*, v. 37, n. 3, p. 223–232, 2015.

PATEL, Milan M. *et al.* Analysis of GNAS mutations in cemento-ossifying fibromas and cemento-osseous dysplasias of the jaws. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, v. 109, n. 5, p. 739–743, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2009.12.016>>.

PAULIS, Yvette W J *et al.* CD44 enhances tumor aggressiveness by promoting tumor cell plasticity. *Oncotarget*, v. 6, n. 23, p. 19634–46, 2015. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4637310&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

PILLAI, Manoj M. *et al.* HITS-CLIP reveals key regulators of nuclear receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment*, v. 146, n. 1, p. 85–97, 2014.

PIMENTA, Flávio Juliano *et al.* HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. *Oral Oncology*, v. 42, n. 7, p. 735–739, 2006.

POSWAR, Fabiano de Oliveira *et al.* An adaptation of particle swarm clustering applied in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma of the skin and actinic keratosis. *Meta Gene*, v. 12, p. 72–77, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2214540017300087>>.

POSWAR, Fabiano De Oliveira *et al.* Bioinformatics, Interaction Network Analysis, and Neural Networks to Characterize Gene Expression of Radicular Cyst and Periapical Granuloma. *Journal of endodontics*, v. 41, n. 6, p. 877–883, 2015. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25873079>>.

QI, Huilin *et al.* Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 100, n. 6, p. 3305–3310, 2003. Disponível em: <<http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0532693100%5Cnpapers3://publication/doi/10.1073/pnas.0532693100>>.

QIU, Shuwei *et al.* Suppression of tumorigenicity by MicroRNA-138 through inhibition of EZH2-CDK4/6-pRb-E2F1 signal loop in glioblastoma multiforme. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease*, v. 1832, n. 10, p. 1697–1707, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2013.05.015>>.

QIU, Wanglong *et al.* PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical Cancer Research*, v. 12, n. 5, p. 1441–1446, 2006.

RAJESHKUMAR, B P *et al.* Carnoy's in aggressive lesions: Our experience. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, v. 12, n. 1, p. 42–7, 2013.

RAJPAL, Karan *et al.* Updated Classification Schemes for Fibro-Osseous Lesions of the Oral & Maxillofacial Region: A Review. *IOSR Journal of Dental and Medical Sciences Ver. IV*, v. 13, n. 2, p. 2279–861, 2014. Disponível em: <[www.iosrjournals.org](http://www.iosrjournals.org)>.

REGARD, Jean B *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is differentially regulated by G $\alpha$  proteins and contributes to fibrous dysplasia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 50, p. 20101–6, 2011. Disponível em: <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3250124&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>>.

SAKAMOTO, Akio *et al.* A Comparative Study of Fibrous Dysplasia and Osteofibrous Dysplasia with Regard to G S  $\alpha$  Mutation at the Arg 201 Codon: Polymerase Chain Reaction-Restriction Fragment Length Polymorphism Analysis of Paraffin-Embedded Tissues. *The Journal of Molecular Diagnostics*, v. 2, n. 2, p. 67–72, 2000.

SAVITHRI, Vindhya *et al.* Desmoplastic ameloblastoma with osteoplasia: Review of literature with a case report. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*, v. 17, n. 2, p. 298–301, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24342734>>.

SHANNON, P *et al.* Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Research*, v. 13, n. 11, p. 2498–504, 2003.

SHERR, C J; ROBERTS, J M. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development*, v. 13, n. 12, p. 1501–1512, 1999.



SHMULY, T. *et al.* Can Differences in Vascularity Serve as a Diagnostic Aid in Fibro-Osseous Lesions of the Jaws? *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, p. 1–8, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2016.11.017>>.

SHUSTERMAN, Kate *et al.* Wnt-rhoa signaling pathways in fluoride-treated ameloblast-lineage cells. *Cells Tissues Organs*, v. 199, p. 159–168, 2014.

SLOOTWEG, Pieter J.; EL-MOFTY, Samir K. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. In: BARNES, LEON *et al.* (Org.). *WHO Classification of Tumour*. Lyon: IARC Press, 2005. p. 319–320.

SONG, Lige *et al.* Loss of wnt/??-catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes. *Journal of Bone and Mineral Research*, v. 27, n. 11, p. 2344–2358, 2012.

SONG, Ruipeng *et al.* P53 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of osteosarcoma through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *International Journal of Surgery*, v. 20, p. 80–87, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijso.2015.04.050>>.

SPEIGHT, Paul; CARLOS, Roman. Maxillofacial fibro-osseous lesions. *Current Diagnostic Pathology*, v. 12, n. 1, p. 1–10, 2006.

SRINIVASULA, Sm *et al.* A conserved XIAP-interaction motif in caspase-9 and Smac/DIABLO regulates caspase activity and apoptosis. *Nature*, v. 410, n. 6824, p. 112–116, 2001.

STÖRKEL, Stephan; WAGNER, Wilfried; MAKEK, Miro S. Viw \_ kows AMIh , A Psammous desmo-osteoblastoma. p. 561–568, 1987.

SU, Lan; WEATHERS, Dwight R; WALDRON, Charles A. ORAL AND MAXILLOFACIAL PATHOLOGY Distinguishing features of focal cemento-osseous dysplasias and cemento-ossifying fibromas. v. 84, n. 3, p. 301–309, 1997.

SU, L; WEATHERS, D R; WALDRON, C 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, 1997.

SUMMERLIN, Don John; TOMICH, Charles E. Focal cemento-osseous dysplasia: A clinicopathologic study of 221 cases. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology*, v. 78, n. 5, p. 611–620, 1994.

SUN, Xuewu *et al.* TGF-beta Inhibits Osteogenesis by Upregulating the Expression of Ubiquitin Ligase SMURF1 via MAPK-ERK Signaling. *Journal of cellular physiology*, n. March, 2017.

TABAREAU-DELALANDE, F *et al.* 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 : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, n. October 2013, p. 48–56, 2014.

TABAREAU-DELALANDE, Flore *et al.* 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 : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, v. 26, n. 7, p. 911–21, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23370769>>.

TAMURA, Masato *et al.* Canonical Wnt signaling activates miR-34 expression during osteoblastic differentiation. *Molecular Medicine Reports*, v. 8, n. 6, p. 1807–1811, 2013.

THORVALDSDÓTTIR, Helga; ROBINSON, James T.; MESIROV, Jill P. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Briefings in Bioinformatics*, v. 14, n. 2, p. 178–192, 2013.

TITINCHI, Fadi; MORTEL, Jean. Ossifying Fibroma: Analysis of Treatment Methods and Recurrence PTitinchi, F., & Morkel, J. (2016). Ossifying Fibroma: Analysis of Treatment Methods and Recurrence Patterns. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 74(12), 2409–2419. <https://doi.org/10.1016/j.ajom.2016.08.003>. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 74, n. 12, p. 2409–2419, 2016.

TONG, Zhixiang *et al.* Controlling the Fibroblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via the Combination of Fibrous Scaffolds and Connective Tissue Growth Factor. *Tissue Engineering Part A*, v. 17, p. 2773–2785, 2011.

URS, Aadithya B. *et al.* Clinicopathologic and radiologic correlation of ossifying fibroma and juvenile ossifying fibroma - An institutional study of 22 cases. *Annals of Diagnostic Pathology*, v. 17, n. 2, p. 198–203, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.anndiagpath.2012.06.003>>.

VANDESOMPELE, Jo *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology*, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12184808>> <<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC126239>>.

VLACHOS, Ioannis S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Research*, v. 43, n. W1, p. W460–W466, 2015.

WALDRON, C A. Fibro-osseous lesions of the jaws. *Journal of oral and maxillofacial*

surgery : *official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, v. 51, n. 8, p. 828–835, 1993. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=med3&NEWS=N&AN=8336219>>.

WALDRON, Charles A. Fibro-osseous lesions of the jaws. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 43, n. 4, p. 249–262, 1985. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0278-2391\(10\)80097-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0278-2391(10)80097-7)>.

WANG, Jin *et al.* MicroRNA-520b Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of Spinal Osteosarcoma Cells Via Downregulation of Frizzled-8. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, n. 1677, 2017. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/10.3727/096504017X14873430389189>>.

WANG, T; XU, Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 402, n. 2, p. 186–189, 2010. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20708603>>.

WANG, Yu; ZHOU, Yanmin; GRAVES, Dana T. FOXO transcription factors: Their clinical significance and regulation. *BioMed Research International*, v. 2014, n. Figure 1, 2014.

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.

YANG, Zuozhang *et al.* Meta-analysis of differentially expressed genes in osteosarcoma based on gene expression data. *BMC Medical Genetics*, v. 15, n. 1, p. 80, 2014. Disponível em: <<http://bmcmmedgenet.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2350-15-80>>.

YI, Rui *et al.* Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs*. p. 3011–3016, 2003.

ZHANG, Chun *et al.* Parafibromin inhibits cancer cell growth and causes G1 phase arrest. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, v. 350, n. 1, p. 17–24, 2006.

ZHANG, Huijun *et al.* MiR-138 inhibits tumor growth through repression of EZH2 in non-small cell lung cancer. *Cellular physiology and biochemistry : international journal of experimental cellular physiology, biochemistry, and pharmacology*, v. 31, n. 1, p. 56–65, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23343715>>.

ZHANG, Tong-han *et al.* Detection of Notch signaling molecules in cemento- ossifying fibroma of the jaws. *J Oral Pathol Med*, v. 39, p. 263–268, 2010.

ZHANG, Xiuqin *et al.* Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. *Journal of Biological Chemistry*, v. 281, n. 23, p. 15694–15700,

2006.

ZHOU, Guangxin *et al.* Identification of miR-199a-5p in serum as noninvasive biomarkers for detecting and monitoring osteosarcoma. *Tumor Biology*, v. 36, n. 11, p. 8845–8852, 2015.

ZHOU, Lu *et al.* The overexpression of BAMBI and its involvement in the growth and invasion of human osteosarcoma cells. *Oncology Reports*, v. 30, n. 3, p. 1315–1322, 2013.

ZHOU, Ri *et al.* Calcitonin gene-related peptide promotes the expression of osteoblastic genes and activates the WNT signal transduction pathway in bone marrow stromal stem cells. *Molecular Medicine Reports*, v. 13, n. 6, p. 4689–4696, 2016.

ZHU, Dan Xia *et al.* MiR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*, v. 33, n. 7, p. 1294–1301, 2012.

ZHU, Wei *et al.* miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, v. 69, n. 3, p. 723–731, 2012.

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

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

**Projeto: CAAE – 44483515.0.0000.5149**

**Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez**  
**Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia**  
**Faculdade de Odontologia- UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 08 de junho de 2015, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise molecular das lesões fibro-ósseas benignas**" bem como:

- Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
- Termo de Assentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

A handwritten signature in blue ink, reading 'Telma Campos Medeiros Lorentz', is written over a faint circular stamp.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG

## APÊNDICE A - Artigo

MicroRNA profiling reveals dysregulated microRNAs and their target gene regulatory networks in cemento-ossifying fibroma

**Running title: MicroRNAs and cemento-ossifying fibroma**

**Keywords:** Ossifying fibroma; Bone Neoplasms; Odontogenic tumour; Gene Expression; microRNA

Thaís dos Santos Fontes Pereira <sup>a</sup>

João Artur Ricieri Brito <sup>a</sup>

André Luiz Sena Guimarães <sup>b</sup>

Carolina Cavaliéri Gomes <sup>c</sup>

Júlio Cesar Tanos de Lacerda <sup>d</sup>

Wagner Henriques de Castro <sup>a</sup>

Roney Santos Coimbra <sup>e</sup>

Marina Gonçalves Diniz <sup>a</sup>

Ricardo Santiago Gomez <sup>a</sup>

<sup>a</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; <sup>b</sup> Department of Dentistry, Universidade Estadual de Montes Claros (UNIMONTES), Montes Claros, Brazil; <sup>c</sup> Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; <sup>d</sup> Stomatology service, Odilon Behrens Hospital Belo Horizonte, Brazil; <sup>e</sup> Centro de Pesquisas René Rachou (CPqRR), FIOCRUZ, Belo Horizonte, Brazil

Corresponding Author: Prof. Ricardo Santiago Gomez, Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia, Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil – E-mail: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br)

## ABSTRACT

**Background:** Cemento-ossifying fibroma (COF) is a benign fibro-osseous neoplasm of uncertain pathogenesis and its treatment results morbidity. MicroRNAs (miRNA) are small non-coding RNAs that regulate gene expression and may represent therapeutic targets. The purpose of the study was to generate a comprehensive miRNA profile of COF compared to normal bone. Additionally, the most relevant pathways and target genes of differentially expressed miRNA were investigated by *in silico* analysis.

**Methods:** Nine COF and ten normal bone samples were included in the study. miRNA profiling was carried out by using *TaqMan® OpenArray® Human MicroRNA* panel containing 754 validated human miRNAs. We identified the most relevant miRNAs target genes through the leader gene approach, using STRING and Cytoscape software. Pathways enrichment analysis was performed using DIANA-miRPath.

**Results:** Eleven miRNAs were downregulated (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, hsa-miR-200c-3p) and five were upregulated (hsa-miR-181a-5p, hsa-miR-181c-5p, hsa-miR-149-5p, hsa-miR-138-5p, hsa-miR-199a-3p) in COF compared to normal bone. Eighteen common target genes were predicted, and the leader genes approach identified the following genes involved in human COF: *EZH2*, *XIAP*, *MET* and *TGFBR1*. According to the biology of bone and COF, the most relevant Kegg-pathways revealed by enrichment analysis were Proteoglycans in cancer, miRNAs in cancer, Pathways in cancer, p53, PI3K-Akt, FoxO, and TGF-beta signalling pathways, which were previously found to be differentially regulated in bone neoplasms, odontogenic tumours and osteogenesis.

**Conclusion:** miRNA dysregulation occurs in COF and *EZH2*, *XIAP*, *MET* and *TGFBR1* are potential targets for functional analysis validation.

## INTRODUCTION

Cemento-ossifying fibroma (COF) is a benign fibro-osseous well-delimited neoplasm, consisting of mineralized deposits, permeated by fibrocellular tissue <sup>1</sup>. Clinically, COF presents as an expansive and often painless enlargement, which mainly affects the posterior region of the jaw, occasionally causing tooth displacement <sup>2,3</sup>. The diagnosis of a benign fibro-osseous lesion requires the evaluation of clinical, radiographic, histopathological and trans-operative findings, such as the relation of the lesion to healthy surrounding bone <sup>4</sup>. Conservative surgery is the first choice of treatment and, as the tumour may reach large dimensions, morbidity is often experienced after excision <sup>3</sup>. The recurrence rate can vary from 12 to 28% <sup>5,6</sup>.

Regarding the molecular characterization of COF pathogenesis, there are few elucidative studies. Mutations in the *CDC73* (*HRPT2*) tumour suppressor gene have been described in the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome-HPTJT <sup>7</sup>, and about 40% of HPTJT individuals develop COF in the jaws <sup>8</sup>. Missense mutations in *CDC73* were also reported in sporadic COF <sup>9</sup>, but it does not seem to have a central role in COF pathogenesis <sup>10</sup>. Genetic alterations in *CTNNB1* and *APC* were identified by Horvai & Jordan (2014) in two cases of conventional COF <sup>11</sup>. However, there is no evidence of the role of these variants in the pathogenesis of the lesion. Since genomic alterations have not yet been described as driver events to COF development, the search for epigenetic mechanisms may shed light on COF pathogenesis.

miRNAs are small non-coding RNA molecules that regulate gene expression post-transcriptionally by binding to the 3' UTR of target mRNAs <sup>12</sup>. They have been the subject of studies that aimed at the identification of potential biomarkers and prognostic indicators of bone neoplasms. For example, metastatic osteosarcoma shows up-regulation of miR-27a and miR-181c <sup>13</sup>. Also, overexpression of miR-199a-5p was reported in plasma from patients with osteosarcoma compared to controls <sup>14</sup>. miRNAs are also important modulators in cell



differentiation process. Increased expression of miR-142-3p<sup>15</sup>, miR-27<sup>16</sup> and miR-26a was found during osteoblastic differentiation. Regulation by miRNAs has been described as an important mechanism in the pathogenesis of several disorders and, as their function can be manipulated through antisense oligonucleotides, they represent a potential therapeutic tool<sup>17</sup>. To date, miRNAs expression profile in benign fibro-osseous lesions such as COF is unknown. The purpose of this study was to compare 754 miRNAs expression in conventional COF with normal bone and investigate the most relevant potential pathways and target genes of dysregulated miRNA through bioinformatics tools.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *SAMPLES AND PATIENTS*

The ethics committee of Universidade Federal de Minas Gerais approved the study (protocol number 44483515.0.0000.5149), and all participants signed a written informed consent. Fresh tissue samples were collected at the Clinics of Oral Diagnosis of the School of Dentistry during the biopsy procedure. The material was placed in RNeasy Lysis Solution (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) and stored at -80°C. An additional fragment was fixed in 10% buffered formalin, processed and embedded in paraffin for histopathological evaluation. COF diagnosis was performed by combining clinical, radiographic, transoperative and histopathological data<sup>18</sup>. All the COF cases presented well-defined clinical-radiographic features and showed one or few large intact specimens after resection, which is in contrast to the multiple fragments usually detected in cemento-osseous dysplasia<sup>19</sup>.

The control group consisted of healthy individuals with an indication for third molar removal or orthognathic surgery, with no bone disorders or clinical signs of inflammation. Fragments of healthy bone removed during osteotomy procedures were collected and stored for miRNA analysis as described above. Individuals using drugs that interfere with bone metabolism, such as bisphosphonates, at any stage of life were excluded.

### *RNA ISOLATION*

Total RNA was isolated using the mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Vilnius, Lithuania) according to the manufacturer's recommendations. The RNA sample was quantified using Nanodrop 2000 (Wilmington, DE, USA) and analysed using a chip-based capillary electrophoresis machine, Bioanalyzer Agilent 2100, with the Agilent RNA 6000 Nano Kit (Waldbronn, Germany). The accepted quality parameters for starting material was RNA with an A260/A280 ratio  $\geq 1.8$  and an RNA Integrity Number (RIN) between 6.5 and 10<sup>20</sup>.

### *miRNA EXPRESSION PROFILE*

The TaqMan® OpenArray® Human microRNA panel (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA) was used to evaluate the expression of 754 miRNAs in COF (n=9) compared to normal bone samples (n=10). Real-time PCR reactions were conducted on the QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Foster city, CA, USA).

cDNA were confectioned with Megaplex™ Primer Pools A and B and MicroRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) according to the manufacturer's protocol. cDNA was amplified before the real-time PCR reaction by using the primer pools Megaplex™ PreAmp Pools A and B and the TaqMan® PreAmp Master Mix solution (Applied Biosystems). The amplified cDNA was added to the TaqMan® OpenArray® Real-Time PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and distributed on the 384 well plate. Then the plate containing the TaqMan® OpenArray® Human microRNA panel (Applied Biosystems) was loaded automatically through the AccuFill™ system (Applied Biosystems). PCR was run on the QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

The volcano plot analysis was conducted in the Applied Biosystems® analysis software, v. 1.0 and global normalisation was applied. Statistical significance was established at  $P \leq 0.05$  (student t-test), adopting the correction of Benjamini and Hochberg for false positive findings<sup>21</sup> and minimal fold change threshold was defined as 2.

### *BIOINFORMATICS AND INTERACTION NETWORK ANALYSIS*

Most relevant target genes of miRNAs with altered expression in COF were investigated by in silico analysis, using bioinformatics tools. The bioinformatics analysis was described previously as the leader gene approach <sup>22</sup>. We searched in miRTarBase <sup>23</sup> and TargetScan, release 7.1 <sup>24</sup>, to determine the primary set of target genes of the differently expressed miRNAs in COF. The inclusion criterion for targets from TargetScan, release 7.1 was total context ++ score  $\geq 1.0$ . Also, genes that presented Functional miRNA-target interactions (MTI) according to miRTarBase were selected. From this set of target genes, we considered only those common targets of both up and down regulated miRNA to the network analysis. The STRING software (<https://string-db.org/>) was used to score each interaction and build the interaction map. The weighted score number of links (WNL) and Total Interaction Score (TIS) was used to cluster and determine the leader genes which have the highest rank as described before <sup>25</sup>. Cytoscape open source software platform (<http://www.cytoscape.org/>) <sup>26</sup> was used for the topological analysis. The study was complemented by the ontologic analysis, carried out using Biological Networks Gene Ontology tool (BiNGO). This open-source Java tool was used to determine which Gene Ontology (GO) terms were significantly overrepresented in the target genes set <sup>27</sup>. Two independent methods evaluated the network. First, only significant p values of protein-protein interaction (PPI) enrichment were considered to guarantee that the nodes are not random and that the observed number of edges is significant. The second network parameter analyzed was the power law behavior. We considered only R squared and correlation values higher than 0.7.

Pathways enrichment analysis was performed using DIANA-miRPath v3.0 web-server <sup>28</sup>. All significant differently expressed miRNAs were simultaneously uploaded to the platform and analysed. Experimentally validated miRNA interactions derived from DIANA-TarBase were submitted to Fisher's exact test (Hypergeometric distribution), adopting false discovery rate (FDR) correction <sup>21</sup> and *P*-value threshold of 0.05. The result merging algorithm used was pathways union. The resulting target genes were presented as KEGG pathway maps

(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) <sup>29</sup>. The target genes found in relevant pathways were assessed according to their gene function annotation and association to COF biology, osteoblast, osteoclast and fibroblast cell biology, according to previously published experimental studies.

## RESULTS

All tumours were located in the mandible, and the posterior region was the most common site (78%). Specimens for the control group were obtained from the alveolar bone related to impacted third molars and in osteotomy during orthognathic surgery. Six samples were from mandible and four from maxilla. The median age in the control group was 24 (varied from 18 to 59) year-old, and it contained six female and four male individuals. The median age in the COF group was 31 (from 24 to 58) years, and it included one male and eight female individuals.

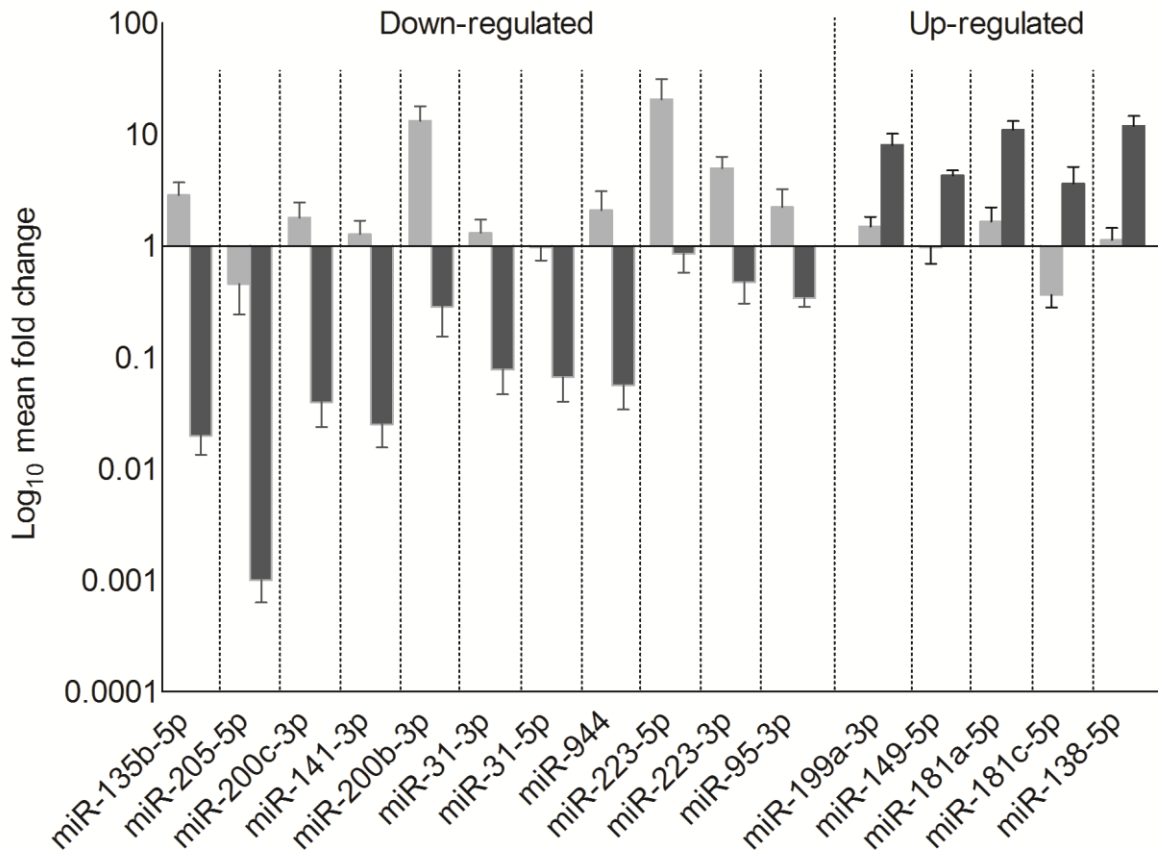
### *miRNA EXPRESSION PROFILE*

To assess the differentially expressed miRNA in COF, we compared the expression levels of 754 miRNAs in nine COF samples and ten normal bone specimens. Among the sixteen significantly differentially expressed miRNAs, five were found to be upregulated, and eleven were downregulated ( $P < 0.05$ ) in COF compared to normal bone (Table 1). Figure 1 shows the relative quantification of each differentially expressed miRNAs in COF and control groups.

**Table 1:** Top miRNAs significantly dysregulated in COF, considering the normal bone samples as reference biological group.

Target	Assay Target Sequence	Log <sub>10</sub> Fold Change	Corrected P-Value*	Regulation
hsa-miR-135b-5p	UAUGGCUUUUCAUCCUAUGUGA	-2.15	0.037	Downregulated
hsa-miR-205-5p	UCCUUCAUUCACCGGAGUCUG	-2.15	0.015	Downregulated
hsa-miR-200c-3p	UAAUACUGCCGGGUAUGAUGGA	-1.80	0.015	Downregulated
hsa-miR-141-3p	UACACUGUCUGGUAAGAUGG	-1.68	0.015	Downregulated
hsa-miR-200b-3p	UAAUACUGCCUGGUAUGAUGA	-1.64	0.027	Downregulated
hsa-miR-31-3p	UGCUAUGCCAACAUAUUGCCAU	-1.38	0.024	Downregulated
hsa-miR-31-5p	AGGCAAGAUGCUGGCAUAGCU	-1.36	0.015	Downregulated
hsa-miR-944	AAAUUAUUGUACAUCGGAUGAG	-1.29	0.037	Downregulated
hsa-miR-223-5p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	-1.07	0.037	Downregulated
hsa-miR-223-3p	UGUCAGUUUGUCAAAUACCCCA	-0.94	0.028	Downregulated
hsa-miR-95-3p	UUCAACGGGUUUUAUUGAGCA	-0.64	0.039	Downregulated
hsa-miR-199a-3p	ACAGUAGUCUGCACAUUGGUUA	0.72	0.037	Upregulated
hsa-miR-149-5p	UCUGGCUCGUGUCUUCACUCCC	0.79	0.015	Upregulated
hsa-miR-181a-5p	AACAUUCAACGCUGUCGGUGAGU	0.90	0.015	Upregulated
hsa-miR-181c-5p	AACAUUCAACCUGUCGGUGAGU	0.93	0.015	Upregulated
hsa-miR-138-5p	AGCUGGUGUUGUGAAUCAGGCCG	1.01	0.015	Upregulated

\*P-value with Benjamini-Hochberg correction

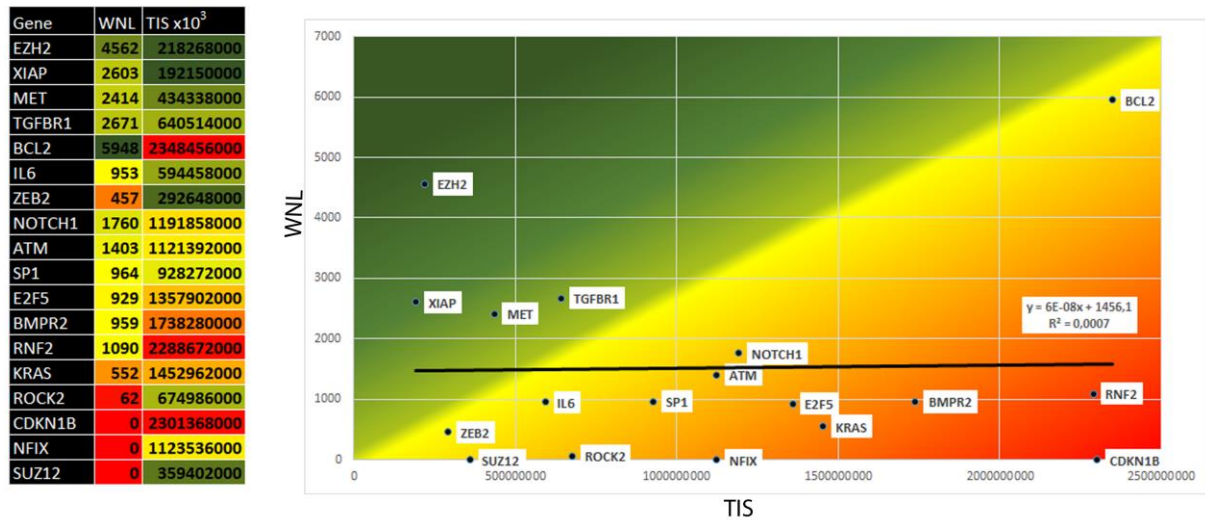


**Figure 1:** MiRNA expression plot showing differentially expressed miRNAs in COF. Mean fold change (logarithmic scale) of differentially expressed miRNAs in COF and healthy bone samples, considering a healthy bone sample as reference. Error bars represent standard error of the mean expression level calculated from nine COF and ten samples of the control group. Gray columns: controls; Black columns: COF.

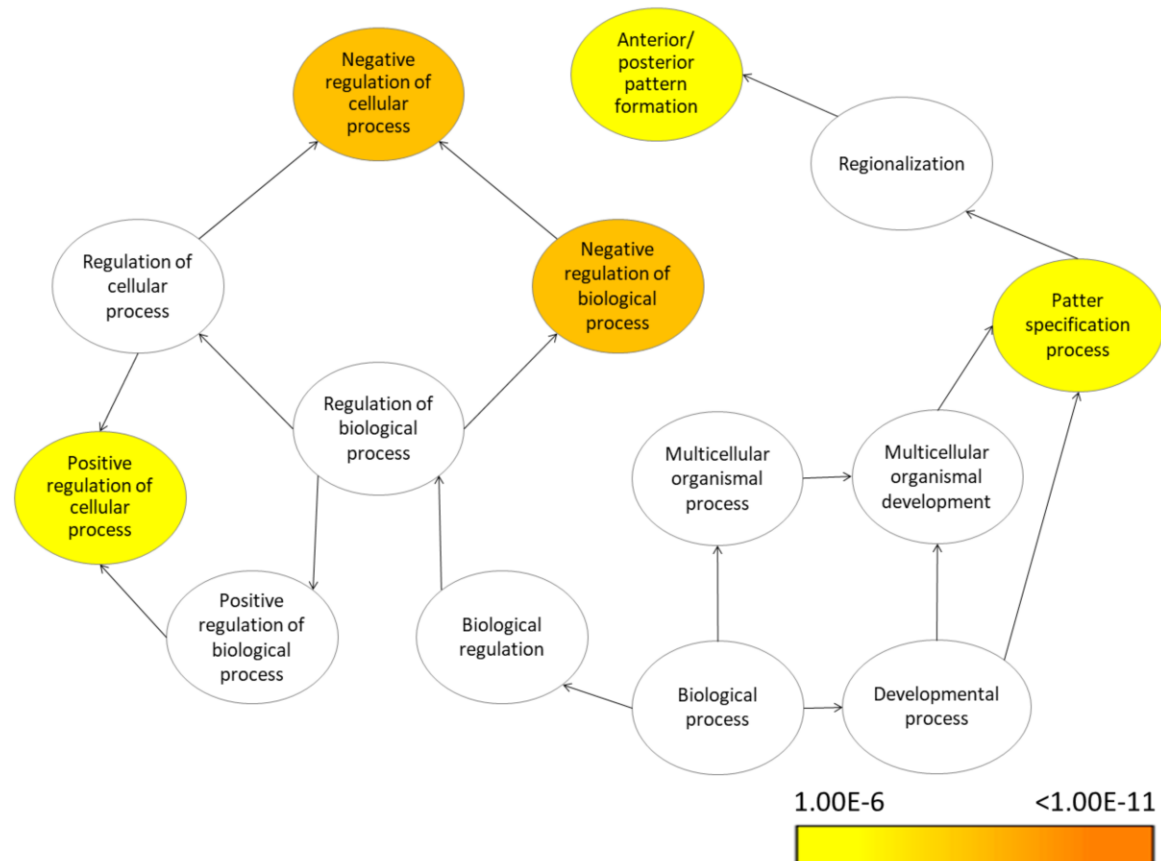
### BIOINFORMATICS AND INTERACTION NETWORK ANALYSIS

The search for targets of the miRNAs differently expressed in COF resulted in 322 genes related to the downregulated miRNA group and 197 related to the upregulated group. The network analysis showed that those proteins had more interactions among themselves than expected for a random set of proteins, indicating a potential biological connection. Considering only the genes simultaneously predicted as targets of the up and down regulated miRNA groups, 18 genes were selected. The network exhibits a power law behavior (correlation = 0.946, R<sup>2</sup> = 0.862) in agreement with the scale-free topology theory of bionetwork<sup>22</sup>. Four genes were classified as leaders (Figure 2): Enhancer of zeste 2

polycomb repressive complex 2 subunit (*EZH2*), X-linked inhibitor of apoptosis protein (*XIAP*), *MET* proto-oncogene, receptor tyrosine kinase (*MET*) and Transforming Growth Factor Beta Receptor 1 (*TGFBR1*). An ontological analysis showed different mechanisms associated with them (Supplementary Figure S1).



**Figure 2:** Bioinformatics analysis showing heat map and plot of disease-related connectivity (WNL, weighted number of links) versus global connectivity (TIS, Total Interactions Score). Y and X axis represent WNL and TIS values, respectively. *EZH2*, *XIAP*, *MET* and *TGFBR1* were considered leader genes because they are in the cluster with the highest WNL/TIS ratio and above the linear trend line. The variation of the colour scale from red to green represents the increasing values of the WNL/TIS ratio.



**Supplementary Figure S1:** Ontological analysis for COF network, showing the map of predominant functional themes of the target genes set of differently expressed miRNAs in COF. Statistically overrepresented GO categories are represented by yellow to orange nodes ( $P \leq 1.00E-6$ , Benjamini-Hochberg correction, hypergeometric clustering).

Significant KEGG pathways in our analysis were presented in Figure 3. The most relevant and highly enriched pathways included: MicroRNAs in cancer (hsa05206); Proteoglycans in cancer (hsa05205); Pathways in cancer (hsa05200); Hippo signaling pathway (hsa04390); FoxO signaling pathway (hsa04068); p53 signaling pathway (hsa04115); PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151) and TGF-beta signaling pathway (hsa04350).





**Figure 3:** Pathways enrichment analysis. Statistically significant ( $P < 0.05$ ) KEGG pathways maps resulted from the pathways union algorithm (Y axis). From this set we selected the most relevant pathways, as follows: MicroRNAs in cancer; Proteoglycans in cancer, Pathways in cancer, Hippo signalling pathway, FoxO signalling pathway, p53 signalling pathway, PI3K-Akt signalling pathway and TGF-beta signalling pathway.

We further analysed the putative functions of annotated miRNAs' target genes from most relevant KEGG pathways and summarised those associated to COF, osteoblast, osteoclast and fibroblast cell biology, according to previous studies (Table 2)<sup>30-35</sup>.

**Table 2:** Summary of relevant miRNAs target genes present in KEGG pathway maps involved in COF and osteoblast, osteoclast and fibroblast cell biology

KEGG pathways	Mutant Genes in COF <sup>11</sup>	Cell type		
		Osteoblast 31,35	Osteoclast 30	Fibroblast 32-34
Proteoglycans in cancer (hsa05205)	<i>CTNNB1</i>	<i>AKT1, AKT2, AKT3, CAV2, CBL, CTNNB1, EGFR, ERBB2, FN1, FZD6, HRAS, KRAS, MAP2K1, MET, MMP2, NRAS, PTK2, PTPN11, RHOA, SMO, THBS1, VEGFA</i>	<i>CBL, RAC1, RDX</i>	<i>FGFR1, VEGFA</i>
MicroRNAs in cancer (hsa05206)	<i>APC</i>	<i>BCL2, CYP1B1, DNMT3A, E2F1, EGFR, ERBB2, FGFR3, HRAS, IRS1, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, RHOA, SOX4, THBS1, VEGFA</i>	<i>RDX</i>	<i>FGFR3, VEGFA</i>
Hippo signaling pathway (hsa04390)	<i>APC, CTNNB1</i>	<i>CTNNB1, FZD6, SMAD1, SERPINE1</i>		<i>CTGF</i>
Pathways in cancer (hsa05200)	<i>CTNNB1, APC</i>	<i>MET, CBL, FGFR3, BCL2, MMP2, CTNNB1, GNAQ, SMO, VEGFA, E2F1, FZD6, RHOA, KRAS, NRAS, EGFR, PTK2, FN1, HRAS, AKT3, MAP2K1, GNAS, AKT2, COL4A1</i>	<i>CBL, RAC1, PLD1, MITF</i>	<i>FGFR1, FGFR3, VEGFA, IL6</i>
Transcriptional misregulation in cancer (hsa05202)		<i>H3F3A, MET, PTK2, SMAD1</i>		<i>IL6</i>
Adherens junction (hsa04520)	<i>CTNNB1</i>	<i>EGFR, CTNNB1, MET, PVRL1, RHOA</i>		<i>FGFR1</i>
PI3K-Akt signaling pathway (hsa04151)		<i>AKT3, BCL2, COL1A1, COL5A1, EGFR, FGFR3, FN1, HRAS, IRS1, KRAS, MAP2K1, MET, NRAS, PTK2, THBS1, VEGFA</i>	<i>RAC1</i>	<i>FGFR1, FGFR3, VEGFA</i>
TGF-beta signaling pathway (hsa04350)		<i>RHOA</i>		
FoxO signaling pathway (hsa04068)		<i>AKT3, EGFR, HRAS, IRS1, KRAS, MAP2K1, NRAS, SMAD4</i>		<i>IL6</i>

<span style="background-color: #f4a460; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span>	Gene is present in 4 relevant KEGG pathway maps
<span style="background-color: #ff0000; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span>	Gene is present in 5 relevant KEGG pathway maps
<span style="background-color: #0000ff; border: 1px solid black; display: inline-block; width: 10px; height: 10px;"></span>	Gene is present in 6 relevant KEGG pathway maps

## DISCUSSION

Differences in miRNA expression indicate a variety of post-transcriptional regulatory functions of these small non-coding RNA molecules. Bioinformatics analysis allows the interpretation of extensive data obtained from biological experiments. In the present study, the leader gene approach showed the most relevant target genes in the COF pathobiology: *EZH2*, *XIAP*, *MET* and *TGFBR1*. *EZH2* specifically methylates nucleosomal histone H3 at lysine-27 (H3-K27)<sup>36</sup> and it is a target of hsa-miR-138-5p. This miRNA targets this epigenetic regulator, by binding to 3' untranslated region (3' UTR) and suppress its expression at both mRNA and protein levels<sup>37</sup>. Although hsa-miR-138-5p is found to be downregulated in malignant neoplasms<sup>37</sup>, this miRNA was found to be upregulated in COF.

The second gene reported as a leader gene in COF in the present study, *XIAP*, directly inhibits the cell-death caspases 3, 7 and 9. As these proteases are important effectors of apoptosis, *XIAP* can inhibit cell death<sup>38</sup>. This gene is a target of differently expressed miRNAs in COF. Has-miR-181a-5p and miR-200bc/429 cluster regulates *XIAP* expression by direct binding to 3'UTR<sup>39</sup>. Upregulation of has-miR-181a-5p in COF may have a pro-apoptotic effect because this miRNA inhibits *XIAP*. On the other hand, the downregulation of miR-200bc observed in COF may result in an anti-apoptotic effect. *In vitro* studies showed that the miR-200bc/429 cluster expression was able to reduce *XIAP* protein levels and to sensitise gastric and lung cancer cell lines to anti-cancer drugs that induce apoptosis<sup>40</sup>. Functional studies may reveal the effects of these miRNAs in apoptosis regulation in COF.

The third leader gene found in COF is the human oncogene *MET*. According to Dean et al. (1985)<sup>41</sup>, *MET* is homologous to the tyrosine kinases and related to growth factor receptors. Gray et al. (2015) demonstrated the immunoexpression of *MET* in osteoblasts and osteoclasts in osteofibrous dysplasia, and showed its role as a regulator of cortical bone osteogenesis<sup>42</sup>. In our panel, we found two miRNAs with a potential role in the regulation of *MET* expression. We found upregulation of hsa-miR-199a and downregulation of hsa-miR-

31-5p in COF. While upregulation of hsa-miR-199a in fibroblast cell lines inhibits *MET*<sup>43</sup>, downregulation of hsa-miR-31-5p in melanoma cell lines may contribute to *MET* expression<sup>44</sup>. Further studies are necessary to demonstrate which of these mechanisms may be relevant to COF development or progression.

The fourth leader gene, *TGFBR1*, encodes a serine/threonine kinase receptor that transduces signals for the TGF-beta family. The ligand is dependent on expression of type II receptors, forming a heteromeric complex<sup>45</sup>. *TGFBR1* is one of hsa-miR-181a-5p targets. We found upregulation of this miRNA in COF. Overexpression of this miRNA impaired TGF-beta signalling pathway, resulting in downregulation of *TGFBR1* at mRNA and protein level in mesenchymal stem cells<sup>46</sup>. Also, hsa-miR-181a-5p was described as a promoter of osteoblastic differentiation by downregulating the TGF- $\beta$  signalling molecules as *TGFBR1*<sup>47</sup>. This last finding is in line with our results, probably reflecting a promotion of osteoblastic differentiation in COFs. *TGFBR1* is also a target of another miRNA, has-miR-135b-5p, which directly binds to recognition sites in its 3'UTR in human embryonic stem cells<sup>48</sup>. Our results showed downregulation of has-miR-135b-5p, but the role of such phenomena in COF tumour context is unclear.

Enrichment analysis revealed Kegg pathways associated with the set of differentially expressed miRNAs in COF. According to the biology of bone and COF, we selected the most significant pathways. The relevance of the pathways Proteoglycans in cancer<sup>49</sup>, MicroRNAs in cancer<sup>13</sup> Pathways in cancer, p53 and PI3K-Akt<sup>50-54</sup>, Hippo<sup>55</sup>, FoxO<sup>56</sup> and TGF-beta signalling pathways<sup>57</sup> was previously assessed in bone neoplasms, odontogenic tumours and osteogenesis. Proteomics and functional analysis should be performed in the future to confirm the possible relevance of any of these pathways in COF development.

Further confirming the leader gene approach, *XIAP* and *MET* genes identified as leaders in COF were also described as miRNAs targets in Kegg pathways. *MET* was observed in most of these pathways maps (Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer,

Pathways in cancer and PI3K-Akt) as a target of hsa-miR-181a-5p<sup>58</sup> and hsa-miR-199a-3p<sup>43</sup>. *XIAP* was demonstrated as a target of hsa-miR-200bc<sup>40</sup> and miR-181a-5p<sup>39</sup> in Pathways in cancer Kegg map.

Point mutations in the *CTNNB1* (exon 3) and *APC* (exon 15) genes were identified in COF<sup>11</sup>. In addition, consistent with Wnt/ $\beta$ -catenin pathway activation, COF cells were reported to show nuclear expression of  $\beta$ -catenin protein in 25% of the tumours<sup>11</sup>. The pathway enrichment analysis revealed these two genes as miRNAs targets in Proteoglycans in cancer, MicroRNAs in cancer, Hippo signalling pathway and Pathways in cancer. However, the miRNA-target interactions (MTI) of both genes have not been validated<sup>59,60</sup>, restricting possible inferences about the effect of deregulation of this miRNAs in COF.

In conclusion, COF showed aberrant expression of miRNAs. Our analysis of the miRNAs gene targets shed light on the pathways and mechanisms involved in COF pathogenesis. Although this work presents robust results, it is an initial survey of the molecular alterations in COF, and further studies are necessary to clarify their role in COF origin and progression.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil. ALSG is a research fellow at CNPq. MGD is a research fellow at CAPES. CCG is a research fellow at CAPES/Proc. 88881.118879/2016-01. RSG is a research fellow at CAPES/Proc. 88881.119257/2016-01.

## **CONFLICT OF INTEREST STATEMENT**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

**REFERENCES**

1. Wright JM, Vered M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. *Head Neck Pathol.* 2017;11(1):68-77.
2. Ojo MA, Omoregie OF, Altini M, Coleman H. A clinico-pathologic review of 56 cases of ossifying fibroma of the jaws with emphasis on the histomorphologic variations. *Niger J Clin Pract.* 2014;17(5):619-623.
3. Chang CC, Hung HY, Chang JYF, et al. Central ossifying fibroma: A clinicopathologic study of 28 cases. *J Formos Med Assoc.* 2008;107(4):288-294.
4. Brannon RB, Fowler CB. Benign Fibro-Osseous Lesions: A Review of Current Concepts. 2001;8(3):126-143.
5. Eversole LR, Leider AS, Nelson K. Ossifying fibroma: A clinicopathologic study of sixty-four cases. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol.* 1985;60(5):505-511.
6. MacDonald-Jankowski DS. Ossifying fibroma: A systematic review. *Dentomaxillofacial Radiol.* 2009;38(8):495-513.
7. Masi G, Iacobone M, Sinigaglia A, et al. Characterization of a new CDC73 missense mutation that impairs Parafibromin expression and nucleolar localization. *PLoS One.* 2014;9(5):e97994.
8. Jackson CE, Norum RA, Boyd SB, et al. Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: a clinically and genetically distinct syndrome. *Surgery.* 1990;108(6):1003-1006.
9. Pimenta FJ, Gontijo Silveira LF, Tavares GC, et al. HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. *Oral Oncol.* 2006;42(7):735-739.
10. de Mesquita Netto AC, Gomez RS, Diniz MG, et al. Assessing the contribution of

- HRPT2 to the pathogenesis of jaw fibrous dysplasia, ossifying fibroma, and osteosarcoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(3):359-367.
11. Horvai A, Jordan R. Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Bones:  $\beta$ -Catenin Immunohistochemical Analysis and CTNNB1 and APC Mutation Analysis. *Head Neck Pathol.* 2014;8(3):291-297.
  12. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell.* 1993;75(5):843-854.
  13. Jones KB, Salah Z, Del Mare S, et al. miRNA signatures associate with pathogenesis and progression of osteosarcoma. *Cancer Res.* 2012;72(7):1865-1877.
  14. Zhou G, Lu M, Chen J, et al. Identification of miR-199a-5p in serum as noninvasive biomarkers for detecting and monitoring osteosarcoma. *Tumor Biol.* 2015;36(11):8845-8852.
  15. Hu W, Ye Y, Zhang W, Wang J, Chen A, Guo F. MiR-142-3p promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Mol Med Rep.* 2013;7(2):689-693.
  16. Wang T, Xu Z. miR-27 promotes osteoblast differentiation by modulating Wnt signaling. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010;402(2):186-189.
  17. Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov.* 2014;13(8):622-638.
  18. Slootweg PJ, El-Mofty SK. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *WHO Classification of Tumour.* Lyon: IARC Press; 2005:319-320.
  19. Su L, Weathers DR, Waldron CA. ORAL AND MAXILLOFACIAL PATHOLOGY Distinguishing features of focal cemento-osseous dysplasias and cemento-ossifying fibromas. 1997;84(3):301-309.

20. Fleige S, Pfaffl MW. RNA integrity and the effect on the real-time qRT-PCR performance. *Mol Aspects Med.* 2006;27(2-3):126-139.
21. Benjamini Y, Hochberg Y. Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *J R Stat Soc B.* 1995;57(1):289-300.
22. Poswar FDO, Farias LC, Fraga CAD, et al. Bioinformatics, Interaction Network Analysis, and Neural Networks to Characterize Gene Expression of Radicular Cyst and Periapical Granuloma. *J Endod.* 2015;41(6):877-883.
23. Chou CH, Chang NW, Shrestha S, et al. miRTarBase 2016: Updates to the experimentally validated miRNA-target interactions database. *Nucleic Acids Res.* 2016;44(D1):D239-D247.
24. Agarwal V, Bell GW, Nam JW, Bartel DP. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife.* 2015;4(AUGUST2015):1-38.
25. Poswar F de O, Santos LI, Farias LC, et al. An adaptation of particle swarm clustering applied in basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma of the skin and actinic keratosis. *Meta Gene.* 2017;12:72-77.
26. Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks. *Genome Res.* 2003;13(11):2498-2504.
27. Maere S, Heymans K, Kuiper M. BiNGO: A Cytoscape plugin to assess overrepresentation of Gene Ontology categories in Biological Networks. *Bioinformatics.* 2005;21(16):3448-3449.
28. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, et al. DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(W1):W460-W466.



29. Kanehisa M, Furumichi M, Tanabe M, Sato Y, Morishima K. KEGG: New perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D353-D361.
30. Moreaux J, Hose D, Kassambara A, Reme T. Osteoclast-gene expression profiling reveals osteoclast-derived CCR2-chemokines promoting myeloma cell migration. 2010;117(4):1280-1291.
31. Qi H, Aguiar DJ, Williams SM, La Pean A, Pan W, Verfaillie CM. Identification of genes responsible for osteoblast differentiation from human mesodermal progenitor cells. *Proc Natl Acad Sci.* 2003;100(6):3305-3310.
32. Ornitz DM, Itoh N. The fibroblast growth factor signaling pathway. *Wiley Interdiscip Rev Dev Biol.* 2015;4(3):215-266.
33. Zhang X, Ibrahimi OA, Olsen SK, Umemori H, Mohammadi M, Ornitz DM. Receptor specificity of the fibroblast growth factor family: The complete mammalian FGF family. *J Biol Chem.* 2006;281(23):15694-15700.
34. Tong Z, Sant S, Khademhosseini A, Jia X. Controlling the Fibroblastic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells Via the Combination of Fibrous Scaffolds and Connective Tissue Growth Factor. *Tissue Eng Part A.* 2011;17:2773-2785.
35. Granchi D, Ochoa G, Leonardi E, et al. Gene Expression Patterns Related to Osteogenic Differentiation of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells During Ex Vivo Expansion. *Tissue Eng Part C.* 2010;16(3):511-524.
36. Kathrin Plath, Jia Fang, Susanna K. Mlynarczyk-Evans, Ru Cao, Kathleen A. Worringer HW, CecileC. dela Cruz, ArieP. Otte, Barbara Panning YZ. Role of Histone H3 Lysine 27 Methylation in X Inactivation. *Science (80- ).* 2002;298(5616):1039-1043.
37. Liu X, Wang C, Chen Z, et al. MicroRNA-138 suppresses epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem J.* 2011;440(1):23-31.

38. Deveraux QL, Takahashi R, Salvesen GS, Reed JC. X-linked IAP is a direct inhibitor of cell-death proteases. *Nature*. 1997;388(6639):300-304.
39. Zhu DX, Zhu W, Fang C, et al. MiR-181a/b significantly enhances drug sensitivity in chronic lymphocytic leukemia cells via targeting multiple anti-apoptosis genes. *Carcinogenesis*. 2012;33(7):1294-1301.
40. Zhu W, Xu H, Zhu DX, et al. miR-200bc/429 cluster modulates multidrug resistance of human cancer cell lines by targeting BCL2 and XIAP. *Cancer Chemother Pharmacol*. 2012;69(3):723-731.
41. Dean M, Park M, Le Beau MM, et al. The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature*. 1985;318(6044):385-388.
42. Gray MJ, Kannu P, Sharma S, et al. Mutations Preventing Regulated Exon Skipping in MET Cause Osteofibrous Dysplasia. *Am J Hum Genet*. 2015;97(6):837-847.
43. Kim S, Ui JL, Mi NK, et al. MicroRNA miR-199a \* regulates the MET proto-oncogene and the downstream extracellular signal-regulated kinase 2 (ERK2). *J Biol Chem*. 2008;283(26):18158-18166.
44. Asangani IA, Harms PW, Dodson L, et al. Genetic and epigenetic loss of microRNA-31 leads to feed-forward expression of EZH2 in melanoma. *Oncotarget*. 2012;3(9):1011-1025.
45. Franzén P, ten Dijke P, Ichijo H, et al. Cloning of a TGF $\beta$  type I receptor that forms a heteromeric complex with the TGF $\beta$  type II receptor. *Cell*. 1993;75(4):681-692.
46. Liu L, Wang Y, Fan H, et al. MicroRNA-181a regulates local immune balance by inhibiting proliferation and immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2012;30(8):1756-1770.
47. Bhushan R, Grünhagen J, Becker J, Robinson PN, Ott CE, Knaus P. MiR-181a

- promotes osteoblastic differentiation through repression of TGF- $\beta$  signaling molecules. *Int J Biochem Cell Biol.* 2013;45(3):696-705.
48. Bhinge A, Poschmann J, Namboori SC, et al. MiR-135b is a direct PAX6 target and specifies human neuroectoderm by inhibiting TGF- $\beta$ /BMP signaling. *EMBO J.* 2014;33(11):1271-1283.
  49. Gao Y, Feng Y, Shen JK, et al. CD44 is a direct target of miR-199a-3p and contributes to aggressive progression in osteosarcoma. *Sci Rep.* 2015;5(January):11365.
  50. Song R, Tian K, Wang W, Wang L. P53 suppresses cell proliferation, metastasis, and angiogenesis of osteosarcoma through inhibition of the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Int J Surg.* 2015;20:80-87.
  51. Keremu A, Maimaiti X, Aimaiti A, Yushan M, Alike Y. NRSN2 promotes osteosarcoma cell proliferation and growth through PI3K / Akt / MTOR and Wnt /  $\beta$ -catenin signaling. 2017;7(3):565-573.
  52. Wang J, Pang W, Zuo Z, Zhang W, He W. MicroRNA-520b Suppresses Proliferation, Migration, and Invasion of Spinal Osteosarcoma Cells Via Downregulation of Frizzled-8. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther.* 2017;(1677).
  53. Nord KH, Nilsson J, Arbajian E, et al. Recurrent chromosome 22 deletions in osteoblastoma affect inhibitors of the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *PLoS One.* 2013;8(11):1-7.
  54. Chen Y, Hu Y, Yang L, et al. Runx2 alleviates high glucose-suppressed osteogenic differentiation via PI3K/AKT/GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin pathway. *Cell Biol Int.* 2017;9999:1-11.
  55. Chai J, Xu S, Guo F. TEAD1 mediates the oncogenic activities of Hippo-YAP1 signaling in osteosarcoma. *Biochem Biophys Res Commun.* 2017:2-7.
  56. Guan H, Tan P, Xie L, et al. FOXO1 inhibits osteosarcoma oncogenesis via Wnt/ $\beta$ -

catenin pathway suppression. *Oncogenesis*. 2015;4(9):e166.  
doi:10.1038/oncsis.2015.25.

57. Li S, Li F, Cheng T. TGF- $\beta$ 1 promotes osteosarcoma cell migration and invasion through the miR-143-versican pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2014;34(6):2169-2179.
58. Korhan P, Erdal E, Atabey N. MiR-181a-5p is downregulated in hepatocellular carcinoma and suppresses motility, invasion and branching-morphogenesis by directly targeting c-Met. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014;450(4):1304-1312.
59. Balakrishnan I, Yang X, Brown J, et al. Genome-Wide Analysis of miRNA-mRNA Interactions in Marrow Stromal Cells. *Stem Cells*. 2014;32(3):662-673.
60. Pillai MM, Gillen AE, Yamamoto TM, et al. HITS-CLIP reveals key regulators of nuclear receptor signaling in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2014;146(1):85-97.

**APÊNDICE B - Artigo****The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is deregulated in cemento-ossifying fibromas**

Thaís dos Santos Fontes PEREIRA<sup>a</sup>, Marina Gonçalves DINIZ<sup>a</sup>, Josiane Alves FRANÇA<sup>b</sup>, Rennan Garcias MOREIRA<sup>c</sup>, Grazielle Helena Ferreira de MENEZES<sup>b</sup>, Sílvia Ferreira de SOUSA<sup>a</sup>, Wagner Henriques de CASTRO<sup>a</sup>, Carolina Cavaliéri GOMES<sup>b</sup>, Ricardo Santiago GOMEZ<sup>a</sup> \*

<sup>a</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>b</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

<sup>c</sup>Genomics Multi-user Laboratory, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

**\*CORRESPONDING AUTHOR:**

Prof. Ricardo Santiago Gomez

Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia

Av. Antônio Carlos 6627, Pampulha - 31270-901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

E-mail: [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br)

**CONFLICTS OF INTEREST:** none

The abstract was presented at the 43<sup>o</sup> Brazilian Congress of Oral Medicine and Oral Pathology (43<sup>o</sup> CONGRESSO BRASILEIRO DE ESTOMATOLOGIA E PATOLOGIA ORAL - SOBEP 2017)

**WORD COUNT FOR THE ABSTRACT:** 200

**COMPLETE MANUSCRIPT WORD COUNT:** 2756

**NUMBER OF REFERENCES:** 39

**NUMBER OF FIGURES/TABLES:** 5

**ABSTRACT**

**OBJECTIVE:** Cemento-ossifying fibroma (COF) is an odontogenic tumour whose surgical treatment is associated with morbidities. Its molecular pathogenesis is unclear, limiting any attempt to tailor treatments. The purpose of this study was to investigate mutations in 50

oncogenes and tumour suppressor genes, including APC and CTNNB1 in which mutations have been previously reported in COF. In addition, we assessed the transcriptional levels of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway genes in COF.

**STUDY DESIGN:** We used a qPCR array to evaluate the transcriptional levels of 44 Wnt/ $\beta$ -catenin pathway genes in six COF samples, in comparison to six samples of healthy jaw bones. By using next-generation sequencing (NGS) in seven COF, we investigated approximately 2800 mutations in 50 genes.

**RESULTS:** The expression assay revealed 12 differentially-expressed Wnt/ $\beta$ -catenin pathway genes in COF, including the up-regulation of *CTNNB1*, *TCF7*, *NKD1* and *WNT5A*, and down-regulation of *CTNNBIP1*, *FRZB*, *FZD6*, *RHOA*, *SFRP4*, *WNT10A*, *WNT3A* and *WNT4*, suggesting activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. NGS revealed five SNV: *TP53* (rs1042522), *PIK3CA* (rs2230461), *MET* (rs33917957), *KIT* (rs3822214) and *APC* (rs33974176), but none of them were pathogenic.

**CONCLUSION:** While NGS detected no oncogenic mutation, deregulation of key Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway genes appears to be relevant to the molecular pathogenesis of COF.

**KEYWORDS:** Cemento-ossifying fibroma; Bone Neoplasms; Wnt Signaling Pathway; Sequence Analysis, DNA; Gene Expression Profiling

## INTRODUCTION

Cemento-ossifying fibroma (COF) is a benign well-delimited fibro-osseous lesion, constituted by mineralized deposits surrounded by fibrous connective tissue <sup>1</sup>. Clinically, COF presents as an expansive asymptomatic enlargement, which mainly affects the posterior region of the mandible <sup>2,3</sup>. Radiographic examination may show a well-defined radiolucent image containing radiopaque deposits, sometimes surrounded by a sclerotic border <sup>3</sup>. The first choice of treatment is conservative surgery with long-term follow-up <sup>3,4</sup>.

COF pathogenesis remains unclear, despite some attempts to elucidate its molecular nature. Some studies assessed mutations in the *CDC73* (*HRPT2*) tumour suppressor gene, which encodes the parafibromin protein <sup>5,6</sup>. However, this gene seems to have a more significant role in COF from individuals with the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome <sup>6</sup>. Wnt/ $\beta$ -Catenin signaling pathway downstream genes were positively associated with the expression of parafibromin <sup>7</sup>.

The Wnt/ $\beta$ -catenin cell signaling pathway participates in physiological events such as cell differentiation <sup>8</sup>, embryonic development, and odontogenesis <sup>9</sup>, and is altered in several diseases, including gastrointestinal carcinomas <sup>10</sup>. Wnt proteins bind to Frizzled receptors and LRP5-LRP6 co-receptors on the plasma membrane. Wnt signaling is inhibited by antagonists such as Secreted frizzled-related proteins (SFRPs), Dickkopfs (DKKs) and Wnt inhibitor factor 1 (WIF1) <sup>11-13</sup>. In the absence of Wnt ligands, cytoplasmic  $\beta$ -catenin is recruited by a destruction complex consisting of two matrix proteins (APC and AXIN) and two kinases (GSK3 $\beta$  and CK1). The complex leads to the constitutive phosphorylation of  $\beta$ -catenin and its proteasomal degradation <sup>14</sup>. In this context, the interaction of TLE with LEF1 inhibits  $\beta$ -catenin-dependent transcription of LEF1 <sup>15</sup>. In the presence of Wnt ligands, there is the translocation of AXIN to the plasma membrane, with the following deactivation of the destruction complex, allowing the stabilisation of  $\beta$ -catenin and its translocation to the nucleus <sup>16</sup>. Point mutations in the *CTNNB1* (exon 3) and *APC* (exon 15) genes were

previously identified in two COF cases <sup>17</sup>, which suggests that the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway may be relevant to the biology of COF.

The purpose of this study was to investigate approximately 2800 mutations from 50 oncogenes and tumour suppressor genes that are commonly mutated in human cancers, including *APC* and *CTNNB1* genes, in COF. Also, we investigated the transcriptional levels of different Wnt/ $\beta$ -catenin pathway genes in these samples.

## **MATERIALS AND METHODS**

### *SAMPLES AND PATIENTS*

The authors followed the ethical standards, and the University ethics committee approved the study (Universidade Federal de Minas Gerais, protocol 44483515.0.0000.5149) in compliance with the Helsinki Declaration and all participants signed a written informed consent. A convenient sample of fresh COF tumours was obtained. Fresh tissue samples were collected during the surgical biopsy procedures, placed in Tissue-Tek (Sakura Finetek, CA, EUA) and RNA later solution (Ambion Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) and stored at -80°C until use. An additional fragment was formalin-fixed and paraffin-embedded for histopathological evaluation. The study included only patients with a clinical, radiographic and histopathological diagnosis of COF <sup>18</sup>. Seven samples underwent targeted next-generation sequencing, and six were used in the qPCR array. The control group for the expression analysis consisted of specimens from alveolar bone of healthy individuals, with no bone disorders and no clinical signs of inflammation, and they were collected during orthognathic surgeries or 3<sup>rd</sup> molar dental extractions, and stored at -80°C into RNA later solution.

### *NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)*

DNA was isolated from seven fresh tissue samples using the Dneasy Tissue Kit (QIAGEN®, Hilden, Germany) according to the manufacturer's protocol. A targeted panel of 50 oncogenes and tumour suppressor genes commonly mutated in cancer and including the



Wnt/ $\beta$ -catenin pathway *APC* and  $\beta$ -catenin (*CTNNB1*) genes was sequenced, by using Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies, Carlsbad, USA). This panel includes the following genes: *SMARCB1*, *RB1*, *TP53*, *ERBB4*, *FBXW7*, *BRAF*, *KIT*, *GNAS*, *HRAS*, *EGFR*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *CDKN2A*, *ERBB2*, *ABL1*, *JAK2*, *KRAS*, *NRAS*, *NOTCH1*, *ATM*, *FGFR1*, *STK11*, *PTPN11*, *APC*, *SMAD4*, *PTEN*, *SMO*, *CTNNB1*, *RET*, *IDH2*, *SRC*, *EZH2*, *VHL*, *MPL*, *NPM1*, *FLT3*, *FGFR3*, *CDH1*, *KDR*, *HNF1A*, *MLH1*, *ALK*, *IDH1*, *GNAQ*, *AKT1*, *JAK3*, *FGFR2*, *GNA11*, *MET* and *CSF1R*.

Library preparation was carried out by using Ion AmpliSeq™ HiFi Mix, Ion AmpliSeq™ Primer Pool (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Next, the amplified libraries were purified by using Agencourt® AMPure® XP reagent (Beckman-Coulter, Beverly, MA, USA), 70% ethanol and a magnetic field. Libraries were quantified by qPCR, using Ion Library Quantitation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), and diluted to a concentration of 100 pM. Samples were submitted to emulsion PCR amplification in the Ion One Touch 2 Instrument. After amplification, samples were quality controlled using the Ion Sphere™ quality control test and those which were suitable were enriched using the OneTouch™ ES, according to the manufacturer's instructions. Sequencing was carried out by using the Ion 314™ Chip v2 and Ion 316™ Chip v2 in the Ion Personal Genome Machine System (Ion PGM™ System) (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The Ion Reporter Software (5.2) was used to align reads to the human genome (hg19). Missense and somatic variants were filtered considering single nucleotide variants (SNV), insertions or deletions (INDEL), multi-nucleotide variants (MNV) and long deletions (LONGDEL). The resulting variants were visually analysed using the Integrative Genomics Viewer (IGV 2.3) to assess their bidirectional representativeness, identifying eventual false findings<sup>19</sup>. We reported those variants with a sequencing depth greater than x500 and frequency above 5%. The online tools PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2) and SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant) were used for the *in silico* prediction of the possible functional impact of amino acid substitutions on a human protein. We established as a

criterion that only samples harbouring pathogenic mutations would be further validated by orthogonal method validation (Sanger sequencing).

#### *qPCR ARRAY*

There was insufficient tumour tissue from one of the samples used for NGS. Therefore, total RNA was isolated from six COF samples and six healthy normal bone specimens, using the mirVana™ miRNA Isolation Kit (Ambion, Vilnius, LT) according to the manufacturer's recommendations. The RNA obtained was treated with DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Subsequently, 2.5µg of RNA was used for the reverse transcription reaction, using the SuperScript® VILO™ cDNA Synthesis Master Mix (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA).

The expression profile of 44 genes participating in the Wnt/β-catenin pathway and also related to bone biology (*APC, AXIN1, CCND1, CSNK1A1, CTNNB1, CTNNBIP1, DKK1, DVL1, FGF4, FOSL1, FRZB, FZD1, FZD2, FZD6, FZD6, FZD8, GSK3B, LEF1, LRP5, LRP6, MYC, NKD1, NLK, PITX2, PPP2CA, RHOU, SFRP1, SFRP4, TCF7, TCF7L1, TLE1, WIF1, WNT1, WNT10A, WNT11, WNT16, WNT2, WNT2B, WNT3, WNT3A, WNT4, WNT5A, WNT5B, WNT6, WNT8A*) were evaluated using TaqMan® Array Fast Plates (Applied Biosystems, Foster City, CA) according to the manufacturer's instructions. Four reference genes (*18S, GAPDH, GUSB* and *HPRT1*) were used for normalisation, considering the gene stability score. This normalisation method determines the reference genes with the lower score that represents, the more stable expression of that target in comparison to all other targets.<sup>20</sup> Reactions occurred in the Step One Plus thermal cycler (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Data were analysed in the Applied Biosystems® analysis software, v.1.0. The comparative CT method and the Student's t-test were used. A fold-change  $\geq 2$  and  $P < 0.05$  were considered to show the differential expression of genes.

## RESULTS

### SAMPLES AND PATIENTS

The COF tumours were located in the mandible, most commonly in posterior region. They presented well-defined clinical-radiographic features and were enucleated. The presence of a fibrous capsule allowed the separation of the lesion from the adjacent bone, removing it in single or large pieces. Recurrence was observed in one case (#7). The specimens of the control group were obtained from the alveolar bone during orthognathic surgery. Four control samples were from the mandible and two from maxilla. The table 1 shows the clinical features of the patients included in the study.

Table 1: Clinical data of cemento-ossifying fibroma cases included in next generation sequencing (NGS) and qPCRarray

Case	Sex	Age (years)	Location	Experiment
1	F	31	Periapical region of 1 <sup>st</sup> mandibular molar	NGS
2	F	32	Mandibular symphysis, extending from left premolars to right premolars	NGS and qPCRarray
3	F	29	Left mandibular ramus	NGS and qPCRarray
4	F	57	Left anterior mandible	NGS and qPCRarray
5	F	48	Left mandibular body, premolars region	NGS
6	F	25	Left posterior mandible and ramus	NGS
7	F	30	Left posterior mandible and ramus	NGS and qPCRarray
8	F	58	Right posterior mandible	qPCRarray
9	F	24	Right mandibular body, premolars region	qPCRarray

F, female; M, male; NGS, next generation sequencing

### NEXT-GENERATION SEQUENCING (NGS)

Seven COF samples were sequenced. The individuals had a median age of 31 years (29 to 57 years). Sequencing runs yielded a number of reads ranging from 270,263 to 402,380 per sample. The mean length was about 120bp. The number of bases sequenced

ranged from 32,469,950 to 48,321,880 and about 96% of the bases were sequenced with a quality value of at least 20 (Q20). The analysis resulted in the following missense single nucleotide variants (SNV), as shown in Table 2: *PIK3CA* (rs2230461), cases #1, #3, #4; *TP53* (rs1042522), cases #3, #5, #7; *MET* (rs3391795), case #6; *KIT* (rs3822214), case #7, and *APC* (rs33974176), case #7. All variants were tolerated and benign according to SIFT and PolyPhen predictions. No pathogenic variant was detected. Also, all of them showed MAF>0.01, and therefore they probably represent single nucleotide polymorphisms.

Table 2: Missense SNV detected by NGS in cemento-ossifying fibroma cases.

Case	Locus	Genes	Frequency (%)	Exon	Transcript	Coding	Amino Acid Change	dbSNP	MAF
1	chr3:178927410	<i>PIK3CA</i>	55.12	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
3	chr3:178927410	<i>PIK3CA</i>	55.45	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
	chr17:7579472	<i>TP53</i>	50.86	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
4	chr3:178927410	<i>PIK3CA</i>	100.00	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
5	chr17:7579472	<i>TP53</i>	49.35	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
6	chr7:116340262	<i>MET</i>	52.00	2	NM_001127500.1	c.1124A>G	p.Asn375Ser	rs33917957	0.021
	chr4:55593464	<i>KIT</i>	49.02	10	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	rs3822214	0.064
7	chr5:112173899	<i>APC</i>	53.63	16	NM_000038.5	c.2608C>T	p.Pro870Ser	rs33974176	0.012
	chr17:7579472	<i>TP53</i>	49.87	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398

#### qPCR ARRAY

To assess the involvement of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in COF pathogenesis, we determined the expression profile of 44 genes in six COF sample and six healthy jaw bone controls. The COF cases individuals had a median age of 31 years (24 to 58 years). Control group had a 1:1 male/female ratio and the median age was 20.5 years (18 to 30 years).

According to the lowest gene stability scores, we selected *GAPDH*, *GUSB* and *HRPT1* as reference genes for normalisation. Twelve genes were differentially expressed (Table 3). The fold-change of these genes in all samples, considering one healthy normal bone as a reference sample (X axis), is represented in Figure 1.

Table 3: Differentially expressed genes in cemento-ossifying fibroma.

<b>Gene</b>	<b>Fold-change</b>	<b>Log<sub>10</sub> Fold-change</b>	<b>p-Value</b>	<b>Regulation</b>
<i>CTNNB1</i>	2.285	0.359	0.047	Up-regulated
<i>NKD1</i>	7.665	0.885	0.004	Up-regulated
<i>TCF7</i>	4.432	0.647	0.012	Up-regulated
<i>WNT5A</i>	7.191	0.857	0.00	Up-regulated
<i>CTNNBIP1</i>	0.283	-0.548	0.003	Down-regulated
<i>FRZB</i>	0.281	-0.551	0.014	Down-regulated
<i>FZD6</i>	0.182	-0.740	0.011	Down-regulated
<i>RHOU</i>	0.017	-1.770	0.002	Down-regulated
<i>SFRP4</i>	0.145	-0.839	0.044	Down-regulated
<i>WNT10A</i>	0.188	-0.726	0.044	Down-regulated
<i>WNT3A</i>	0.008	-2.097	0.043	Down-regulated
<i>WNT4</i>	0.039	-1.409	0.005	Down-regulated

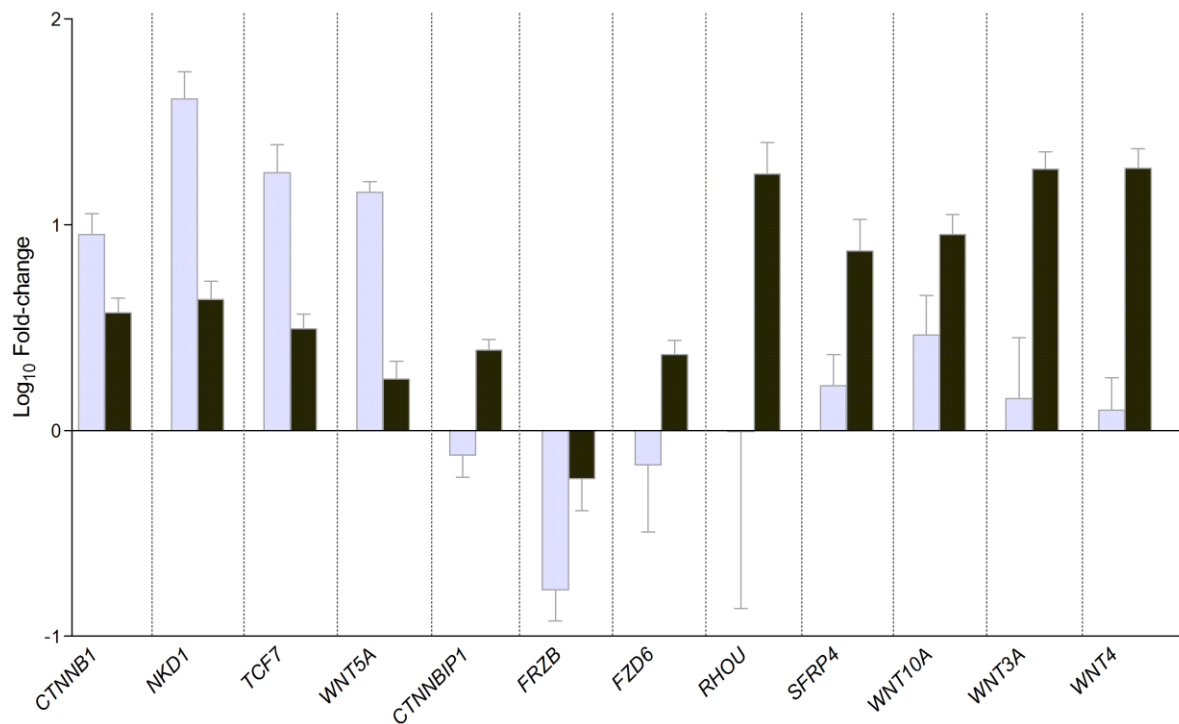


Figure 1: Plot showing the mean fold-change (relative quantification), in logarithmic scale, of differentially expressed genes in ossifying fibroma (COF) compared to healthy bone. Error bars represent standard error of the mean expression level calculated from six samples in each group. CTNNB1, TCF7, NKD1 and WNT5A were up-regulated in COF compared to normal bone, and CTNNBIP1, FRZB, FZD6, RHOU, SFRP4, WNT10A, WNT3A and WNT4 were down-regulated. Grey bars: COF, Black bars: normal bone (control group). X-axis: healthy normal bone used as reference sample.

## DISCUSSION

The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is essential to craniofacial development, mainly because it controls osteoblast differentiation in human mesenchymal stem cells. Wnt binding inhibits GSK3 $\beta$  activity, leading to  $\beta$ -catenin accumulation and its nuclear translocation.  $\beta$ -catenin works as a transcriptional co-activator for genes associated to osteoblastic differentiation <sup>21</sup>. The Wnt/ $\beta$ -catenin signaling loss drives the pre-osteoblast differentiation to adipocytes instead of osteoblasts <sup>22</sup>. This pathway is required for skeletal progenitor cell differentiation and bone formation. However, elevated levels of signaling may potentially suppress osteoblast maturation, as suggested in skeletal fibrous dysplasia <sup>23</sup>. Although the activating

Gα(s) mutations in fibrous dysplasia potentiates Wnt/β-catenin signaling, nuclear β-catenin was absent in craniofacial fibrous dysplasia <sup>17</sup>.

Single point mutations at Asp56 of *CTNNB1* and Glu1229 of *APC* were previously described in COF <sup>17</sup>. We found a non-pathogenic single nucleotide variant (SNV) in the *APC* gene in one COF case that simultaneously presented SNV in *KIT* and *TP53* genes, potentially representing polymorphisms. However, as no mutations in the Wnt/β-catenin pathway genes were detected in our COF samples, these genetic events may have a minor role in this neoplasia development. The targeted gene panel screened included only hotspot mutations, which restricts our results to mutations already described in tumour suppressor genes or oncogenes.

The NGS results also showed a missense SNV in *PIK3CA* that corresponds to a non-disease-causing variant suggested being a polymorphism. This variation was also described in head and neck squamous cell carcinomas and matched normal tissues <sup>24</sup>. Several mutations in *PIK3CA* have been described in human neoplasms, predominantly in two hotspot regions in exons 9 and 20 <sup>25</sup>. Mutations in this gene were also reported in osteosarcoma <sup>26,27</sup> and ameloblastoma <sup>28</sup>. Another missense SNV was detected in the *MET* proto-oncogene, which is related to growth factor receptors <sup>29</sup>. The SNV detected was not predicted to be damaging by SIFT and PolyPhen2 and has been previously reported as a germline variant in other tumour types. MET-mediated signaling is a regulator of osteogenesis, and mutations in this gene were described as a cause of osteofibrous dysplasia <sup>30</sup>. As no recurrent mutation was found in our study, whole exome sequencing would be necessary to decipher the genetic basis of this neoplastic condition.

Besides the β-catenin-dependent pathway (canonical WNT signaling), the Wnt ligands can also signal through the β-catenin-independent (non-canonical WNT signaling) pathway which can be further classified into the Planar Cell Polarity and the Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathways <sup>31</sup>. In COF, our results showed the up-regulation of *WNT5A* and the

down-regulation of *WNT3A*. Wnt5a is a ligand with dual function; depending on the available receptor, it can activate both canonical and non-canonical signaling pathways. This ligand can elicit a dose-dependent decrease in Wnt3a activation and consequently inhibit canonical Wnt signaling. Although COF showed decreased expression of *WNT3A*, the canonical activation of the pathway is still possible when the cell overexpresses the receptors mFz4 and LRP5. In this context,  $\beta$ -catenin finally accumulates in the nucleus<sup>32</sup>. The pattern found in our study is consistent with the ability of Wnt5a to suppress Wnt3a expression. Also, the up-regulation of *CTNNB1* and *TCF7* suggests activation of the canonical Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, but functional studies are necessary to confirm this activation.

*TCF7* is a downstream transcription factor of the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. The induced osteoblastic differentiation of bone marrow stromal stem cells by the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling led to the increased expression of  $\beta$ -catenin and *Tcf7*<sup>33</sup>. In COF, *TCF7* and *CTNNB1* were simultaneously up-regulated. The up-regulation of these genes and  $\beta$ -catenin protein can be inhibited by the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway antagonist, secreted Frizzled-related protein (SFRP)<sup>33</sup>. We also found the down-regulation of *SFRP4* in COF. Functional loss of *SFRP4* may cause significant alterations of bone structure characterised by the increased trabecular bone mass due to both excessive bone deposition and suppression of bone resorption. This phenotype was attributed to an osteogenic cellular response to Wnt signaling<sup>34</sup>. Additional studies are necessary to demonstrate the possible relevance of these mechanisms in COF development.

*RHOA* is important in osteoclast differentiation and was down-regulated in our COF samples. During RANKL-induced osteoclastogenesis, *RHOA* expression is up-regulated. In addition, its suppression impairs the function of osteoclast precursors<sup>35</sup>. *RHOA* potentially modulates  $\alpha\beta$ 3 signaling to regulate osteoclast precursor adhesion and allow fusion<sup>36</sup>. The down-regulation of *RHOA* may compromise the absorption and remodelling of bone tissue by interfering with osteoclast differentiation in COF. However, additional studies are necessary to show its relevance in COF development.



The activation or not of the Wnt signaling pathway is a controversial aspect in human bone neoplasms <sup>37</sup>. We observed the increased expression of downstream genes related to the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway (*CTNNB1* and *TCF7*), as well as the down-regulation of pathway antagonists (*SFRP4*, *FRZB* and *CTNNBIP1*). In the Figure 2 we illustrated the proposed deregulation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway based on the changes in the expression levels of activators and inhibitors of this pathway. Also, COF cells were reported to show nuclear expression of  $\beta$ -catenin protein in 25% of the tumours <sup>17</sup>. On the other hand, we found the up-regulation of *NKD1*, a passive antagonist, which inhibits canonical Wnt signaling by preventing the nuclear entrance of  $\beta$ -catenin <sup>38</sup>. Nkd1 acts as a Wnt-negative feedback regulator and its interaction with  $\beta$ -catenin is specifically dependent on Wnt ligand activation of the pathway <sup>39</sup>. Further, *NKD1* is activated only when levels of Wnt signaling exceed a homeostatic threshold <sup>38</sup>. Therefore, *NKD1* up-regulation in COF may be a result of the overactivation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. Together, these findings suggest the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in COF. However, further studies are still necessary to determine the complex regulation of the WNT pathway in COF.

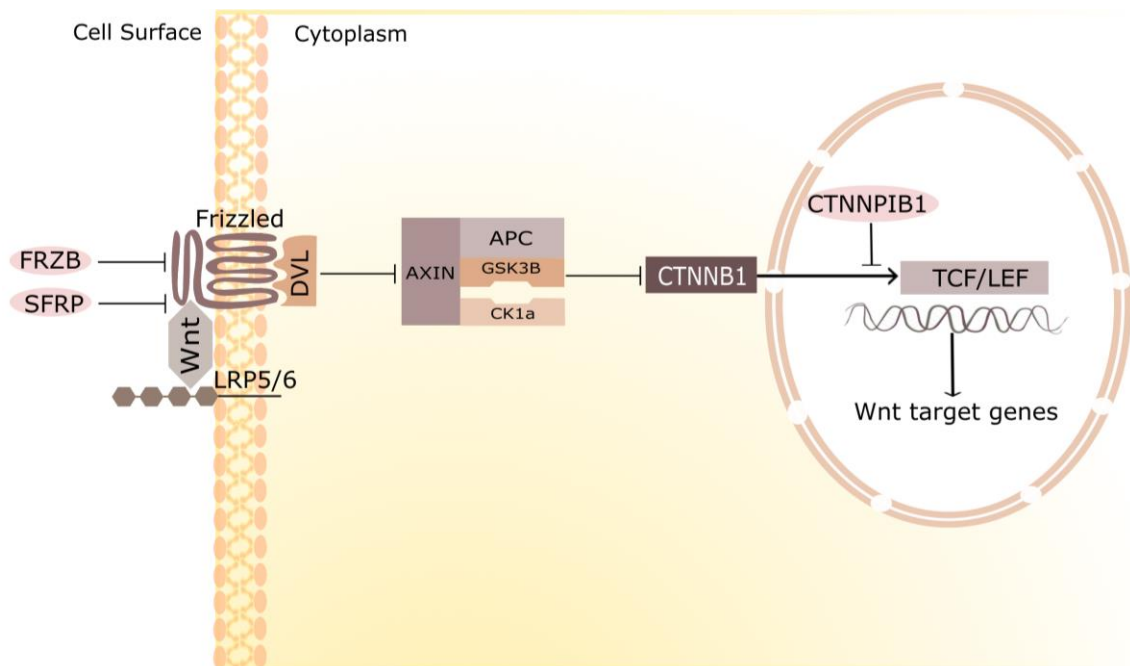


Figure 2: Schematic diagram of the canonical Wnt signaling pathway. Wnt family ligands bind to Frizzled transmembrane receptors and LRP5/6 co-receptors. Signaling results in the phosphorylation of Disheveled proteins (Dvl), leading to Axin binding to LRP5 / 6 and thereby

inactivating the cytoplasmic protein complex that catalyzes the phosphorylation and subsequent proteasome-mediated degradation of  $\beta$ -catenin (CTNNB1). This leads to  $\beta$ -catenin stabilization and nuclear localization followed by gene expression.

Although our sample size was limited, considering the large gene panel evaluated as well as the fact that samples were freshly collected, our results bring novelty to the field of fibro-osseous lesion pathobiology. In conclusion, the search for a targeted panel of hotspot mutations in 50 genes was unable to detect the underlining genetic basis of the disease. However, the present work provides evidence of Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway deregulation in COF.

#### **ACKNOWLEDGEMENTS**

This work was supported the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) and Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil. R.S.G., C.C.G., and S.F.S. are research fellows at CNPq. M.G.D. is a research fellow at CAPES. We thank the Genomics Multi-user Laboratory (Centro de Laboratórios Multiusuários, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais) for technical support on next-generation sequencing.

**REFERENCES**

1. Slootweg PJ, El-Mofty SK. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *WHO Classification of Tumour*. Lyon: IARC Press; 2005:319-320. doi:10.1016/j.urology.2004.09.048.
2. Ojo MA, Omoregie OF, Altini M, Coleman H. A clinico-pathologic review of 56 cases of ossifying fibroma of the jaws with emphasis on the histomorphologic variations. *Niger J Clin Pract*. 2014;17(5):619-623. doi:10.4103/1119-3077.141429.
3. Chang CC, Hung HY, Chang JYF, et al. Central ossifying fibroma: A clinicopathologic study of 28 cases. *J Formos Med Assoc*. 2008;107(4):288-294. doi:10.1016/S0929-6646(08)60089-3.
4. El-Mofty S. Psammomatoid and trabecular juvenile ossifying fibroma of the craniofacial skeleton: Two distinct clinicopathologic entities. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93(3):296-304. doi:10.1067/moe.2002.121545.
5. de Mesquita Netto AC, Gomez RS, Diniz MG, et al. Assessing the contribution of HRPT2 to the pathogenesis of jaw fibrous dysplasia, ossifying fibroma, and osteosarcoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;115(3):359-367. doi:10.1016/j.oooo.2012.11.015.
6. Masi G, Iacobone M, Sinigaglia A, et al. Characterization of a new CDC73 missense mutation that impairs Parafibromin expression and nucleolar localization. *PLoS One*. 2014;9(5):e97994. doi:10.1371/journal.pone.0097994.
7. Mosimann C, Hausmann G, Basler K. Parafibromin/Hyrax Activates Wnt/Wg Target Gene Transcription by Direct Association with  $\beta$ -catenin/Armadillo. *Cell*. 2006;125(2):327-341. doi:10.1016/j.cell.2006.01.053.

8. Li N, Zhong M, Song M. Expression of phosphorylated mTOR and its regulatory protein is related to biological behaviors of ameloblastoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(7):660-667.
9. Chen J, Lan Y, Baek JA, Gao Y, Jiang R. Wnt/beta-catenin signaling plays an essential role in activation of odontogenic mesenchyme during early tooth development. *Dev Biol.* 2009;334(1):174-185. doi:10.1016/j.ydbio.2009.07.015.
10. Pai P, Rachagani S, Dhawan P, Batra SK. Mucins and Wnt/ $\beta$ -catenin signaling in gastrointestinal cancers: An unholy nexus. *Carcinogenesis.* 2015;37(3):223-232. doi:10.1093/carcin/bgw005.
11. Finch PW, He X, Kelley MJ, et al. Purification and molecular cloning of a secreted, Frizzled-related antagonist of Wnt action. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997;94(13):6770-6775. doi:10.1073/pnas.94.13.6770.
12. Glinka A, Wu W, Delius H, Monaghan AP, Blumenstock C, Niehrs C. Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction. *Nature.* 1998;391(6665):357-362. doi:10.1038/34848.
13. Hsieh JC, Kodjabachian L, Rebbert ML, et al. A new secreted protein that binds to Wnt proteins and inhibits their activities. *Nature.* 1999;398(April):431-436. doi:10.1038/18899.
14. Li VSW, Ng SS, Boersema PJ, et al. Wnt Signaling through Inhibition of  $\beta$ -Catenin Degradation in an Intact Axin1 Complex. *Cell.* 2012;149(6):1245-1256. doi:10.1016/j.cell.2012.05.002.
15. Levanon D, Goldstein RE, Bernstein Y, et al. Transcriptional repression by AML1 and LEF-1 is mediated by the TLE/Groucho corepressors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(20):11590-11595. doi:10.1073/pnas.95.20.11590.
16. Huber O, Korn R, McLaughlin J, Ohsugi M, Herrmann BG, Kemler R. Nuclear

- localization of beta-catenin by interaction with transcription factor LEF-1. *Mech Dev.* 1996;59(1):3-10. doi:0925477396005977 [pii].
17. Horvai A, Jordan R. Fibro-Osseous Lesions of the Craniofacial Bones:  $\beta$ -Catenin Immunohistochemical Analysis and CTNNB1 and APC Mutation Analysis. *Head Neck Pathol.* 2014;8(3):291-297. doi:10.1007/s12105-014-0535-7.
  18. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. 4th ed. (El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, eds.). World Health Organization; 2017.
  19. Thorvaldsdóttir H, Robinson JT, Mesirov JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. *Brief Bioinform.* 2013;14(2):178-192. doi:10.1093/bib/bbs017.
  20. Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, et al. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol.* 2002;3(7):RESEARCH0034. doi:10.1186/gb-2002-3-7-research0034.
  21. Herr P, Hausmann G, Basler K. WNT secretion and signaling in human disease. *Trends Mol Med.* 2012;18(8):483-493. doi:10.1016/j.molmed.2012.06.008.
  22. Song L, Liu M, Ono N, Bringhurst FR, Kronenberg HM, Guo J. Loss of wnt/??-catenin signaling causes cell fate shift of preosteoblasts from osteoblasts to adipocytes. *J Bone Miner Res.* 2012;27(11):2344-2358. doi:10.1002/jbmr.1694.
  23. Regard JB, Cherman N, Palmer D, et al. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling is differentially regulated by G $\alpha$  proteins and contributes to fibrous dysplasia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011;108(50):20101-20106. doi:10.1073/pnas.1114656108.
  24. Qiu W, Schönleben F, Li X, et al. PIK3CA mutations in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2006;12(5):1441-1446. doi:10.1158/1078-0432.CCR-05-2173.

25. Bachman KE, Argani P, Samuels Y, et al. The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers. *Cancer Biol Ther.* 2004;3(8):772-775. doi:10.4161/cbt.3.8.994.
26. Choy E, Hornicek F, MacConaill L, et al. High-throughput genotyping in osteosarcoma identifies multiple mutations in phosphoinositide-3-kinase and other oncogenes. *Cancer.* 2012;118(11):2905-2914. doi:10.1002/cncr.26617.
27. Müller CI, Miller CW, Hofmann WK, et al. Rare mutations of the PIK3CA gene in malignancies of the hematopoietic system as well as endometrium, ovary, prostate and osteosarcomas, and discovery of a PIK3CA pseudogene. *Leuk Res.* 2007;31(1):27-32. doi:10.1016/j.leukres.2006.04.011.
28. Brown NA, Rolland D, McHugh JB, et al. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res.* 2014;20(21):5517-5526. doi:10.1158/1078-0432.CCR-14-1069.
29. Dean M, Park M, Le Beau MM, et al. The human met oncogene is related to the tyrosine kinase oncogenes. *Nature.* 1985;318(6044):385-388. doi:10.1038/318385a0.
30. Gray MJ, Kannu P, Sharma S, et al. Mutations Preventing Regulated Exon Skipping in MET Cause Osteofibrous Dysplasia. *Am J Hum Genet.* 2015;97(6):837-847. doi:10.1016/j.ajhg.2015.11.001.
31. Komiya Y, Habas R. Wnt signal transduction pathways. *Organogenesis.* 2008;4(2):68-75. doi:10.4161/org.4.2.5851.
32. Mikels AJ, Nusse R. Purified Wnt5a protein activates or inhibits  $\beta$ -catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS Biol.* 2006;4(4):570-582. doi:10.1371/journal.pbio.0040115.
33. Zhou R, Yuan Z, Liiu J, Liu J. Calcitonin gene-related peptide promotes the expression of osteoblastic genes and activates the WNT signal transduction pathway in bone

- marrow stromal stem cells. *Mol Med Rep.* 2016;13(6):4689-4696. doi:10.3892/mmr.2016.5117.
34. Haraguchi R, Kitazawa R, Mori K, et al. sFRP4-dependent Wnt signal modulation is critical for bone remodeling during postnatal development and age-related bone loss. *Sci Rep.* 2016;6(April):25198. doi:10.1038/srep25198.
35. Brazier H, Stephens S, Ory S, Fort P, Morrison N, Blangy A. Expression profile of RhoGTPases and RhoGEFs during RANKL-stimulated osteoclastogenesis: identification of essential genes in osteoclasts. *J Bone Miner Res.* 2006;21(9):1387-1398. doi:10.1359/jbmr.060613.
36. Brazier H, Pawlak G, Vives V, Blangy A. The Rho GTPase Wrch1 regulates osteoclast precursor adhesion and migration. *Int J Biochem Cell Biol.* 2009;41(6):1391-1401. doi:10.1016/j.biocel.2008.12.007.
37. Du X, Yang J, Yang D, Tian W, Zhu Z. The genetic basis for inactivation of Wnt pathway in human osteosarcoma. *BMC Cancer.* 2014;14(1):450. doi:10.1186/1471-2407-14-450.
38. Angonin D, van Raay TJ. Nkd1 Functions as a Passive Antagonist of Wnt Signaling. *PLoS One.* 2013;8(8):1-9. doi:10.1371/journal.pone.0074666.
39. Larraguibel J, Weiss ARE, Pasula DJ, Dhaliwal RS, Kondra R, Van Raay TJ. Wnt ligand-dependent activation of the negative feedback regulator Nkd1. *Mol Biol Cell.* 2015;26(12):2375-2384. doi:10.1091/mbc.E14-12-1648.

## APÊNDICE C – Termos de Consentimento e Assentimento Livre e Esclarecido

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a indivíduos maiores de 18 anos)

Esse documento tem como finalidade propor a sua participação no projeto de pesquisa “ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS”. A displasia fibrosa e o fibroma ossificante são classificados como lesões fibro-ósseas benignas que acometem os ossos craniofaciais e o esqueleto, podendo causar aumento de volume e prejudicar a estética e a qualidade de vida do indivíduo. As coletas de fragmentos da lesão serão realizadas em uma única sessão durante o procedimento cirúrgico necessário para o diagnóstico e não irão interferir no seu tratamento odontológico.

Este estudo não oferecerá riscos a sua saúde, sendo que não serão realizados procedimentos adicionais aos indicados e necessários para realização do diagnóstico da sua doença. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível elucidar aspectos moleculares sobre a biologia da displasia fibrosa e do fibroma ossificante.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. Não haverá custos ou ressarcimentos para você. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o seu anonimato.

#### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de fragmentos da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_ Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N.º: \_\_\_\_\_

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584>

Thaís dos Santos Fontes Pereira  
Cel: (31) 99077472; e-mail: [thaissfp@hotmail.com](mailto:thaissfp@hotmail.com)  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947>

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).

Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG ,  
CEP: 31270-901, no telefone (31) 3409 4592 – [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br).



## TERMO DE ASSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a menores e/ou legalmente incapazes)

Esse documento tem como objetivo convidar você a participar do projeto de pesquisa “ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS”. Nós pedimos aos seus pais para que você participe, mas você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu e não terá nenhum problema se desistir.

A displasia fibrosa e o fibroma ossificante são classificados como lesões fibro-ósseas benignas que ocorrem na região da cabeça e no esqueleto, podendo causar aumento de volume e prejudicar a estética e a qualidade de vida do indivíduo. Iremos coletar um pequeno pedaço da lesão em uma única sessão durante a cirurgia necessária para o diagnóstico, sem interferir no seu tratamento odontológico.

Este estudo não oferecerá mais riscos para você, além dos riscos da própria cirurgia e aqueles relacionados ao sentimento de ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo e nem você vai receber nada para participar. Não serão realizados procedimentos adicionais aos indicados e necessários para realização do diagnóstico da sua doença. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor o que leva ao desenvolvimento das lesões fibro-ósseas benignas, e isso será importante para que possamos conduzir o tratamento da doença no futuro.

Você tem o direito de desistir a qualquer momento e isso não vai mudar em nada o seu tratamento. Você receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, ninguém vai saber que você está participando e não falaremos a outras pessoas. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar ninguém que participou da pesquisa.

### Termo de Assentimento Livre e Esclarecido

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a realização das coletas de fragmentos da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N.º: \_\_\_\_\_

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584>

Thaís dos Santos Fontes Pereira  
Cel: (31) 99077472; e-mail: [thaissfp@hotmail.com](mailto:thaissfp@hotmail.com)  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947>

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).  
Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG ,  
CEP: 31270-901), no telefone (31) 3409 4592 – [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br).

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a responsável por menores de idade (inferior a 6 anos))

Esse documento tem como finalidade propor a participação do seu filho(a) no projeto de pesquisa “ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS”. A displasia fibrosa e o fibroma ossificante são classificados como lesões fibro-ósseas benignas que acometem os ossos craniofaciais e o esqueleto, podendo causar aumento de volume e prejudicar a estética e a qualidade de vida do indivíduo. As coletas de fragmentos da lesão serão realizadas em uma única sessão durante o procedimento cirúrgico necessário para o diagnóstico e não irão interferir no tratamento odontológico do seu filho(a).

Este estudo não oferecerá riscos a saúde do seu filho(a), além dos riscos da própria cirurgia e aqueles relacionados ao sentimento de ansiedade de participar de um projeto de pesquisa, sendo que não serão realizados procedimentos adicionais aos indicados e necessários para realização do diagnóstico da sua doença. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível elucidar aspectos moleculares sobre a biologia da displasia fibrosa e do fibroma ossificante.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do tratamento. Não haverá custos ou ressarcimentos. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o anonimato do participante.

### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de fragmentos da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N.º: \_\_\_\_\_

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584>

Thaís dos Santos Fontes Pereira  
Cel: (31) 99077472; e-mail: [thaissfp@hotmail.com](mailto:thaissfp@hotmail.com)  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947>

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).

Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG ,  
CEP: 31270-901, no telefone (31) 3409 4592 – [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br).

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a responsável por menores de idade (7 a 12 anos))

Esse documento tem como finalidade propor a participação do seu filho(a) no projeto de pesquisa "ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS". A displasia fibrosa e o fibroma ossificante são classificados como lesões fibro-ósseas benignas que acometem os ossos craniofaciais e o esqueleto, podendo causar aumento de volume e prejudicar a estética e a qualidade de vida do indivíduo. As coletas de fragmentos da lesão serão realizadas em uma única sessão durante o procedimento cirúrgico necessário para o diagnóstico e não irão interferir no tratamento odontológico do seu filho(a).

Este estudo não oferecerá riscos a saúde do seu filho(a), além dos riscos da própria cirurgia e aqueles relacionados ao sentimento de ansiedade de participar de um projeto de pesquisa, sendo que não serão realizados procedimentos adicionais aos indicados e necessários para realização do diagnóstico da sua doença. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível elucidar aspectos moleculares sobre a biologia da displasia fibrosa e do fibroma ossificante.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do tratamento. Não haverá custos ou ressarcimentos. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o anonimato do participante.

### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de fragmentos da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N.º: \_\_\_\_\_

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584>

Thaís dos Santos Fontes Pereira  
Cel: (31) 99077472; e-mail: [thaissfp@hotmail.com](mailto:thaissfp@hotmail.com)  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947>

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).

Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG ,  
CEP: 31270-901, no telefone (31) 3409 4592 – [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br).

## TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(Destinado a responsável por adolescentes (14 a 18 anos))

Esse documento tem como finalidade propor a participação do seu filho(a) no projeto de pesquisa “ANÁLISE MOLECULAR DAS LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS”. A displasia fibrosa e o fibroma ossificante são classificados como lesões fibro-ósseas benignas que acometem os ossos craniofaciais e o esqueleto, podendo causar aumento de volume e prejudicar a estética e a qualidade de vida do indivíduo. As coletas de fragmentos da lesão serão realizadas em uma única sessão durante o procedimento cirúrgico necessário para o diagnóstico e não irão interferir no tratamento odontológico do seu filho(a).

Este estudo não oferecerá riscos a saúde do seu filho(a), além dos riscos da própria cirurgia e aqueles relacionados ao sentimento de ansiedade de participar de um projeto de pesquisa, sendo que não serão realizados procedimentos adicionais aos indicados e necessários para realização do diagnóstico da sua doença. O material utilizado será estéril e descartável, impedindo contaminações. Quanto aos benefícios, será possível elucidar aspectos moleculares sobre a biologia da displasia fibrosa e do fibroma ossificante.

Durante qualquer etapa do projeto de pesquisa o participante tem o direito de desistir e não sofrerá nenhuma penalização nem serão interrompidos os procedimentos necessários para o término do tratamento. Não haverá custos ou ressarcimentos. O voluntário receberá uma cópia deste termo onde consta o telefone/e-mail do pesquisador responsável, podendo tirar as suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento. Os dados coletados serão utilizados com finalidade de pesquisa e ensino, garantindo o anonimato do participante.

### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a realização das coletas de fragmentos da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento.

Local: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N.º: \_\_\_\_\_

Principal: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/5760422122697584>

Thaís dos Santos Fontes Pereira  
Cel: (31) 99077472; e-mail: [thaissfp@hotmail.com](mailto:thaissfp@hotmail.com)  
Lattes: <http://lattes.cnpq.br/6707228592699947>

Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP).

Av Presidente Antônio Carlos, 6627 – Unidade administrativa II, 2º Andar, Sala 2005- Belo Horizonte – MG ,  
CEP: 31270-901, no telefone (31) 3409 4592 – [coep@prpq.ufmg.br](mailto:coep@prpq.ufmg.br).

## APÊNDICE D - Atividades desenvolvidas durante o doutorado

Disciplinas cursadas:

Período	Nome Atividade	Tipo Mat	Freq	Nota	Conc	Sit Final	Créd	Integr ?
2014/2	PESQUISA EM PATOLOGIA BUCAL I		S	100	A	A	06	Sim
2014/2	ESTAGIO DOCENTE I		S	100	A	A	03	Sim
2015/1	PESQUISA EM PATOLOGIA BUCAL II		S	100	A	A	06	Sim
2015/1	BIOESTAT. APL. À PESQ. ODONTOLÓGICA II		S	92	A	A	04	Sim
2015/1	EPIDEMIOLOGIA II		S	92	A	A	03	Sim
2015/2	TOPICOS AVANÇADOS EM MEDICINA MOLECULAR	E	S	90	A	A	02	Não
2015/2	ESTAGIO DOCENTE II		S	100	A	A	3	Sim
2015/2	SEMINARIOS DE PESQ. EM ODONTOLOGIA IV		S	100	A	A	03	Sim
2015/2	CIENCIAS SOCIAIS ARTICULADAS					4	2	Sim
2016/1	SEMINARIOS DE PESQ. EM ODONTOLOGIA III		S	100	A	A	03	Sim
2016/1	EXAME DE QUALIFICAÇÃO					A	0	Sim

Tipo Mat: Tipo de Matrícula: Normal ou Eletiva

Freq: Frequência

Conc: Conceito

Sit Final: Situação Final na Atividade

A: Aprovado

S: Suficiente

4: Dispensa

Créd: Número de créditos atribuídos

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

<b>Integralização (Créditos em Atividades Acadêmicas)</b>	
Exigidos	31
Cursados/Dispensados	35
Aproveitamento de Créditos	00
Utilizados para Integralização	31
Em Curso	00
Situação Curricular	INTEGRALIZADO

**Cursos:**

Treinamento Operacional e de Aplicações na Plataforma Ion Torrent PGM realizado de 17 a 19 de março de 2015, por Life Technologies (São Paulo, Brasil), na Faculdade de Odontologia da UFMG.

**Participação de eventos:**

XVIII Congresso da Sociedade Brasileira de Transplante de Medula Óssea, 2014 - Belo Horizonte, MG.

V Reunião Brasileira de Patologia Oral Digital, Universidade Federal de Pernambuco, 2015 - Recife, PE.

42º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral, 2016 – Manaus, AM.

**Bancas julgadoras e examinadoras:**

Banca examinadora do Trabalho de Conclusão de Curso, intitulado ABORDAGEM CLÍNICA DO PACIENTE COM ESTOMATITE PROTÉTICA RELACIONADA À CANDIDÍASE, da estudante Luciana Maria de Oliveira Diniz, realizada em 16 de novembro de 2015, na Faculdade de Odontologia da UFMG.

## APÊNDICE E - Produção científica durante o doutorado

Artigos completos publicados em periódicos:

- Gomes NR, Diniz MG, Pereira TD, Estrela C, de Macedo Farias L, de Andrade BA, Gomes CC, Gomez RS. Actinomyces israelii in radicular cysts: a molecular study. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017 May;123(5):586-590. doi: 10.1016/j.oooo.2017.02.006. Epub 2017 Feb 21. PubMed PMID: 28302494.
- Pereira Tdos S, Pelinsari FC, Ruas BM, Avelar LP, da Fonseca VJ, de Abreu MH, Salomão UE, Lima AS, de Souza E Silva ME, Gomez RS. Postoperative complications after dental extraction in liver pretransplant patients. Spec Care Dentist. 2016 Sep;36(5):277-81. doi: 10.1111/scd.12179. Epub 2016 Apr 7. PubMed PMID: 27061180.
- Pereira TD, de Lacerda JC, Porto-Matias MD, de Jesus AO, Gomez RS, Mesquita RA. Desmoplastic fibroblastoma (collagenous fibroma) of the oral cavity. J Clin Exp Dent. 2016 Feb 1;8(1):e89-92. doi: 10.4317/jced.52605. eCollection 2016 Feb. PubMed PMID: 26855713; PubMed Central PMCID: PMC4739375.
- Gomes CC, de Sousa SF, de Menezes GH, Duarte AP, Pereira Tdos S, Moreira RG, de Castro WH, Villacis RA, Rogatto SR, Diniz MG, Gomez RS. Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. Oral Oncol. 2016 May;56:e3-5. doi: 10.1016/j.oraloncology.2016.03.001. Epub 2016 Mar 12. PubMed PMID: 26979257.
- Pereira Tdos S, Silva Alves Jde F, Gomes CC, Rocha do Nascimento A, Stoianoff MA, Gomez RS. Kinetics of oral colonization by Candida spp. during topical corticotherapy for oral lichen planus. J Oral Pathol Med. 2014 Sep;43(8):570-5. PubMed PMID: 25320748.
- Pelinsari FCM , Ruas BM, Pereira TSF, Resende RG, Campos-Pinto Jr AA, Souza e Silva ME, Gomez RS. Dental Extractions in Patients Prior to Stem

Cell Transplantation. Oral Health Dental Management. 2014 Nov 13(4):1144-6.

Artigos Aceito para publicação em periódicos:

- Pereira TDSF, Brito JAR, Guimarães ALS, Gomes CC, de Lacerda JCT, de Castro WH, Coimbra RS, Diniz MG, Gomez RS. MicroRNA profiling reveals dysregulated microRNAs and their target gene regulatory networks in cemento-ossifying fibroma. J Oral Pathol Med. 2017 Oct 15. doi: 10.1111/jop.12650.
- Pereira TDSF, Diniz MG, França JA, Moreira RG, Menezes GHF, Sousa SF, Castro WH, Gomes CC, Gomez RS. The Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is deregulated in cemento-ossifying fibromas. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2017 Nov 24. pii: S2212-4403(17)31107-0. doi: 10.1016/j.oooo.2017.10.004.

Artigos Submetidos para publicação em periódicos:

- Montalvany-Antonucci CC, Zicker MC, Macari S, Pereira TFS, Diniz IMA, Andrade I Jr, Ferreira AVM, Silva TA. High-refined carbohydrate diet promotes detrimental effects on alveolar bone and femur microarchitecture. Arch Oral Biol.
- de Sousa SF, Diniz MG, França JA, Fontes Pereira TDS, Moreira RG, Santos JND, Gomez RS, Gomes CC. Cancer genes mutation profiling in calcifying epithelial odontogenic tumour. J Clin Pathol.

Resumos publicados em Anais de eventos:

- PEREIRA, T. S. F.; ALVES, J. F. C. S.; STOIANOFF, M. A. R.; GOMES, C. C.; Gomez RS. Exfoliative cytology for *Candida spp.* Detection in patients with oral lichen planus and under topical corticotherapy. In: XXII Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral, 2014, Campina Grande. Abstracts of the XXII Brazilian Congress of Oral Medicine and Oral Pathology. Elsevier, 2014. v.120. p.e17 - e108



[<http://www.oooojournal.net/pb/assets/raw/Health%20Advance/journals/oooo/OOOO1137-1146.pdf>]