

ANA CAROLINA MESQUITA NETTO ROSALES

**ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *HRPT2* E *CICLINA*
D1 NA DISPLASIA FIBROSA, NO FIBROMA
OSSIFICANTE E NO OSTEOSARCOMA DOS
MAXILARES**

BELO HORIZONTE
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
2012

ANA CAROLINA MESQUITA NETTO ROSALES

ANÁLISE MOLECULAR DOS GENES *HRPT2* E *CICLINA D1* NA DISPLASIA FIBROSA, NO FIBROMA OSSIFICANTE E NO OSTEOSSARCOMA DOS MAXILARES

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Odontologia, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, para obtenção do Título de Doutor em Odontologia, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez
Co-orientadora: Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes

BELO HORIZONTE

2012

Dedico este trabalho ao Victor, meu marido, cujo amor é meu alimento e amparo, há mais do que eu tenho como lembrança, juntos estamos, até o fim dos tempos; Às minhas filhas, Natália e Mariana; À minha mãe Arminda e ao meu irmão Vítor, que sempre me incentivaram, ensinaram-me e permitiram-me alcançar mais um objetivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço em especial ao Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez pela orientação, dedicação e respeito: “ser um mestre inesquecível é formar seres humanos que farão diferença no mundo”; Em especial, também, à Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes, co-orientadora deste trabalho: obrigada por me ensinar o brilho da genética.

AGRADECIMENTOS

Ao **Prof. Dr. Evandro Neves Abdo**, diretor da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais.

Ao **Prof. Dr. Saul Martins de Paiva**, coordenador de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais.

À **Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira Aguiar**, coordenadora da Pós-Graduação em Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais.

À **CAPES**, coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Aos professores da área de Patologia Bucal e Estomatologia da Faculdade de Odontologia – Universidade Federal de Minas Gerais – **Profs. Drs. Maria Auxiliadora Vieira do Carmo, Maria Cássia Ferreira Aguiar, Ricardo Alves de Mesquita, Ricardo Santiago Gomez e Tarcília Aparecida da Silva**.

Aos funcionários e amigos da área de Patologia – **Heloísa Magalhães Visana, Maria Inês do Nascimento Ferreira e Daniele Ramalho**.

Em especial ao **Dr. Román Carlos Bregni** – “O aprendes a querer la espina o no aceptes rosas”.

Em especial ao **Prof. Dr. Ricardo Alves de Mesquita** – “A razão porque os rios e os mares recebem homenagem de centenas de córregos das montanhas é que eles se acham abaixo dos últimos. Desse modo, podem reinar sobre todos os córregos das montanhas. Por isso, o sábio desejando pairar acima dos homens, coloca-se abaixo deles; desejando estar adiante deles, coloca-se atrás deles”.

Às minhas amigas, colaboradoras, mestras na arte e técnicas laboratoriais – **Cláudia Maria Pereira, Lucyana Farias e Marina Gonçalves Diniz** – obrigada por compartilharem e me ensinarem aquilo que sabem.

Às minhas preciosas amigas – **Jeane de Fátima Correia Silva Alves e Juliana Massote Caldeira Brant** – “Os verdadeiros amigos são aqueles que entendem nossos pensamentos e sentimentos, mesmo quando não os expressamos por meio de palavras. São aqueles cuja companhia é suficiente para que se estabeleça logo um perfeito entrosamento de almas. São aqueles que aumentam a nossa capacidade, unindo a sua à nossa, e possibilita-nos realizar coisas que nós próprios julgamos impossíveis de serem realizadas”.

Aos meus queridos amigos – **João Artur Ricieri Brito e Thiago Fonseca** – “O valor das coisas não está no tempo que elas duram, mas, sim, na intensidade

com que acontecem. Por isso, existem momentos inesquecíveis, coisas inexplicáveis e pessoas incomparáveis”!

Aos amigos do Doutorado, Mestrado e Iniciação Científica – **Alessandra Pires Duarte, Aline Mendes Silva, Alfonso Gala Garcia, Carolina Marques Borges, Cíntia Silva Torres, Daniela Araújo Veloso, Denise Vieira Travassos, Érica Storck Cezário, Fabiana Santos Gonçalves, Marco Túlio de Freitas Ribeiro, Milene Aparecida Torres Saar Martins, Suelleng Maria Cunha Santos, Florença Abdanur Stefani, Fabrício Amaral, Fabrício Tinoco, Gefter Thiago Batista Correa, Fabiano Pereira Cardoso, Frederico Omar Gleber Netto, Renata Gonçalves, Vanessa Fátima Bernardes, Elizete Maria Rita Pereira, Telma Arão, Giovanna Souto, Aline Johann, Patrícia Caldeira, Débora Mourão, Paula Serelle, Paula Rocha, Marcela Rodrigues, Natalia Cardoso** – “Todos os homens têm medo, mas o bravo repele seu medo e avança, por vezes rumo à morte, mas sempre rumo à vitória” – obrigada pela força, amizade, momentos de sorrisos e boas gargalhadas durante e após as aulas e os experimentos laboratoriais!

À banca de qualificação – **Dra. Vanessa Fátima Bernardes e Prof. Dr. Fabrício Rezende do Amaral**, pelas valiosas sugestões feitas a este trabalho com o objetivo de engrandecê-lo.

A todas as pessoas que participaram, contribuindo para a realização deste trabalho, direta ou indiretamente, meu agradecimento.

EPÍGRAFE

“A grandeza não consiste em receber
honras, mas em merecê-las”

Aristóteles

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 1	Gráfico da porcentagem de células marcadas pelos anticorpos parafibromina e ciclina D1, das 43 amostras estudadas.	86
Gráfico 2	Gráfico da quantificação relativa (RQ) dos genes <i>HRPT2</i> e <i>ciclina D1</i> .	96
Figura 1	Esquema das técnicas realizadas neste estudo.	58
Figura 2	Esquema de primers utilizados no PCR do gene <i>HRPT2</i> dos exons 1 ao 17.	70
Figura 3	Gel de poliacrilamida a 10% com os produtos de amplificação do fragmento do primer 1 (exon 1-7) de 613 pb do gene <i>HRPT2</i> .	71
Figura 4	Gel de poliacrilamida a 10% com os produtos de amplificação do fragmento do primer 2 (exon 5-12) de 693 pb do gene <i>HRPT2</i> .	72
Figura 5	Gel de poliacrilamida a 10% com os produtos de amplificação do fragmento do primer 3 (exon 10-17) de 797 pb do gene <i>HRPT2</i> .	72
Figura 6	Eficiência de amplificação de aproximadamente 100% do gene endógeno <i>β-actina</i> e do gene alvo <i>ciclina D1</i> com diluições seriadas (1:10).	76
Figura 7	Eficiência de amplificação de aproximadamente 100% do gene endógeno <i>β-actina</i> e do gene alvo <i>HRPT2</i> com	77

diluições seriadas (1:10).

Figura 8	Ideograma do cromossomo 1.	81
Figura 9	Padrão imunoistoquímico da parafibromina e ciclina.	88
Figura 10	Resultados representativos da perda de heterozigosidade (LOH) na região 1q25.3 do gene <i>HRPT2</i> .	91
Figura 11	Eletroferograma do tumor primário e sua recidiva, mostrando a deleção c.70delG, no exon 1, do gene <i>HRPT2</i>	93

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Distribuição da amostra estudada.	63
Tabela 2	Anticorpos utilizados para imunistoquímica, com respectivas diluições, soluções de recuperação antigênica e controles positivos utilizados.	65
Tabela 3	Sequência de primers utilizados no PCR do gene <i>HRPT2</i> dos exons 1 a 17.	70
Tabela 4	Sequência de primers utilizados no qPCR do gene <i>HRPT2</i> e do gene <i>Ciclina D1</i> .	75
Tabela 5	Marcadores microsatélites.	81
Tabela 6	Resultados da expressão imunistoquímica das proteínas parafibromina e ciclina D1, em percentual de núcleos positivos.	87
Tabela 7	Resultados da análise de perda de heterozigosidade (LOH) na região 1q25.3 do gene <i>HRPT2</i> das amostras de tecido fresco.	90
Tabela 8	Tradução do gene <i>HRPT2</i> e mutação non-sense encontrada no FO (caso 07) e sua recidiva (caso 08*).	93
Tabela 9	Resultados da análise de transcrição do mRNA dos genes <i>ciclina D1</i> e <i>HRPT2</i> das amostras de tecido fresco.	95

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AMPC: adenosina monofosfato cíclico;

ATG: códon;

CCND1: gene da *ciclina D1*;

Cdc73p: cell division cycle protein;

CDK: quinase dependente de ciclina;

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementar;

CKI: inibidor de CDKs;

C-Terminal: carboxi-terminal;

Ct: threshold cycle;

DAB: diaminobenzidina;

DEPC: dietil-pirocarbonato;

DF: displasia fibrosa;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

DNase: desoxirribonuclease;

dNTPs: desoxi-nucleotídeos trifosfatados;

dTTP: desoxi-timidilato trifosfatado;

EDTA: ácido tetra etileno diamino;

FO: fibroma ossificante;

FOJ: fibroma ossificante juvenile;

g: gravidade;

G1: gap 1;

G2: gap 2;

GNAS 1: guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha stimulating;

HPT: hiperparatireoidismo;

HPT-TM: hiperparatireoidismo – tumores dos maxilares;

HPFI: hiperparatireoidismo familiar isolado;

HRPT2: hiperparatireoidismo tipo 2;

IHQ: imunoistoquímica;

Kb: quilo base;

LSAB: complexo streptavidina biotina peroxidase;

LOH: loss of heterozygosity;

M: mitose;

Mb: megabytes;

MDM2: murine double minute 2;

MEN 1: neoplasia endócrina múltipla do tipo 1;

mg: miligramas;

MgCl₂: cloreto de magnésio;

ml: mililitros;

mM ou mmol: milimolar;

MP: monopartite;

mRNA: ácido ribonucleico mensageiro;

n: número de casos;

ng: nanograma;

NLS: nuclear localization signal;

nm: nanômetro;

N-Terminal: amino-terminal;

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man;

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida;

PAF 1: peroxisome assembly factor 1;

pb: pares de base;

PCR: polymerase chain reaction;

qRT-PCR: quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction;

pH: potencial de hidrogênio;

pmol: picomol;

pRb: proteína do retinoblastoma;

RB: retinoblastoma;

RNA: ácido ribonucléico;

RNase: ribonuclease;

RT-PCR: reverse transcriptase - polymerase chain reaction;

S: síntese;

SS II RT: enzima SuperScript® II Reverse transcriptase;

sc: santa cruz;

TA: temperatura ambiente;

Taq: *Thermus aquaticus*;

TP53: tumor protein 53;

TRIS HCl: hidroximetil amino metano cloreto de hidrogênio;

U: unidade;

UFMG: Universidade Federal de Minas Gerais;

μm : micrômetro;

μM : micromolar;

μg : micrograma;

μl : microlitro;

v: voltagem;

W: watts;

yPAF1: yeast peroxisome assembly factor 1;

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO DA LITERATURA	26
2.1 Osteossarcoma	27
2.2 Lesões fibro-ósseas benignas	33
2.2.1 Displasia fibrosa.....	33
2.2.2 Fibroma ossificante.....	39
2.3 Gene <i>HRPT2</i>	44
2.4 Gene <i>CCND1</i> (<i>ciclina D1</i>)	52
3. OBJETIVOS	55
3.1 Objetivo geral.....	56
3.2 Objetivos específicos.....	56
4. MATERIAL E MÉTODOS	57
4.1 Fluxograma.....	58
4.2 Procedimentos éticos.....	59
4.3 Casuística.....	59
4.4 Critérios de elegibilidade e exclusão para o estudo.....	60
4.5 Coleta de dados.....	61
4.6 Análise imunoistoquímica.....	64
4.7 Análise molecular.....	66
4.7.1 Extração de RNA.....	66
4.7.2 Tratamento do RNA com DNase e transcrição reversa do RNA (síntese do cDNA).....	68
4.7.3 PCR do cDNA do gene <i>HRPT2</i> (reação em cadeia da polimerase –	

DNA complementar).....	69
4.7.4 Sequenciamento de DNA para avaliação de bandas inespecíficas observadas no produto de PCR.....	73
4.7.5 Quantificação da expressão gênica por meio de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR-Tempo Real).....	74
4.7.6 Extração de DNA a partir de tecido fresco.....	78
4.7.7 Extração de DNA a partir de material parafinado.....	79
4.7.8 Análise de Perda de Heterozigosidade.....	80
4.7.9 Análise Estatística.....	83
5. RESULTADOS.....	84
5.1 Descrição da amostra e resultados da expressão imunoistoquímica.....	85
5.2 Resultados da análise da perda de heterozigosidade (LOH).....	89
5.3 Resultados do sequenciamento direto do cDNA.....	92
5.4 Resultados da quantificação da transcrição gênica por meio de PCR em tempo real (qPCR-Tempo Real).....	94
6. DISCUSSÃO.....	98
7. CONCLUSÕES.....	104
REFERÊNCIAS.....	106
ANEXOS.....	128
APÊNDICES.....	130

RESUMO

A displasia fibrosa (DF), o fibroma ossificante (FO) e o osteossarcoma (OS) são considerados lesões ósseo-relacionadas, que possuem uma patogênese incerta. O gene *HRPT2* codifica uma proteína de 531 aminoácidos denominada parafibromina. Recentemente, foram descritas mutações no gene supressor de tumor *HRPT2* em FO. Neste estudo, pela primeira vez, foi levantada a hipótese se estas alterações também não poderiam participar da patogênese da DF e do OS, além dos FO. Em amostras de lesões ósseo-relacionadas, foram investigadas alterações no gene *HRPT2*/parafibromina em nível de DNA (por meio da análise da perda de heterozigosidade – LOH), do transcrito mRNA (por meio do RT-PCR, do sequenciamento direto e PCR quantitativo em tempo real) e da proteína (por meio de imunistoquímica). A LOH no *locus* 1q25.3 foi investigada utilizando os marcadores microssatélites D1S384 e D1S461. Além disso, já foi apontada, em estudos *in vitro*, uma propriedade antiproliferativa da parafibromina por meio da inibição da ciclina D1. Investigamos, nas lesões ósseo-relacionadas, a expressão da ciclina D1 por PCR quantitativo em tempo real e imunistoquímica. A LOH do gene *HRPT2* foi encontrada em diferentes lesões ósseas, como DF, FO e o OS, mas esta não está associada a alterações na transcrição do gene ou na expressão da proteína do gene. No entanto, a mutação no gene *HRPT2* foi encontrada somente em um caso de FO (lesão primária e recidiva). Essa mutação encontrada gerou uma proteína truncada; não obstante, esse evento não teve impacto no nível de transcrição dos genes estudados (*HRPT2* e *Ciclina D1*). Apesar de se ter observado correlação positiva entre a transcrição de mRNA de *HRPT2* e *ciclina D1*, essa correlação não foi observada entre a expressão imunistoquímica de

parafibromina e ciclina D. Concluindo, os resultados deste trabalho apontam, pois, que alterações no gene *HRPT2* podem ser detectadas tanto no FO quanto nas DF e OS, porém a mutação ou LOH deste gene não necessariamente tem um impacto sobre a transcrição de mRNA ou na expressão da proteína parafibromina no grupo de lesões estudadas.

Palavras-chave: *HRPT2*, ciclina D1, lesões fibro-ósseas, osteossarcoma, displasia fibrosa, fibroma ossificante e parafibromina.

ABSTRACT

Fibrous dysplasia (FD), ossifying fibroma (OF), and osteosarcoma (OS) are examples of bone-related lesions. Recent studies have already shown genetic alterations of the *HRPT2* tumor suppressor gene in sporadic and syndromic OF. The present study first sought to raise the hypothesis of whether or not similar alterations would in fact represent one of the underlying genetic alterations of both FD and OS. This study investigated alterations of the *HRPT2*/parafibromin at the DNA level (using the loss of heterozygosity analysis - LOH), at the mRNA level (through RT-PCR, direct sequencing, and qRT-PCR), and in proteins through immunohistochemistry(IHC) in a set of OF, FD, and OS cases. In vitro studies pointed toward the inhibition of cyclin D1 as a mechanism of *HRPT2* to produce antiproliferative effects. Thus, cyclin D1 expression through qRT-PCR and IHC was also investigated. LOH at 1q25.3 was assessed by using 2 microsatellite markers: D1S384 and D1S461. The LOH of *HRPT2* was found in 3 FD, 6 OF, and 2 OS cases. However, this did not prove to be associated with alterations in the mRNA transcription or protein expression of the gene. The *HRPT2* mutation was found only in the OF (primary and recurrent lesion). This mutation commonly leads to the formation of a truncated protein; however, in this case, it caused no alteration in the transcription of the *HRPT2* and *cyclin D1* genes. In addition, this study found a positive correlation between the mRNA transcription of *HRPT2* and *cyclin D1*, which was not observed between parafibromin and cyclin D1 protein immunostaining. In conclusion, this study's results emphasize that DNA alterations of the *HRPT2* gene can be detected in

OF as well as in FD and OS, but the mutation or LOH of this gene does not necessarily impact mRNA or protein expression.

Keywords: *HRPT2*, *Cyclin D1*, fibro-osseous lesions, osteosarcoma, fibrous dysplasia, ossifying fibroma, and parafibromin.

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O osteossarcoma (OS) é um tumor ósseo maligno que afeta mais frequentemente ossos longos (Huvos, 1991). A sua incidência em cabeça e pescoço é incomum, entretanto pode acometer mandíbula e maxila. A etiologia do OS é desconhecida, embora existam alguns fatores predisponentes, como a radioterapia, doença de Paget e retinoblastoma (Delgado *et al.*, 1994; Kaushik *et al.*, 2002; Junior *et al.*, 2003). Apesar de alguns casos de displasia fibrosa terem sido mencionados na literatura com sendo capazes de sofrer uma transformação maligna em osteossarcoma, não existe ainda uma evidência científica conclusiva que prove este fato. Isso porque, particularmente, nesses casos reportados, não foi mencionada a mutação do gene *GNAS-1* e, portanto, não foram mostrados todos os critérios de diagnóstico para a lesão de displasia fibrosa (Schwartz & Alpert, 1964; Doganavsargil *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011).

O termo lesões fibro-ósseas benignas é uma designação genérica para um grupo de lesões que são caracterizadas pela substituição do tecido ósseo normal por um tecido conjuntivo fibroso benigno, contendo quantidades variadas de material mineralizado. Apesar de não haver uma classificação satisfatória, aceita-se que lesões fibro-ósseas benignas na cavidade oral e maxilofacial podem ser divididas em três categorias, que incluem lesões de displasia fibrosa, fibroma ossificante e displasia óssea; em 2005, a Organização Mundial de Saúde classificou essas lesões como ósseo-relacionadas. Devido à similaridade histopatológica, o diagnóstico definitivo

requer a correlação entre as características clínicas, histopatológicas e radiográficas, e, muitas vezes, a análise de outros estudos de imagens e, até mesmo, achados transcirúrgicos.

O gene *HRPT2* é um supressor de tumor localizado no cromossomo 1q31.2, que codifica uma proteína de 531 aminoácidos, denominada parafibromina (Carpten *et al.*, 2002). A função específica dessa proteína é desconhecida; sabe-se que a porção C-terminal da parafibromina apresenta homologia parcial com uma proteína do fungo *Saccharomyces cerevisiae* intitulada Cdc73p (cell division cycle protein 73 homolog, MIM# 607393), (Carpten *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 1996), componente do complexo proteico PAF1 (peroxisome assembly factor 1) associado à RNA polimerase II (Porter *et al.*, 2002; Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2005; Yart *et al.*, 2005; Pokholok *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2008). No fungo (*yPAF1*) a parafibromina participa da metilação da histona H3 K9 induzindo a parada do ciclo celular na fase G1 (Farber *et al.*, 2010), durante a transcrição, diminuindo assim a quantidade de ciclina D1 (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2005; Woodard *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2010).

Alguns estudos demonstram que alterações no gene *HRPT2* estão relacionadas à síndrome do hiperparatiroidismo-tumores dos maxilares (HPT-TM), uma desordem autossômica dominante caracterizada por adenoma ou carcinoma de paratireoide, lesões fibro-ósseas da mandíbula e maxila (fibroma ossificante), tumores e cistos renais (Jackson *et al.*, 1990; Szabó *et al.*, 1995; Teh *et al.*, 1996; Haven *et al.*, 2000; Cavaco *et al.*, 2001; Carpten *et al.*, 2002;

Howell *et al.*, 2003; Shattuck *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2005; Bradley *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2007; Reikik *et al.*, 2010).

Um trabalho recente descreveu mutações do gene *HRPT2* em fibromas ossificantes esporádicos e sugeriu que fibromas ossificantes podem surgir devido à haploinsuficiência do gene *HRPT2* (Pimenta *et al.*, 2006). O modelo da haploinsuficiência, para explicar a carcinogênese, baseia-se em estudos que demonstraram a ocorrência de câncer por alteração de genes supressores tumorais, mesmo nisso estando presente somente um dos alelos mutado. O alelo selvagem (*Wt*) não sobrepõe o efeito do alelo mutado, quer seja por produção de proteína em níveis insuficientes, quer seja por um efeito dominante negativo, no qual o alelo mutado bloqueia a atividade da proteína normal (Berger *et al.*, 2011). O defeito na expressão de um alelo contribui para a formação de tumor por conferir vantagem proliferativa à célula (por mutação nos genes *gatekeepers*) ou por causar instabilidade genética (por mutação nos genes *caretakers*). Ademais, a haploinsuficiência não resulta diretamente um determinado fenótipo neoplásico, necessitando, para isso, de outros eventos promotores de tumor, como mutação oncogênica, alteração de outro gene supressor tumoral ou alterações epigenéticas.

Diante da hipótese de que alterações neste gene também estão envolvidas na patogênese de outras lesões ósseas dos ossos maxilares, a transcrição do gene *HRPT2* e a expressão de sua proteína foram avaliadas e comparadas no osteossarcoma, no fibroma ossificante convencional e juvenil e na displasia fibrosa. Como previamente foi descrita uma inibição da ciclina D1 pela ação da

parafibromina, investigou-se, ainda, a associação entre os níveis de mRNA e proteínas ciclina D1 e parafibromina.

Ademais, este estudo depara com a necessidade de desenvolvimento e definição de novos marcadores genéticos úteis no diagnóstico diferencial das lesões ósseo-relacionadas. Além disso, este estudo busca avaliar a associação entre a alteração no DNA com a transcrição do mRNA a fim de explorar melhor o genótipo-fenótipo associado ao gene *HRPT2*.

Todas as etapas deste trabalho estão descritas detalhadamente nesta tese, e o artigo elaborado, a partir deste estudo, está no apêndice deste.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 OSTEOSSARCOMA

Os sarcomas são neoplasias malignas raras e que compreendem menos de 1% de todos os cânceres. Destes somente cerca de 5-15% estão localizados em cabeça e pescoço (Patel *et al.*, 2001). Os sarcomas de cabeça e pescoço possuem um amplo espectro de subtipos histológicos e sítios de origem, porém esses são agrupados conjuntamente devido às suas similaridades em relação à sua apresentação clínica, fatores de prognóstico e tecido mesenquimal (Patel *et al.*, 2001; Mucke *et al.*, 2010).

A etiologia do osteossarcoma (OS) é desconhecida, contudo existem alguns fatores predisponentes, como radioterapia, doença de Paget, retinoblastoma (Delgado *et al.*, 1994; Kaushik *et al.*, 2002; Junior *et al.*, 2003). Apesar de alguns casos de displasia fibrosa terem sido previamente mencionados na literatura como sendo capazes de desenvolver uma transformação maligna em osteossarcoma, não existe uma evidência científica conclusiva para provar esse fato.

Segundo Unni & Dahlin (1989), o tecido ósseo está frequentemente presente no campo de irradiação no tratamento das neoplasias e isso favorece ao desenvolvimento de sarcomas. O período entre o tratamento radioterápico e o desenvolvimento de um tumor varia em média aproximadamente 13 anos, sendo esses tumores, geralmente, de alto grau de malignidade.

O OS é um tumor ósseo maligno e que afeta mais frequentemente ossos longos (distal do fêmur e proximal da tíbia) de pessoas jovens com uma idade média que atinge a segunda década de vida (Huvos, 1991). A incidência desse tumor em cabeça e pescoço é incomum, correspondendo a aproximadamente 10% de todos OS. Quando em ossos maxilares, a idade média desses pacientes está entre a 3^a e 4^a décadas de vida (Delgado *et al.*, 1994; Mardinger *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2007). Em alguns casos, após história de radiação ou doença de Paget, a idade média dos pacientes é mais elevada que em outros casos (Mark *et al.*, 1994).

Na região de cabeça e pescoço, os OS parecem afetar igualmente os dois gêneros (Ha *et al.*, 1999), embora alguns autores referem-se uma leve predileção pelo gênero masculino (Oda *et al.*, 1997).

O primeiro sinal clínico mais frequentemente encontrado em OS localizado em cabeça e pescoço é o aumento de volume local com ou sem a presença de dor (Garrington *et al.*, 1967). O aumento de volume em região facial pode ser percebido primeiramente pelos pacientes uma vez que o isso causa alterações estéticas e funcionais (Mardinger *et al.*, 2001); abaulamento dos dentes, parestesia, obstrução nasal e ulceração também podem ser observados (Junior *et al.*, 2003); os sinais e sintomas menos frequentes são febre, perda de peso e exoftalmia (Tanzawa *et al.*, 1991). Apesar de ser considerado um tumor agressivo de rápido desenvolvimento, alguns OS apresentam crescimento lento, no qual os pacientes descrevem um tempo de evolução mais longo

(Mardinger *et al.*, 2001). Os principais ossos acometidos pelo OS na região de cabeça e pescoço são a maxila e a mandíbula (Vege *et al.*, 1991), com uma divergência de opinião entre os autores sobre o sítio de predileção desse tumor (Tanzawa *et al.*, 1991; Wanebo *et al.*, 1992; Mardinger *et al.*, 2001).

Radiograficamente, o OS pode variar de uma radiopacidade densa a uma lesão mescladamente radiopaca e radiotransparente, ou ainda ter um aspecto completamente radiotransparente. Os limites da lesão normalmente são mal definidos e indistintos, tornando difícil determinar radiograficamente a extensão do tumor. Frequentemente há reabsorção das raízes dos dentes envolvidos pelo tumor, característica essa, muitas vezes, descrita como “reabsorção em pico”, resultado do estreitamento afunilado da raiz. A aparência radiográfica descrita de “raios de sol”, causada pela produção de osso osteofítico na superfície da lesão, sugere fortemente o diagnóstico de OS e pode ser percebida em cerca de 25% dos casos localizados em maxila e mandíbula (Delgado *et al.*, 1994; Mardinger *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2007). Esse aspecto radiográfico devido à reação periosteal também pode ser observado em casos de carcinoma metastático, mieloma múltiplo, sarcoma de Ewing avançado, tuberculose e osteomielite (High *et al.*, 1978; Petrikowski *et al.*, 1995). Dessa forma, esses diagnósticos diferenciais devem ser levados em consideração.

Histologicamente o OS pode ser caracterizado por um parênquima maligno e indiferenciado de células que são capazes de formar osteoide. A presença da formação de osteoide é essencial para o diagnóstico de OS (Delgado *et al.*,

1994; Mardinger *et al.*, 2001; Chindia, 2001). De acordo com a diferenciação histológica predominante, o OS pode ser classificado em tipo osteoblástico, condroblástico e fibroblástico. O tipo osteoblástico representa cerca de 50% dos OS e se caracteriza por apresentar células malignas atípicas, que produzem grande quantidade de osteoide. As células neoplásicas podem ser do tipo fusiformes, pequenas ou até mesmo com aparência epitelióide e raramente a matriz é madura e trabecular. O tipo condroblástico representa 25% dos OS e se caracteriza por apresentar predominantemente diferenciação condroide. As células com aspecto condroide têm uma atipia pronunciada e são arranjadas em lóbulos. Na periferia desses lóbulos, as células malignas se apresentam em camadas e usualmente há produção de osteoide. Ocasionalmente a formação de osteoide ocorre no centro do lóbulo. O tipo fibroblástico representa cerca de 25% dos OS e se caracteriza pela predominância e proliferação de células do tipo fusiforme malignas, assemelhando-se ao fibrossarcoma. A produção de osteoide é mínima e focal (Unni & Dahlin, 1989); existem outras classificações, as quais incluem os tipos telangiectásico, de pequenas células, de células gigantes e justacortical (Lanzkowski, 2000). Na região de cabeça e pescoço, o tipo condroblástico tem sido referido como predominante (Delgado *et al.*, 1994; Mardinger *et al.*, 2001). De acordo com o grau de malignidade, os OS podem ser classificados em baixo, intermediário ou alto (Garrington *et al.*, 1967; Junior *et al.*, 2003), sendo que em cabeça e pescoço o tumor de alto grau de malignidade é o mais encontrado (Mardinger *et al.*, 2001).

Os OS intra-ósseos de baixo grau de malignidade podem ser diagnosticados erroneamente como neoplasias benignas, sendo a displasia fibrosa a lesão mais comumente confundida com essa malignidade (Raubenhaimer & Noffke, 1998). Os pacientes que apresentam OS de baixo grau de malignidade, são geralmente adultos jovens. Os tumores radiograficamente se apresentam com característica de uma lesão benigna, sendo geralmente radiolúcidos com presença de osteoide. Microscopicamente pode ser observada uma pequena proliferação de células fusiformes com mínima atipia e escassas figuras de mitose. Este tumor é distinguido de uma lesão fibro-óssea pela presença de invasão da medula óssea e de tecidos moles extra-ósseos (Unni & Dahlin, 1989).

Em relação ao tratamento de OS de cabeça e pescoço, o principal é a ressecção cirúrgica radical com amplas margens de tecido ósseo e tecidos moles adjacentes (Delgado *et al.*, 1994; Laskar *et al.*, 2008). A associação de drogas neoadjuvantes e adjuvantes, em conjunto com o tratamento cirúrgico, demonstram uma melhor resposta na sobrevida dos pacientes com OS de extremidades (Pratt *et al.*, 1990). Contudo, as vantagens da quimioterapia e radioterapia para OS de cabeça e pescoço continuam obscuras devido ao pequeno número de casos estudados e publicados na literatura (Mark *et al.*, 1991; Junior *et al.*, 2003; Laskar *et al.*, 2008).

A causa mais frequente de falência no tratamento é a recidiva do tumor (Delgado *et al.*, 1994); metástases pulmonares à distância usualmente ocorrem em estágios bem avançados da doença (Wanebo *et al.*, 1992).

Alguns trabalhos sugerem que os marcadores imunohistoquímicos MDM2 e CDK4 podem ser utilizados nos cortes histológicos, para auxiliar no diagnóstico de um OS, e diferenciá-lo de outros sarcomas ou lesões fibro-ósseas benignas (Matsushime *et al.*, 1994; Dujardin *et al.*, 2011).

O desenvolvimento e a progressão de neoplasias malignas em humanos são caracterizados pelo acúmulo de alterações genéticas. Alterações em genes envolvidos no controle do ciclo celular têm sido associadas à patogênese de muitos tipos de tumor, incluindo os sarcomas (Hall & Peters, 1996; Bennett *et al.*, 2000). Um dos genes mais estudados e frequentemente relacionado à progressão de neoplasias malignas é o gene supressor de tumor *TP53* (Mousses *et al.*, 1996; Nigro *et al.*, 1989; Lopes *et al.*, 2001). Além do *TP53*, o gene *MDM2* (murine double minute 2) e o *CDK4* (kinase 4 dependente de ciclina) encontram-se alterados em diversos tumores, incluindo os OS (Matsushime *et al.*, 1994). A amplificação do gene *MDM2* tem sido associada à recorrência, metástase e progressão do OS do tipo paraosteal (Ladanyi *et al.*, 1993).

As investigações de alterações genéticas em tumores são importantes para entender o mecanismo de oncogênese, avaliar o comportamento biológico e, conseqüentemente, aperfeiçoar terapêuticas, favorecendo ao prognóstico (Lopes *et al.*, 2001).

2.2 LESÕES FIBRO-ÓSSEAS BENIGNAS

O termo lesões fibro-ósseas benignas é uma designação genérica para um grupo de lesões que são caracterizadas pela substituição do tecido ósseo normal por um tecido conjuntivo fibroso benigno, contendo quantidades variadas de material mineralizado na forma de osso imaturo ou de estruturas arredondadas acelulares semelhantes a cimento e que são indistinguíveis de cementículos (Slootweg, 1996). Apesar de não haver uma classificação satisfatória, aceita-se que lesões fibro-ósseas benignas na cavidade oral e maxilofacial podem ser divididas em três categorias, as quais incluem displasia fibrosa, fibroma ossificante e displasia óssea (Slootweg, 1996). Após um consenso da Organização Mundial de Saúde, em 2005, displasia fibrosa, fibroma ossificante e displasia óssea foram classificados no grupo de lesões ósseo-relacionadas (Slootweg & Mofty, 2005). Devido à similaridade histopatológica dessas lesões, o diagnóstico definitivo requer a correlação entre as características clínicas, histopatológicas, radiográficas e, muitas vezes, a análise de outros estudos de imagens e até mesmo achados transcirúrgicos (Meister *et al.*, 1973; Slootweg, 1996; Eversole *et al.*, 2008; Brannon & Fowler, 2001).

2.2.1 DISPLASIA FIBROSA

A displasia fibrosa (DF) é considerada uma lesão óssea de desenvolvimento e está relacionada a mutações *missense* pós-zigóticas no gene *GNAS 1*, que

está localizado no cromossomo 20q13 (Cohen & Howell, 1999). Essa lesão pode acometer um (monostótica) ou mais ossos (poliostótica).

A forma de DF poliostótica é relativamente rara, podendo envolver mais de 60% dos ossos do esqueleto, sendo os ossos craniofaciais os mais comumente afetados. A forma monostótica não é precursora da forma poliostótica (MacDonald-Jankowski, 2004). Indivíduos com DF que também apresentam pigmentação em pele (manchas cor de café com leite), puberdade precoce e uma variedade de outras anormalidades endócrinas, fazem parte da síndrome McCune-Albright (Costanzi & Velasco e Cruz, 2007). Essa síndrome afeta principalmente o gênero feminino (Speight & Carlos, 2006). Além da síndrome de McCune-Albright, outra está associada a DF: a síndrome de Mazabraud, que é caracterizada pela presença de DF e de mixomas intramusculares (Mazabraud *et al.*, 1967).

O envolvimento extenso de ossos do esqueleto pode levar à fratura óssea patológica, severa deformidade óssea, assimetria, além de cegueira (MacDonald-Jankowski, 2009).

A DF monostótica é a forma mais comumente encontrada e corresponde a cerca de 80% de todos os casos relatados (Brannon & Fowler, 2001; Speight & Carlos, 2006; MacDonald-Jankowski & Li, 2009). A DF dos maxilares, comumente incluída nesse grupo, não é estritamente monostótica, porque geralmente envolve um grupo de ossos contíguos, separado somente por suturas (maxila, esfenóide, zigomático frontonasal e base do esqueleto) e seria

mais bem descrita como DF craniofacial (Slootweg, 1996; Brannon & Fowler, 2001; MacDonald-Jankowski, 2004; Slootweg & Mofty, 2005).

A DF surge na primeira e segunda década de vida e clinicamente se caracteriza por apresentar aumento de volume sem limites precisos com crescimento lento e indolor, provocando uma considerável deformidade (Slootweg, 1996; Eversole *et al.*, 2008; Brannon & Fowler, 2001). A forma monostótica apresenta uma distribuição semelhante, porém a forma polioestótica da DF acomete mais usualmente pacientes do gênero feminino (Eversole *et al.*, 2008); as regiões de maxila e paranasal são mais frequentemente afetadas (Speight & Carlos, 2006). Alguns casos de DF monostótica são descobertos como achados incidentais durante exames radiográficos (DiCaprio & Enneking, 2005).

Radiograficamente a DF é caracterizada pela aparência de “vidro fosco”, que pode ser melhor observada em radiografias periapicais e oclusais. Um dos detalhes mais importantes na DF é a falta de nitidez dos limites radiográficos da lesão (MacDonald-Jankowski, 2004). As lesões iniciais são radiolúcidas e se tornam radiopacas ao longo dos anos devido a mineralização.

Não existe diferença histológica entre os três tipos de DF (monostótica, polioestótica e craniofacial). Histopatologicamente a DF consiste na substituição do tecido ósseo normal por um tecido conjuntivo fibroso celularizado composto por fibroblastos fusiformes dispostos em meio a quantidades moderadas de colágeno (Speight & Carlos, 2006). Nesse tecido se observam finas

ramificações curvilíneas de tecido ósseo jovem, que apresenta pouca evidência osteoblástica, produção mínima de osteoide e, por vezes, atividade osteoclástica. Uma característica que pode ajudar a distinguir a displasia fibrosa do fibroma ossificante, é que o tecido ósseo lesional na DF conflui imperceptivelmente com o tecido ósseo esponjoso adjacente ou com o osso cortical (MacDonald-Jankowski, 2004; Speight & Carlos, 2006). Além disso, na displasia fibrosa, o tecido conjuntivo fibroso apresenta uma celularidade monótona e o fino padrão de osso trabeculado se repete por todo o tecido lesional (Slootweg & Muller, 1990). Em DF mais antigas, o tecido ósseo pode ser do tipo lamelar com a presença de trabéculas ósseas arranjadas paralelamente entre si (Speight & Carlos, 2006). As trabéculas ósseas remanescentes e de formato irregular, muitas vezes, estão descritas na literatura como trabéculas ósseas semelhantes a caracteres chineses (Brannon & Fowler, 2001; MacDonald-Jankowski, 2004). Sendo assim, na análise de uma biópsia, recomenda-se que as margens da lesão e todo o padrão histológico descrito anteriormente sejam claramente observados, permitindo, assim, um diagnóstico histopatológico mais confiável desse tipo de lesão. Muitas vezes, fragmentos advindos de curetagem com finalidade de diagnóstico, não permitem que os patologistas distingam a DF de qualquer outra lesão fibro-óssea benigna (Speight & Carlos, 2006).

O tratamento cirúrgico da DF deve ser adiado o máximo possível, uma vez que estas lesões aparecem com uma pouca idade e tendem a se estabilizar após a maturação do esqueleto, ou seja, que ocorre por volta dos 15 anos de idade (Hart *et al.*, 2007). As lesões grandes que provocam grande assimetria facial e

deformidade, comprometendo, assim, a estética do paciente e compressão neural, requerem cirurgia para remodelamento ósseo (Chapulart RD, 2006; Saglik *et al.*, 2007). As drogas antiinflamatórias não-esteroidais e o paracetamol podem ser utilizados para controlar a dor (Chapulart & Orcel, 2008). O uso de bifosfonatos, como o pamidronato, para controle do crescimento da displasia fibrosa, tem sido discutido na literatura (Chapulart *et al.*, 2004; DiCaprio & Enneking, 2005; DiMeglio, 2007; Chapulart & Orcel, 2008; Mäkitie *et al.*, 2008). A dosagem e o tempo de utilização do medicamento foram decididos em analogia com tratamentos da doença de Paget (Liens *et al.*, 1994). Os suplementos de cálcio, vitamina D e fosfatase podem ser utilizados em casos nos quais o paciente apresenta evidência de osteomalacia (Chapulart & Orcel, 2008).

A radioterapia foi contra indicada, uma vez que esta foi considerada um fator de risco para transformação maligna dessa lesão em OS (Ruggieri *et al.*, 1994; Amin & Ling, 1995; Saglik *et al.*, 2007). Casos descritos na literatura relatam que os pacientes apresentavam um rápido aumento de volume acompanhado de sintomatologia dolorosa, em que o exame radiográfico evidenciava uma lesão expansiva, acometendo tecidos moles por meio do córtex. No entanto, não existe ainda uma evidência científica conclusiva que prove esse fato. Isso porque, particularmente, nesses casos reportados, não foi mencionada a mutação do gene GNAS-1 e, portanto, não foram mostrados todos os critérios de diagnóstico para a lesão de displasia fibrosa (Schwartz & Alpert, 1964; Doganavsargil *et al.*, 2009; Araújo *et al.*, 2011). Quando há mudança no comportamento clínico de uma lesão, recomenda-se o uso das técnicas de

imagem, como as ressonâncias magnéticas e tomografias, para auxiliar e sugerir qual o provável diagnóstico ou até mesmo confirmar a transformação maligna da DF (Chapulart & Orcel, 2008).

O gene *GNAS 1*, que está mutado na DF, codifica a subunidade- α da proteína G-estimulatória (Gs) e está localizado no cromossomo 20q13 (Levine *et al.*, 1991, Cohen & Howell, 1999, Chapulart & Orcel, 2008). As mutações ocorrem no códon 201, no qual um resíduo de arginina é substituído por histidina ou cisteína (Cohen & Howell, 1999; Bianco *et al.*, 2000). As mutações são pós-*zigóticas*, somáticas e resultam um mosaicismo celular (Eversole *et al.*, 2008). Mutações nesse gene levam ao aumento da produção de adenosina monofosfato cíclico (AMPc), o que afeta a proliferação e diferenciação de preosteoblastos, além de um aumento na reabsorção óssea (Cohen & Howell, 1999).

Como a doença se apresenta dentro de um grande espectro, DF monostótica, poliostótica e síndrome de Mc-Cune Albright, provavelmente a época em que a mutação ocorre determina o grau de severidade da doença (Shenker *et al.*, 1993; Spiegel, 1996; Cohen & Howell, 1999; Stanton *et al.*, 1999; Chapulart & Orcel, 2008; Eversole *et al.*, 2008). Na síndrome de Mc-Cune Albright, a mutação ocorre antes da fase de gastrulação, isto é, do processo de formação de dois dos três folhetos embrionários, a endoderme, a mesoderme e a ectoderme. As células ósseas derivam das duas camadas germinativas embriogênicas: mesoderma e ectoderma (Cohen & Howell, 1999).

A mutação do gene *GNAS 1* pode ser detectada nas células mononucleares, ósseas, melanócitos e endócrinas circulantes. A probabilidade de detecção é proporcional ao número de células mutadas e ao grau de severidade da doença (Cohen & Howell, 1999). A detecção da mutação pode ser útil por permitir que se estabeleça o diagnóstico e evitar, assim, a realização de uma biópsia óssea (Chapulart & Orcel, 2008).

Estudos anteriores não demonstraram a falta de mutação do gene *GNAS 1* no fibroma ossificante (Hasselblatt *et al.*, 2005; Toyosawa *et al.*, 2007). Recentemente, Patel *et al.* (2010) confirmaram, em seus estudos, a ausência da mutação do gene *GNAS 1*, na displasia cemento-óssea, e, também, no fibroma ossificante dos maxilares e sugeriram que essa diferença seria de grande utilidade para a distinção molecular entre essas lesões e a DF.

2.2.2 FIBROMA OSSIFICANTE

O fibroma ossificante (FO) é uma neoplasia benigna primariamente encontrada em mandíbula, composta tanto por tecido ósseo quanto por componente fibroso (Slootweg & Mofty, 2005). A sua terminologia tem sido confusa e problemática. Nos últimos anos, a classificação dos FO em cabeça e pescoço foi dividida em 3 grupos: fibroma ossificante (convencional), fibroma ossificante juvenil trabecular e fibroma ossificante juvenil psamomatoide (Slootweg, 1996; Brannon & Fowler 2001; El-Mofty 2002; Speight & Carlos, 2006).

O termo original mais utilizado para essa lesão foi fibroma cemento-ossificante, pelo fato de que a maioria das lesões encontradas estavam associadas a um

dente ou continham material calcificado esférico semelhante a cimento. Contudo, foi observado que lesões não associadas aos maxilares, particularmente na região sinonasal, na qual não há presença de cimento, frequentemente continham esse tipo de calcificações. A partir de então, a designação FO foi reconhecida como a mais apropriada (Brannon & Fowler, 2001; Reichert & Philipsen, 2004, Slootweg & Moft, 2005; Speight & Carlos, 2006).

Clinicamente o FO convencional é caracterizado por um aumento de volume lento, progressivo, expansivo e indolor. É encontrado na região periapical dos dentes, o que sugere uma provável origem odontogênica dessa lesão, mais precisamente dos tecidos do ligamento periodontal (Regezzi & Sciubba, 1999; Speight & Carlos, 2006). Essa lesão é mais comumente diagnosticada entre a 2ª e a 4ª décadas de vida, com uma leve predileção pela região posterior da mandíbula e por mulheres (Slootweg, 1996; Brannon & Fowler, 2001; Speight & Carlos, 2006; MacDonald-Jankowski & Li, 2009). A incidência de FO é mais alta em indivíduos melanodermas (Slootweg, 1996; Brannon & Fowler, 2001).

A variante fibroma ossificante juvenil (FOJ) surge fora da área periapical dental, podendo acometer tanto os maxilares quanto os ossos craniofaciais de pessoas jovens, geralmente antes dos 15 anos de idade, com uma tendência a ter um comportamento clínico mais agressivo (Speight & Carlos, 2006). Diante dessas diferenças, a origem dessa lesão foi bastante discutida e ficou estabelecido que todos os subtipos de FO possuem uma origem osteogênica, e não odontogênica, como se pensava (Slootweg & Moft, 2005); quando

acometem mandíbula, usualmente envolvem o ramo mandibular (Speight & Carlos, 2006). Os FOJ podem crescer rapidamente e acometer áreas relativamente irrestritas, como seios paranasais, região sinusal, órbita e base de crânio, resultando grandes tumores de difícil remoção cirúrgica (Sciubba & Younai, 1989; Gunaseelan *et al.*, 2007; Cruz *et al.*, 2008; MacDonald-Jankowski & Li, 2009). Até o momento, não foi descrita a transformação maligna desses tumores.

Radiograficamente o FO convencional se apresenta como uma lesão bem circunscrita usualmente unilocular com bordas escleróticas (MacDonald-Jankowski, 2009). Na fase inicial, a lesão é radiolúcida e, de acordo com a maturidade desta, focos radiopacos, com graus diferentes de calcificação, vão surgindo, porém a lesão raramente é radiopaca (MacDonald-Jankowski, 2004; Speight & Carlos, 2006; MacDonald-Jankowski, 2009). O FOJ tende a ser mais radiopaco que a lesão convencional e, algumas vezes, pode apresentar uma aparência de “vidro fosco” ou formar uma densa massa lobulada (Speight & Carlos, 2006). Esses tumores podem ser mais bem observados em tomografias computadorizadas. Raramente, essas lesões erosionam, deslocam dentes ou invadem ossos (Sciubba & Younai, 1989; Waldron, 1995; MacDonald-Jankowski, 2009; MacDonald-Jankowski & Li, 2009). À medida que o FO cresce e ultrapassa a área confinada aos maxilares, forma-se uma nova e fina cápsula constituída de osso cortical subperiosteal (Speight & Carlos, 2006). Essa é uma característica bastante importante e relevante no momento de diferenciar essa lesão de um osteossarcoma intraósseo com um padrão de crescimento destrutivo (Speight & Carlos, 2006).

Histologicamente o FO convencional é uma lesão bem delimitada, na qual se observa uma separação evidente entre a lesão e o osso cortical por uma fina zona de tecido conjuntivo fibroso (Slootweg PJ & Müller H, 1990). As biópsias devem incluir a margem da lesão para que o patologista tenha condições de avaliar detalhes importantes no diagnóstico final dessa lesão (Speight & Carlos, 2006; MacDonald-Jankowski, 2009). O FO convencional é composto de um estroma celularizado, moderadamente colagenoso, contendo numerosos fibroblastos fusiformes, que podem, às vezes, formar um padrão estoriforme (aleatório); áreas mixoides podem, também, ser observadas. O material ósseo pode apresentar-se em diferentes padrões, desde em um fino e irregular trabeculado de osso não lamelar, algumas vezes rodeado por osteoblastos ativos ou na forma de calcificações esféricas, por vezes semelhantes a cimento ou até mesmo massas globulares irregulares, as quais usualmente não são tão proeminentes. Um ponto chave que difere o FO da DF é que o padrão de mineralização varia de local para local na lesão, enquanto na DF o padrão de mineralização tende a ser uniforme em toda a lesão (Slootweg & Mofty, 2005; Speight & Carlos, 2006). Uma característica que raramente é notada no FO convencional é a degeneração mixoide do estroma com presença de áreas de hemorragia e acúmulo de células gigantes. Quando observada, essa característica sugere ao patologista a aparência de cisto ósseo aneurismático e deve ser considerado como diagnóstico diferencial (Speight & Carlos, 2006). É importante salientar, ainda, que, macroscopicamente, os FO são usualmente recebidos pelo patologista como uma lesão intacta e bem definida, enquanto que a DF, na maioria das vezes, é recebida de forma fragmentada (Speight & Carlos, 2006).

A variante juvenil trabecular é composta de tecido conjuntivo fibroso denso com escasso colágeno, contendo um fino trabeculado de osteoide e osso não lamelar. Os osteoblastos são proeminentes e podem estar incorporados em meio ao material osteoide, o que, às vezes, dificulta a distinção entre o material celular osteoide do estroma fibroso (Speight & Carlos, 2006). A variante psamomatoide é, também, densamente celularizada, porém as calcificações observadas são esféricas ou lamelares semelhantes a corpos do tipo psamoma. Essa variante possui uma margem “leve ou fina”, na qual o osteoide se funde ou se projeta dentro do estroma celular, algumas vezes descrito como um padrão pontiagudo de penetração. Lençóis de células semelhantes a osteoblastos, lembrando o osteoblastoma, podem ser vistas além de escassas figuras normais de mitose. Ocasionais calcificações psamomatoides podem ser encontradas na variante trabecular e trabéculas são frequentemente observadas na variante psamomatoide, especialmente em direção à periferia da lesão (El-Mofty, 2002; Speight & Carlos, 2006).

O tratamento recomendado é a remoção cirúrgica completa, sendo incomuns casos de recidiva (Slootweg, 1996; Brannon & Fowler, 2001; MacDonald-Jankowski, 2009; MacDonald-Jankowski & Li, 2009). Recomenda-se seguimento do paciente por um longo prazo em função de alguns relatos de recidiva dessas lesões (Meister *et al.*, 1973, MacDonald-Jankowski, 2009; MacDonald-Jankowski & Li, 2009).

2.3 GENE *HRPT2*

O Hiperparatiroidismo (HPT) é uma endocrinopatia, que afeta 3 em cada 1000 indivíduos adultos (Adami *et al.*, 2002). O HPT é a principal causa de hipercalcemia na população (Marx, 2000; Miedlich *et al.*, 2003). O HPT é caracterizado pelo aumento dos níveis de PTH (paratormônio) e é classificado em três tipos: primário, secundário e terciário (Ahmad & Hammond, 2004). O HPT primário é resultado da produção incontrolável de PTH usualmente associada à presença adenomas de paratireóides, que estimulam a secreção deste hormônio (80-90% dos casos), hiperplasia da paratireoide (10-15% dos casos) e, menos freqüente, à presença de carcinomas de paratireoide (Miedlich *et al.*, 2003; Ahmad & Hammond, 2004). Se esses tumores não forem tratados, os pacientes podem desenvolver lesões ósseas, cistos e tumores renais, além de disfunção neuromuscular (Adami *et al.*, 2002). O HPT secundário é menos comum que o HPT primário e ocorre quando o PTH é continuamente produzido em resposta a níveis baixos de cálcio. O HPT terciário ocorre devido à progressão do HPT secundário e é observado naqueles pacientes com falência renal crônica (Ahmad & Hammond, 2004).

O hiperparatiroidismo familiar abrange um grupo clínica e geneticamente heterogêneo de desordens. Essas formas hereditárias são responsáveis por aproximadamente 10% dos hiperparatiroidismos e são usualmente vistas em um contexto de síndromes, tais como: a neoplasia endócrina múltipla tipo 1 e tipo 2A (MEN 1 e 2A) (OMIM# 131100 e OMIM# 171400) respectivamente, o hiperparatiroidismo familiar isolado (HPFI) (OMIM# 146200) e a síndrome do

hiperparatiroidismo-tumores dos maxilares (HPT-TM) (OMIM# 145001 e 607393). (Carpten *et al.*, 2002; Miedlich *et al.*, 2003; Silveira *et al.*, 2008).

Desde 1958 existem relatos de casos de hiperparatiroidismo associados a tumores de mandíbula e/ou maxila e que não regrediram após a cura do hiperparatiroidismo (Jackson, 1958). Contudo, apenas na década de 90, o hiperparatiroidismo associado a tumores de mandíbula ou maxila (HPT-TM) foi reconhecido como uma síndrome, e o *locus* da doença, ainda desconhecido nessa época, foi denominado hiperparatireoidismo do tipo 2 ou HRPT2 (Jackson, 1958; Jackson *et al.*, 1990; Jackson *et al.*, 1998; Inoue *et al.*, 1995; Szabó *et al.*, 1995).

HPT-TM é uma síndrome autossômica dominante com uma alta, porém incompleta, penetrância caracterizada por tumores paratireoideos (adenomas e/ou carcinomas), lesões fibro-ósseas da mandíbula e/ou maxila (fibromas ossificantes), tumores uterinos (adenofibromas, leiomiomas e adenosarcomas) e lesões renais (tumor de Wilm's, hamartomas e doença renal policística) (Jackson *et al.*, 1990; Szabó *et al.*, 1995; Teh *et al.*, 1996; Haven *et al.*, 2000; Cavaco *et al.*, 2001; Carpten *et al.*, 2002; Howell *et al.*, 2003; Shattuck *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2005; Aldred *et al.*, 2006; Bradley *et al.*, 2006; Yamashita *et al.*, 2007; Rekik *et al.*, 2010). Outros tumores, incluindo adenoma da célula de Hurthle da tireoide, adenocarcinomas pancreáticos e tumor misto de células germinais testiculares, também já foram reportados em alguns pacientes com HPT-TM (Haven *et al.*, 2000; Bradley *et al.*, 2005).

A incidência ou prevalência da síndrome HPT-TM é desconhecida. Cerca de 80% dos pacientes desenvolvem o hiperparatiroidismo tardiamente na adolescência ou na fase adulta (Carpten *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2006). Há uma penetrância reduzida em mulheres (Teh *et al.*, 1996), e o carcinoma paratireoideo ocorre em aproximadamente 10-15% dos indivíduos afetados (Carpten *et al.*, 2002; Bradley *et al.*, 2006). 40% dos indivíduos com HPT-TM desenvolvem tumores nos maxilares, principalmente fibromas ossificantes, os quais são distintos do tumor marrom do hiperparatiroidismo secundário e não regredem após o tratamento cirúrgico da paratireoide (Szabó *et al.*, 1995; Chen *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2006).

O comportamento biológico do carcinoma de paratireoide é, muitas vezes, indolente e a literatura revela, em alguns estudos retrospectivos, uma média de 10 anos de sobrevida (Lee *et al.*, 2007). Apesar de a idade avançada, gênero masculino e presença de metástase à distância serem indicadores de um pobre prognóstico, o tamanho tumoral e o perfil linfonodal não predizem a sobrevida global do indivíduo (Lee *et al.*, 2007). As mudanças genéticas que levam ao desenvolvimento do carcinoma de paratireoide, não estão bem esclarecidas (Yip *et al.*, 2008). A alta taxa de pacientes com a síndrome HPT-TM que desenvolveram carcinoma de paratireoide (10-15 %) sugere que o gene *HRPT2* pode ser importante no desenvolvimento desse tipo de carcinoma (Carpten *et al.*, 2002; Chen *et al.*, 2003). Os achados histopatológicos do carcinoma de paratireoide nem sempre se correlaciona com os achados clínicos desse tumor (DeLellis RA, 2005). Sendo assim, o uso de marcadores moleculares, para diferenciar as lesões de paratireoide benignas das malignas,

tem sido utilizado cada vez mais. Hunt *et al.* (2005), em um estudo da perda de heterozigosidade (LOH), baseado em um amplo painel de genes supressores de tumor, encontraram instabilidade genética maior em carcinoma de paratireoide quando comparado ao adenoma de paratireoide (Hunt *et al.*, 2005).

O locus do HPT-TM foi mapeado primeiramente no cromossomo 1q21-q31 por Szabó *et al.* (1995). Carpten *et al.* (2002), em estudos adicionais da genotipagem de 26 famílias portadoras de HPT-TM, clonaram o gene *HRPT2*. Os autores mapearam esse gene, refinando sua localização para a região 12cM no cromossomo 1q24-q32, e identificaram 13 diferentes mutações inativadoras germinativas em heterozigose em 14 famílias portadoras de HPT-TM e em uma família com HPFI, sugerindo fortemente a associação direta desse gene com a patogênese do HPT-TM. A ocorrência de perda de heterozigosidade em alguns tumores sugere que esse gene seja um supressor de tumor (Teh *et al.*, 1996; Teh *et al.*, 1998; Haven *et al.*, 2000; Cavaco *et al.*, 2001; Cavaco *et al.*, 2011).

O gene *HRPT2* é composto por 17 exons, ocupando um segmento de 1,3 Mb no DNA genômico (Carpten *et al.*, 2002). O mRNA possui 2.7Kb, com uma janela aberta de leitura (ORF = open reading frame) de 1596 nucleotídeos, que codifica uma proteína de 531 aminoácidos, denominada parafibromina, devido ao seu envolvimento no desenvolvimento de tumores paratireoidianos e fibromas ossificantes (Carpten *et al.*, 2002).

A função específica da proteína parafibromina é desconhecida, uma vez que seus domínios ainda não foram identificados completamente. A porção C-terminal da parafibromina apresenta homologia parcial com uma proteína do fungo *Saccharomyces cerevisiae* intitulada Cdc73p (cell division cycle protein 73 homolog, MIM# 607393), (Carpten *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 1996), componente do complexo proteico PAF1 (peroxisome assembly factor 1) associado à RNA polimerase II (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2005; Yart *et al.*, 2005; Pokholok *et al.*, 2002; Agarwal *et al.*, 2008). O complexo PAF1 do fungo (yPAF1) regula a transcrição, ubiquitinização da histona H2B, metilação da histona H3 e dos resíduos da lisina K4 e K79 (Shi *et al.*, 1997; Carpten *et al.*, 2002, Mueller & Jaehning, 2002; Krogan *et al.*, 2002; Porter *et al.*, 2002, Krogan *et al.*, 2003; Mueller *et al.*, 2004), além do controle da extensão da cauda de poly (A) (Betz *et al.*, 2002). A parafibromina participa da metilação da histona H3 K9 por meio da sua repressão pela ciclina D1 (Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010).

A superexpressão da parafibromina inibe a proliferação celular e induz a parada do ciclo celular na fase G1 (Farber *et al.*, 2010). Na síndrome do HPT-TM, a parafibromina não possui a habilidade de suprimir essa proliferação celular (Farber *et al.*, 2010).

A parafibromina foi descrita como uma proteína nuclear (Tan *et al.*, 2004; Hahn & Marsh, 2005; Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2005), porém estudos revelaram que ela também pode estar presente no citoplasma das células (Woodard *et al.*, 2005). O transporte nuclear já foi comprovado ser um mecanismo fundamental

e crítico na localização da proteína e na função de muitos tumores supressores (Fabbro & Henderson, 2003). Em relação a isso, é interessante notar que aproximadamente 50% das 27 diferentes mutações germinativas e 75% das 22 diferentes mutações somáticas já descritas no gene *HRPT2* (Bradley *et al.*, 2005, Bradley *et al.*, 2006) resultam da perda do MP (*monopartite*) NLS (*nuclear localization signal*) no resíduo 136-139 (Bradley *et al.*, 2007). Então, a perda do NLS MP-1 e a ausência da parafibromina no núcleo parecem ser importantes eventos na etiologia dos tumores da glândula paratireoide. Além disso, a parafibromina e três outras proteínas nucleares, ciclina D1, retinoblastoma (RB) e *menin*, a qual é codificada pelo gene da neoplasia endócrina múltipla do tipo 1 (MEN1), têm um importante papel na etiologia dos tumores paratireoidianos e na regulação do ciclo celular (Baldin *et al.*, 1993; Zacksenhaus *et al.*, 1993; Hunter & Pines, 1994; Guru *et al.*, 1998). Woodard *et al.* (2005) sugeriram propriedades antiproliferativas da parafibromina devido ao seu forte efeito inibitório na expressão da ciclina D1.

O colapso do ciclo celular é comum em cânceres humanos, e a superexpressão da ciclina D1 é uma das alterações mais comumente observadas. A *ciclina D1* foi identificada nos tumores de paratireoides como um oncogene, cujo nome alternativo recebido foi de *PRAD1* (paratireoide adenomatose 1), (Arnold *et al.*, 1991). Interessantemente a superexpressão de parafibromina leva à repressão da ciclina D1, inibindo, assim, a proliferação celular. Isso destaca uma potencial ligação da parafibromina com o controle do ciclo celular por meio da inibição da ciclina D1, agindo, então, como supressora de tumor (Woodard *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007).

Contudo, o mecanismo molecular detalhado sobre como a parafibromina regula a ciclina D1 continua obscuro (Yang *et al.*, 2010).

Algumas formas mutantes de parafibromina não se associam ao complexo PAF1 e, conseqüentemente, ao complexo histona-metiltransferase, sugerindo que a má-formação desses complexos pode se correlacionar com o processo oncogênico (Rosenblatt-Rosen *et al.*, 2005). A proteína parafibromina, codificada pelo gene *HRPT2*, tem a capacidade de inibir o crescimento e a proliferação celular, além de induzir a parada do ciclo celular na fase G1 (Farber *et al.*, 2010), por meio da metilação da histona H3 durante a transcrição, diminuindo assim a quantidade de ciclina D1 (Woodard *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006).

O gene *HRPT2* é mutado na linhagem germinativa de pacientes com HPT-TM, causando mutações de sentido trocado (*missense*); mutações somáticas inativadoras do *HRPT2* foram descritas na maioria dos carcinomas esporádicos de paratireoide (Carpten *et al.* 2002; Howell *et al.*, 2003; Shattuck *et al.*, 2003; Juhlin *et al.*, 2007). A teoria de que o gene *HRPT2* é um supressor de tumor é reforçada por artigos que descrevem que a maioria das mutações no *HRPT2* resultam a perda da proteína parafibromina, e alguns tumores HPT-TM apresentam ambas as mutações germinativas e somáticas (Howell *et al.*, 2003; Shattuck *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2006), as quais são consistentes com a hipótese do “*two-hit*” de Knudson (Knudson, 1971). A Hipótese dos Dois Eventos, elaborada por Alfred Knudson, em 1971, leva em consideração que duas mutações devem ocorrer, uma em cada alelo, ou seja, perda de função

nos dois alelos, para que se desenvolva a doença. Nos tumores de caráter hereditário, uma mutação é herdada na linhagem germinativa e outra mutação, desta vez somática, é adquirida ao longo da vida. Nos tumores esporádicos, as duas mutações são somáticas e adquiridas ao longo da vida. Isso explica como alguns tipos de câncer podem ser tanto esporádicos quanto hereditários. Essa hipótese esclarece, também, como algumas doenças hereditárias não se manifestam em todos os indivíduos da família, uma vez que a segunda mutação ocorre ao acaso. Além disso, nesse modelo de carcinogênese, as mutações têm caráter recessivo, uma vez que um único alelo mutado não é capaz de induzir uma neoplasia (Knudson, 1971).

Newey *et al* (2010), em uma revisão de literatura, encontrou 111 tipos de mutações descritas no gene *HRPT2*, sendo 68 do tipo germinativas, 38 somáticas e 5 não definidas pelos autores. Das 68 mutações germinativas encontradas, 38 (55%) ocorreram em pacientes com HPT-TM. Contudo, segundo Newey *et al* (2010), não pode ser observada nenhuma aparente correlação genótipo-fenótipo nestes indivíduos estudados.

As síndromes associadas ao gene *HRPT2* apresentam fenótipo variado e ainda não totalmente caracterizado, embora a associação de mutações no *HRPT2*, com formas mais agressivas de hiperparatireoidismo, pareça estar estabelecida. Além das complicações decorrentes da hipercalcemia grave e o risco de lesões renais, é importante notar que pacientes com mutações no gene *HRPT2* apresentam um risco aumentado de desenvolver carcinoma de paratireoide e, nesse caso, o diagnóstico genético precoce seria de grande valia na decisão

terapêutica, prognóstico e aconselhamento genético desses pacientes. Além do mais, a precisão do estudo genético permite um rastreamento mais fácil e seguro das famílias dos pacientes afetados, pois propicia a identificação e o tratamento precoce dos membros afetados, evitando, assim, exames desnecessários nos familiares sem a alteração genética no gene *HRPT2*.

2.4 GENE *CICLINA D1*

O ciclo celular é um processo complexo, organizado e que visa assegurar que a divisão da célula ocorra apenas após replicação completa e precisa do DNA. São identificadas quatro fases no ciclo celular ativo, conhecidas como G1 (gap 1), S (síntese), G2 (gap 2) e M (mitose), (Gillett & Barnes, 1998). Há ainda a fase G0, que corresponde à fase em que células estão quiescentes. A divisão celular é controlada pelo ambiente extracelular e por um sistema de controle intrínseco da célula (Gillett & Barnes, 1998).

Foram reconhecidos até agora dois momentos específicos do ciclo celular, denominados “pontos de controle ou *checkpoints*”: um na transição G1-S e outro na transição G2-M. Esses pontos representam paradas, nas quais é permitido à célula certificar-se não só da sua integridade, mas, também, se as condições do microambiente encontram-se favoráveis à sua sobrevivência (Hartwell & Kastan, 1994). As principais classes de proteínas reguladoras do ciclo celular conhecidas são as quinases dependente de ciclinas (CDKs), ciclinas e inibidores de CDKs (CKIs). Todas essas proteínas regulam o trânsito da célula pelo ciclo, controlando não só a velocidade da proliferação, como,

também, checando sua integridade antes da duplicação (Gillett & Barnes, 1998). A partir da ação coordenada dessas classes de proteínas, dá-se a progressão do ciclo celular. A associação das diferentes CDKs às suas ciclinas específicas, formando os complexos ciclina/CDK, determina a passagem pelas fases sucessivas (Hartwell & Kastan, 1994).

A ciclina D1 é uma proteína regulatória chave do *checkpoint* G1-S, pois inibe o ciclo de divisão celular e induz a apoptose das células (Hartwell & Kastan, 1994). Ela forma complexos com cdk4 ou cdk6 e é responsável pela fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), resultando a liberação dos fatores de transcrição E2F que permitem a entrada das células na fase S (Hunter & Pines, 1994; Sherr, 1996).

O gene da *ciclina D1* (*CCND1*) está localizado no cromossomo 11q13 e é expresso na transição G1-S do ciclo celular. Alterações no *gene CCND1* podem afetar diretamente a regulação da proliferação celular e, portanto, aumentar a susceptibilidade ao câncer. Frequentemente G1-S está alterado em tumores humanos. A ativação e superexpressão do gene *CCND1* foram demonstradas em uma variedade de tumores, como câncer de mama, cabeça e pescoço, laringe, pulmão, além de adenomas e carcinomas da paratireoide (Arnold *et al.*, 1991; Nakahara *et al.*, 2000; Arnold *et al.*, 2002).

A atividade da ciclina D1 pode ser inibida por vários genes supressores de tumor, incluindo as proteínas p16 (gene *CDKN2A* – inibidor de ciclina dependente de quinase 2A), p21 (gene *WAF1/CIP1*- inibidor de ciclina

dependente de quinase 1A), p27 (gene KIP1- inibidor de ciclina dependente de quinase 1B), (Namazie *et al.*, 2002), e a parafibromina (gene *HRPT2*) (Woodard *et al.*, 2005).

O efeito inibitório da parafibromina, na expressão da ciclina D1, pode ter sido perdido em consequência da inativação bialélica de *HRPT2* e, em certos tecidos susceptíveis, como a paratireoide, a desinibição da ciclina D1 poderia dar início ao processo de transformação neoplásica (Arnold *et al.*, 2002). Woodard *et al.* (2005) afirmam que ainda não está claro se os efeitos inibitórios sobre a ciclina D1 resultam de uma ação direta ou indireta da parafibromina.

A ideia deste trabalho surgiu depois que um estudo demonstrou alterações genéticas do gene *HRPT2* em um FO esporádico (Pimenta *et al.*, 2006). Pelo exposto, anteriormente, na revisão de literatura, formulou-se a hipótese de que alterações similares no gene *HRPT2* poderiam ser vistas tanto na DF como no OS, uma vez que essas são lesões ósseo-relacionadas. Este estudo avaliou e comparou a transcrição do gene *HRPT2* e a expressão de sua proteína parafibromina, ademais de avaliar se a expressão do gene da *ciclina D1* poderia ser regulada pelo gene *HRPT2* nessas lesões. Estudos dessa natureza, além de contribuírem para a compreensão da patogênese, podem ajudar na definição de marcadores úteis no seu diagnóstico diferencial, além de uma melhor caracterização molecular dessas doenças.

3. OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Analisar molecularmente os *genes HRPT2 e Ciclina D1* nos osteossarcomas, nos fibromas ossificantes e nas displasias fibrosas dos maxilares.

3.2 Objetivos Específicos

- Investigar a presença de perda de heteroziguidade (LOH) do gene *HRPT2* e mutação nos transcritos deste gene, na DF, no FO e no OS, verificando o seu possível impacto na transcrição do gene ou na expressão da proteína;
- Investigar os níveis de transcrição de mRNA dos genes *HRPT2* e *Ciclina D1* na DF, no FO e no OS;
- Investigar a possível associação entre a expressão da proteína parafibromina e a transcrição do gene *HRPT2* com a transcrição e expressão da proteína do gene *CCND1/ciclina D1*.

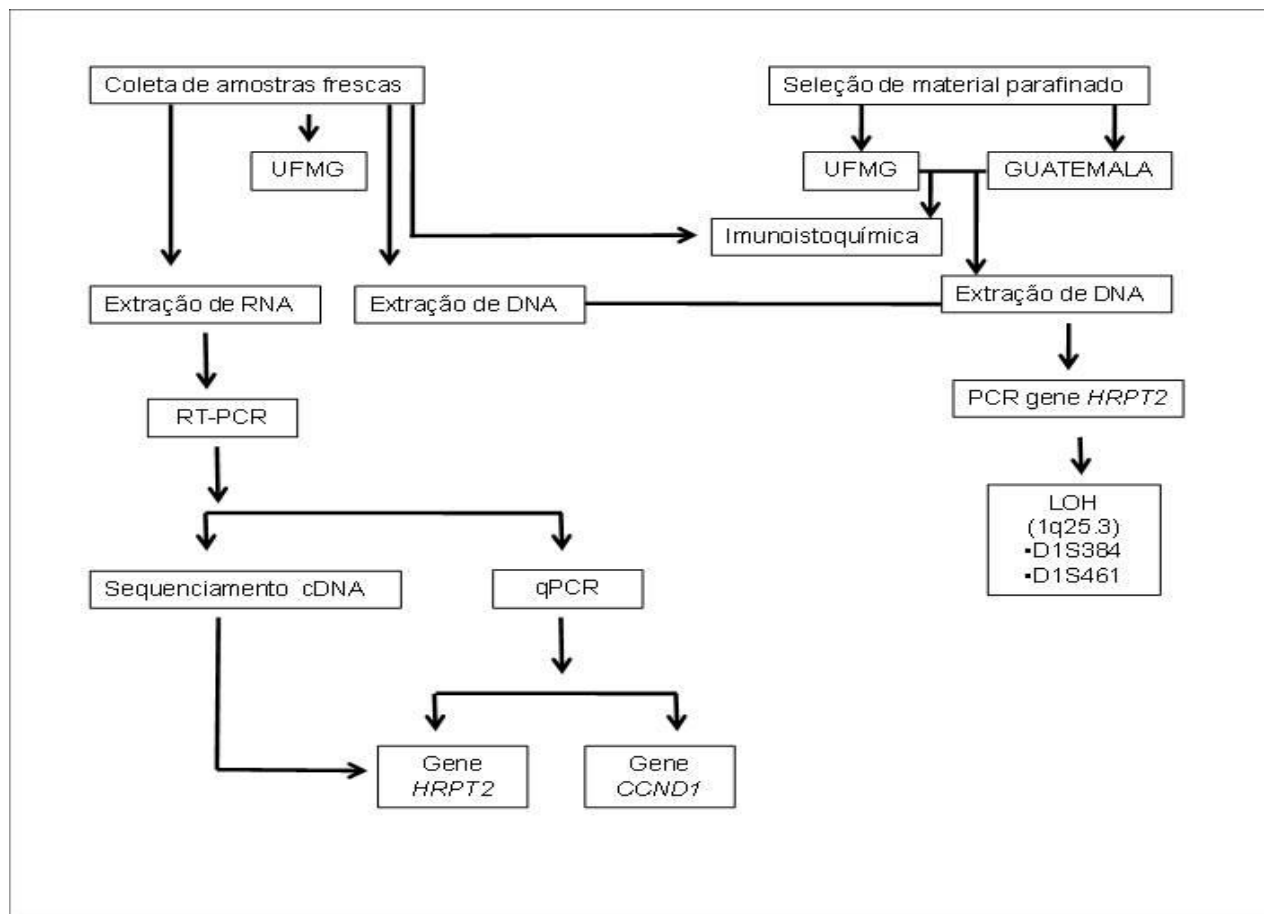
4. MATERIAL E MÉTODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS:

4.1 Fluxograma

O fluxograma abaixo representa as etapas técnicas realizadas neste trabalho:

Figura 1. Esquema das técnicas realizadas neste estudo.



4.2 Procedimentos éticos

O estudo foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG (Parecer ETIC 0380.0.203.000.09) em anexo. Termos de consentimento livre e esclarecido foram obtidos dos pacientes que concordaram em participar do estudo (APÊNDICE 1).

4.3 Casuística

A amostra estudada consistiu em um total de 43 lesões, sendo 15 displasias fibrosas, 19 fibromas ossificantes e 9 osteossarcoma. As amostras foram obtidas dos arquivos da UFMG e do Centro Clínico de Cabeza y Cuello, Guatemala.

Tecido fresco:

O tecido fresco foi coletado na clínica de Semiologia e Patologia Bucal, da Faculdade de Odontologia da UFMG, no período de agosto de 2008 a julho de 2011 (casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19 e 20). Esse serviço atende a pacientes provenientes do Sistema Único de Saúde (SUS). O material foi obtido durante os procedimentos cirúrgicos necessários

para o diagnóstico da doença. Foi coletado um fragmento de aproximadamente 5mm³, o que não comprometia o exame histopatológico da lesão. Este material foi fragmentado e acondicionado em criotubos, contendo as soluções de RNA later® e também de Tissue-Tek (Sakura Finetek, CA, USA), sendo ambos armazenados a -80°C. Além disso, um fragmento adicional coletado foi fixado em formol tamponado a 10%, processado e incluído em parafina para ser usado neste estudo.

Blocos de parafina:

Foram recuperados do arquivo histopatológico do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial, da Faculdade de Odontologia da UFMG, blocos de parafina de 9 fibromas ossificantes (casos 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37 e 38) e 9 displasias fibrosa (casos 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28 e 29) selecionados entre os anos de 1980 e 2010. E provenientes do laboratório, do Centro Clínico de Cabeza y Cuello, coordenado pelo Dr. Román Carlos, foram incluídos 7 casos de osteossarcoma (casos 19, 20,39,40,41,42 e 43). Foram incluídos neste estudo somente os blocos com material suficiente para as análises propostas e que apresentaram tecido com morfologia preservada.

4.4 Critérios de elegibilidade e exclusão para o estudo

Os critérios de elegibilidade para inclusão de casos no estudo foram os pacientes que tiveram o diagnóstico clínico, radiográfico e histopatológico de

uma das lesões estudadas, podendo a manifestação da doença ser de forma primitiva ou recidiva.

No decorrer da análise dos prontuários dos pacientes, observou-se que, apesar de ter sido mencionado que o paciente tinha diagnóstico clínico e radiográfico da lesão a ser estudada, alguns dados considerados fundamentais para o estudo não estavam descritos detalhadamente e, por isso, esses casos foram excluídos do estudo.

Em relação aos blocos de parafina estudados, foram observadas previamente as condições adequadas de descalcificação do tecido ósseo orientadas por meio da ficha de histologia e, também, pelo corte corado em hematoxilina-eosina na lâmina; foi escolhido o bloco que havia maior quantidade de tecido preservado dentro das condições citadas acima.

Não foram incluídos os indivíduos que, durante a coleta de tecido fresco, tenham se recusado a participar do estudo.

4.5 Coleta de dados

As informações sobre os pacientes estudados foram obtidas por meio da revisão das fichas clínicas, das quais se extraíram os seguintes dados:

- Idade;
- Gênero;
- Localização da lesão (mandíbula ou maxila);

- Diagnóstico histopatológico.

Os laudos histopatológicos de todos os casos estudados foram revisados por um patologista experiente, especialista em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG (Tabela1).

Tabela 1. Distribuição da amostra estudada.

Diagnóstico/ n da amostras	Gênero	Idade	Localização	Origem do material
Displasia Fibrosa (n=15)				
Caso 01	Feminino	56	Maxila	A fresco
Caso 02	Feminino	24	Mandíbula	A fresco
Caso 03	Masculino	14	Maxila	A fresco
Caso 04	Feminino	14	Mandíbula	A fresco
Caso 05	Feminino	30	Maxila	A fresco
Caso 06	Feminino	28	Maxila	A fresco
Caso 21	Feminino	27	Maxila	Em parafina
Caso 22	Masculino	7	Mandíbula	Em parafina
Caso 23	Masculino	37	Maxila	Em parafina
Caso 24	Feminino	14	Maxila	Em parafina
Caso 25	Feminino	36	Maxila	Em parafina
Caso 26	Feminino	ND	Maxila	Em parafina
Caso 27	Feminino	29	Maxila	Em parafina
Caso 28	Feminino	36	Mandíbula	Em parafina
Caso 29	Feminino	21	Mandíbula	Em parafina
Fibroma Ossificante (n=19)				
Caso 07	Feminino	30	Mandíbula	A fresco
Caso 08*	Feminino	33	Mandíbula	A fresco
Caso 09	Feminino	58	Mandíbula	A fresco
Caso 10 ^a	Masculino	19	Mandíbula	A fresco
Caso 11 ^b	Masculino	15	Mandíbula	A fresco
Caso 12	Feminino	25	Mandíbula	A fresco
Caso 13	Feminino	28	Maxila	A fresco
Caso 14	Feminino	30	Maxila	A fresco
Caso 15	Feminino	49	Maxila	A fresco
Caso 16	Feminino	70	Mandíbula	A fresco
Caso 30	Feminino	38	Mandíbula	Em parafina
Caso 31	Masculino	16	Mandíbula	Em parafina
Caso 32	Feminino	26	Mandíbula	Em parafina
Caso 33	Feminino	36	Maxila	Em parafina
Caso 34	Feminino	28	Mandíbula	Em parafina
Caso 35	Feminino	43	Mandíbula	Em parafina
Caso 36	Feminino	21	Mandíbula	Em parafina
Caso 37	Masculino	11	Mandíbula	Em parafina
Caso 38	Masculino	17	Mandíbula	Em parafina
Osteossarcoma (n=9)				
Caso 17	Feminino	34	Mandíbula	A fresco
Caso 18	Feminino	35	Mandíbula	A fresco
Caso 19	Feminino	15	Maxila	Em parafina
Caso 20	Masculino	32	Mandíbula	Em parafina
Caso 39	Feminino	34	Mandíbula	Em parafina
Caso 40	Masculino	36	Maxila	Em parafina
Caso 41	Feminino	42	Mandíbula	Em parafina
Caso 42	Masculino	21	Maxila	Em parafina
Caso 43	Feminino	22	Maxila	Em parafina

Caso 08*: recidiva do caso 07. ^a Fibroma ossificante juvenil. ^b: HPT-TM

4.6 Análise imunoistoquímica

As amostras que apresentavam quantidade suficiente de material foram selecionadas para realização da técnica imunoistoquímica dos anticorpos parafibromina e ciclina D1. A expressão da parafibromina foi avaliada utilizando o anticorpo monoclonal *murino* o qual se liga no peptídeo RRPDRKDLLGYLNC, correspondendo a posição do aminoácido 87-100 da proteína parafibromina, codificada pelo exon 3 do gene *HRPT2*. O estudo imunoistoquímico foi realizado em 41 amostras. Nos casos 2 e 16 não foi possível realizar tal estudo.

Foram feitos cortes de 5µm de tecido fixado em formol e incluído em parafina. Os cortes foram desparafinizados em banhos de xilol e re-hidratados em água, após banhos em álcool. A recuperação antigênica foi realizada, utilizando-se solução tampão de ácido cítrico (pH 6.0, 10mmol/L) em microondas de 750W por 90 segundos para pré-aquecimento e, logo em seguida, deixado na panela a vapor a 96^oC por 30 minutos (Tabela 2). Após resfriamento em temperatura ambiente (TA) por aproximadamente 30 minutos, realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio PA 20 volumes durante 10 minutos. Os cortes foram então lavados em água destilada e colocados em solução tampão de Tris-HCl. Em seguida, os cortes foram incubados com os anticorpos primários previamente diluídos por 30 minutos, sendo que durante este período as lâminas foram agitadas em um agitador mecânico para completo espalhamento do anticorpo.

Tabela 2. Anticorpos utilizados para imunohistoquímica, com respectivas diluições, soluções de recuperação antigênica e controles positivos utilizados.

Anticorpo	Código	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo
Parafibromina	sc-33638	Santa cruz	Monoclonal	1:200	Ácido cítrico pH 6.0	Hiperplasia paratireoide
Ciclina D1	DCS-6	DAKO	Policlonal	1:100	Ácido cítrico pH 6.0	Carcinoma escamoso

Após enxágue com Tris-HCl, os cortes foram então cobertos com reagente amplificador de sinal (DAKO EnVision Visualization Systems Corporation, Carpinteria, CA, USA, catálogo K4061) durante 30 minutos em um agitador mecânico. Novamente os cortes foram enxaguados em Tris-HCl e finalmente incubados com solução diaminobenzidina como cromógeno-substrato (DAB-DAKO EnVision Visualization Systems, Sigma, St Louis, MO, USA) por 5 minutos.

Após a incubação, com diaminobenzidina como cromógeno, os cortes foram rigorosamente enxaguados em água destilada, contra-corados com hematoxilina de Mayer, durante 90 segundos, e montados em entelan.

Para cada anticorpo foram incluídos na mesma bateria um controle positivo (Tabela 2) e um controle negativo, em que o anticorpo primário foi omitido. As amostras de controle positivo (hiperplasia de paratireoide) utilizadas neste estudo foram as mesmas usadas por Pimenta *et al.* (2006).

A imuno-marcação foi avaliada utilizando-se microscopia óptica de luz (aumento 400x). Inicialmente foi realizada uma avaliação qualitativa de todos os casos. Em seguida, foram realizadas a contagem de todos os núcleos positivos, de maneira independente dessa mesma intensidade, em 6 campos no aumento de 400x, utilizando um microscópio acoplado a uma câmera Canon PC 1200 (China) e a um computador com o software AxionVision 40V 4.7.1.0 (Alemanha). A análise de todas as imagens capturadas foi feita com a ajuda do programa software Image Tool for Windows versão 3.0 (EUA). A reatividade imunoistoquímica para o anticorpo parafibromina e ciclina D1 foi calculada de acordo com a porcentagem de células positivas (0 a 100%) em relação ao total de células capturadas. Para isso, levou-se em consideração a presença de marcação nuclear, de maneira independente dessa mesma intensidade.

4.7 Análise molecular

4.7.1 Extração do RNA

O RNA total das amostras (casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18) foi extraído utilizando o reagente trizol (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. De forma sucinta, o tecido foi macerado dentro de um gral com a ajuda de um pistilo, desinfetado e livre de RNA, até formar um pó. O tecido macerado foi transferido para um eppendorf de 1,5ml, contendo 250µl de trizol, homogenizado com o uso de um Tissue Grinder (motor de baixa rotação- *Pestle Grinder System 03-*

392-106) e transportado para a capela, na qual foram acrescentados 750µl de trizol, a fim de completar um volume final de 1000µl. Em seguida, o tecido foi centrifugado durante 10 minutos, a 4^oC com uma rotação de 1200g. Observou-se a formação de um *pellet* composto de membrana extracelular, polissacarídeos e DNA de alto peso molecular. A solução homogênea sobrenadante foi transferida a outro eppendorf de 1,5ml, na qual foi se acrescentada 200µl de clorofórmio. O material foi, então, homogeneizado vigorosamente por 15 segundos, incubado em TA por 3 minutos e centrifugado durante 15 minutos em uma temperatura de 4^oC com uma rotação de 1200g. A mistura separou-se em três fases: uma transparente (60%) contendo RNA e outras duas, interfase e vermelho contendo proteína e DNA. A fase RNA-transparente foi transferida para outro eppendorf de 1,5ml e acrescentou-se 500ul de álcool isopropílico. A solução foi, então, homogeneizada vigorosamente e incubada em TA durante 10 minutos e centrifugada durante 10 minutos a uma temperatura de 4^oC com uma rotação de 1200g, até formar um *pellet* branco (RNA total). O sobrenadante foi descartado usando pipeta. Acrescentou-se 1 ml de álcool etílico 75% ao *pellet* e centrifugou-se durante 5 minutos a uma temperatura de 4^oC com uma rotação de 1200g. O sobrenadante foi descartado, para que o *pellet* permanecesse ainda formado. O *pellet* foi seco por cerca de 5 a 10 minutos em TA, até ficar transparente. Ao final, o *pellet* foi ressuspenso em H₂O Depc, utilizando-se de 15 a 20µl dependendo do tamanho do *pellet*. A amostra foi, então, quantificada em espectrofotômetro para realização da síntese de cDNA.

4.7.2 Tratamento do RNA com DNase e transcrição reversa do RNA (síntese do cDNA)

O RNA total das amostras (casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18) foi tratado com DNase (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), e 1,5µg de RNA total extraído de cada amostra foi utilizado para a reação de transcrição reversa de acordo com as recomendações do fabricante (Kit Superscript first-strand synthesis system - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). De forma breve, o tratamento com DNase consistiu em incubar os seguintes reagentes do Kit Superscript first-strand synthesis system (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA): 1µl tampão, 1,5µg RNA, 1µl DNase e H₂O Depc (10µl q.s.p.) seguido de incubação em TA durante 15 minutos. Em seguida, foi acrescentado 1µl de EDTA e a mistura foi incubada a 65⁰C durante 10 minutos (volume final 11µl). Após completar o ciclo, o RNA tratado foi mantido no gelo até a próxima fase.

Para a transcrição reversa do RNA tratado, foi preparado um MIX em um tubo de eppendorf de 500µl, contendo 1µl de oligo dT + 1µl de dNTP, para cada amostra estudada (Kit Superscript first-strand synthesis system - Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Aos 2µl de MIX preparado, para cada amostra acrescentou-se 8µl de RNA tratado, resultando um volume final de 10µl, que foi incubado a 65⁰C durante 5 minutos. Em seguida, foi preparado novo MIX, na seguinte ordem dos reagentes: 2µl de tampão 10x RT, 4µl de 25mM MgCl₂, 2µg de 0,1M DTT e 1µl de RNase *inhibition out*, totalizando um volume de 9µl. O MIX foi distribuído para cada amostra estudada e logo incubado a uma temperatura de 42⁰C durante 2 minutos (volume final 19µl).

Logo após, foi adicionado 1ul SSII-RT e incubado a uma temperatura de 42^oC durante 50 minutos e 70^oC durante 15 minutos (volume final 20μl); por fim, foi adicionado à solução 1ul de RNase H e incubado a uma temperatura de 37^oC durante 20 minutos (volume final 21μl). O cDNA foi diluído em 29μl de H₂O miliq para atingir um volume final de 50μl.

Ao final, a amostra foi quantificada em espectrofotômetro (2μL de amostra diluído em 98μL de H₂O miliq, proporção 1:50).

4.7.3 PCR do cDNA do gene *HRPT2* (reação em cadeia da polimerase – DNA complementar)

Após a transcrição reversa, o cDNA foi utilizado como *template* para amplificação do transcrito humano do gene *HRPT2* por meio da técnica de PCR (casos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17 e 18). Utilizaram-se os 3 pares de *primers* flanqueando as regiões de exon 1 ao 17, como descritos previamente (Sarquis *et al.*, 2008) (figura 2 e tabela 3).

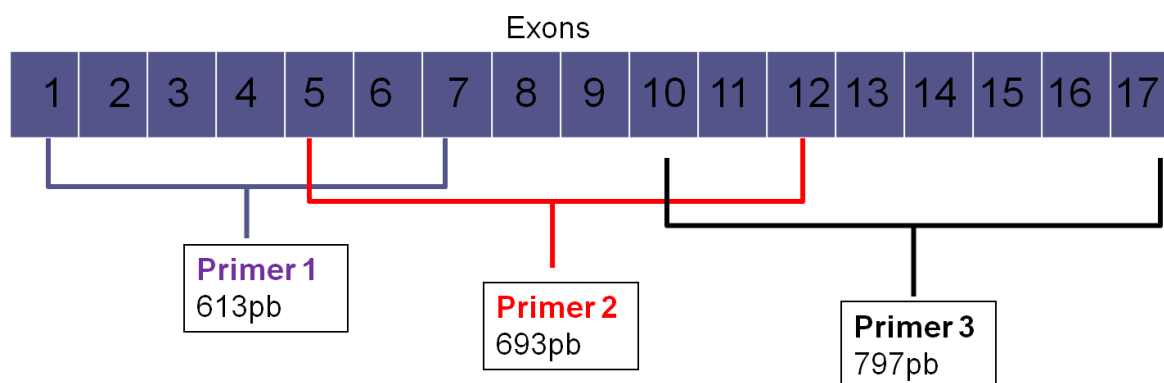


Figura 2. Esquema de *primers* utilizados no PCR do gene *HRPT2* dos exons 1 ao 17.

Tabela 3. Sequência de *primers* utilizados no PCR do gene *HRPT2* dos exons 1 ao 17.

Região <i>HRPT2</i> flanqueada	Sequência de <i>primers</i>	
Primer 1	Senso	5'-GCGACAAGAGAAGAAGGAG-3'
Exon 1 ao 7	Anti-senso	5'-TCCACTGACATAGCTTCAGACAA-3'
Primer 2	Senso	5'-GTCAAACGAGCTGCAGATGA-3'
Exon 5 ao 12	Anti-senso	5'-CTTCTGATTTGGGGGAGGTC-3'
Primer 3	Senso	5'-TTGACACTATGGGAACCTACCA-3'
Exon 10 ao 17	Anti-senso	5'-CCTTGAAGCACA AAGCATCA-3'

As reações de PCR foram realizadas, em uma capela de fluxo laminar, com um volume final de 25µL contendo 10 pmol de cada primer, 0,5mM MgCl₂ (*primer 1*) a 0,75mM MgCl₂ (*primer 2 e 3*), 5mM dNTP mix, 2,5 x PCR tampão e 0,25U Taq Platinum DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen Life Technologies, Foster City, CA, USA). Foram feitos trinta e cinco ciclos de amplificação

utilizando um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, AG, Hamburg, Germany), com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95°C por 10 minutos, 94°C por 40 segundos, 58°C por 40 segundos, 72°C por 90 segundos e extensão final a 72°C durante 15 minutos. O cDNA da β -actina foi amplificado conjuntamente e utilizado como controle para qualidade do cDNA.

Os produtos amplificados foram verificados pela eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% corado pela prata (figuras 3, 4 e 5). Como controle negativo, realizou-se a reação com ausência de DNA. Amostras de mucosas normais foram selecionadas para o controle positivo. Estes controles foram utilizados em todos os experimentos.

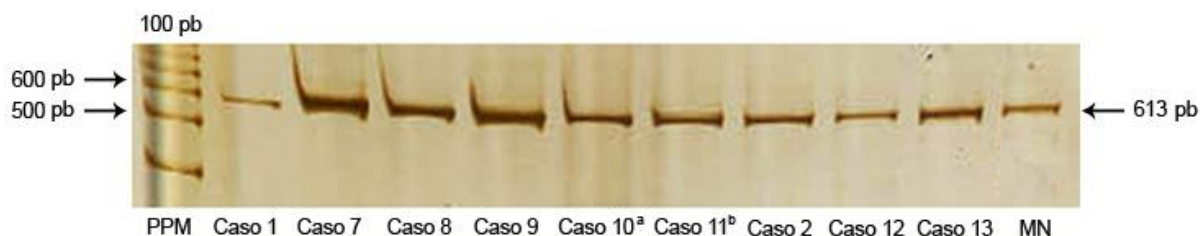


Figura 3. Gel de poliacrilamida a 10% com os produtos de amplificação do fragmento do *primer* 1 (exon 1-7) de 613 pb do gene *HRPT2*. PPM: padrão de peso molecular. MN: mucosa normal (controle positivo). pb: pares de base.

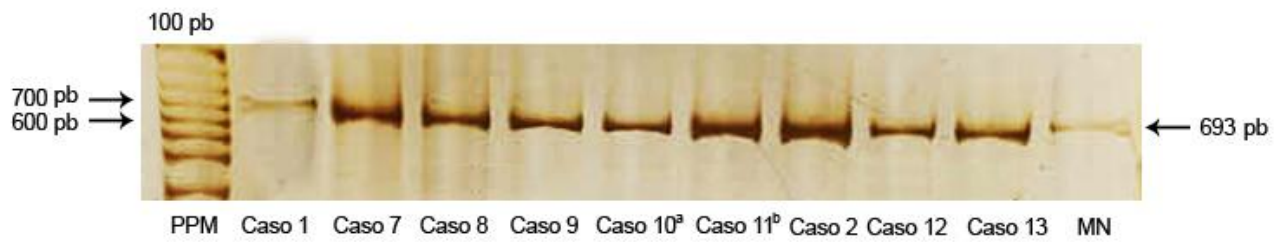


Figura 4. Gel de poliacrilamida a 10% com os produtos de amplificação do fragmento do *primer 2* (exon 5-12) de 693 pb do gene *HRPT2*. PPM: padrão de peso molecular. MN: mucosa normal (controle positivo). pb: pares de base.



Figura 5. Gel de poliacrilamida a 10% com os produtos de amplificação do fragmento do *primer 3* (exon 10-17) de 797 pb do gene *HRPT2*. PPM: padrão de peso molecular. MN: mucosa normal (controle positivo). pb: pares de base.

4.7.4 Sequenciamento direto do cDNA

Os produtos de PCR foram diluídos e purificados do gel de agarose 3%, utilizando o GFX PCR DNA e o Kit de purificação Gel Band (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) de acordo com as especificações do fabricante e, somente depois, submetidos à reação de sequenciamento (casos 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 17 e 18). Cada reação para sequenciamento consistiu de um volume final de 20µl, por adição de 2µl de Big Dye™, 3µl de tampão, 1µl do primer diluído (1:5,25) e 400ng de produto de PCR.

Os produtos da reação de sequenciamento foram precipitados de acordo com protocolo utilizado por Diniz *et al.* (2011) e sequenciados no ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

As sequências foram comparadas com a sequência do transcrito RNA do gene *HRPT2* (APÊNDICE 2). O número de acesso NM_024529.3, do *GenBank*, foi usado como referência para a conferir a sequência do transcrito RNA do gene *HRPT2* (nucleotídeo +1 corresponde ao A do ATG-códon de iniciação da transcrição).

4.7.5 Quantificação da transcrição gênica por meio de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR-Tempo Real)

O PCR quantitativo em Tempo Real é empregado para inferir a quantidade inicial de um determinado produto por meio do comportamento da cinética de amplificação. Essa análise ocorre por meio da detecção de um sinal fluorescente a cada ciclo de amplificação, sendo coletadas informações a cada ciclo. Para essa análise, é estabelecido um limiar de detecção (*Threshold*), que consiste em um ponto de referência, na qual todas as amostras possuem a mesma intensidade fluorescente.

As reações de PCR quantitativo em Tempo Real, para avaliação da transcrição do RNA dos genes *HRPT2* e *Ciclina D1*, foram realizadas no aparelho Applied Biosystems Step One Real-Time PCR Systems 48-well plate (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Foram incluídas 6 amostras de displasia fibrosa, 9 amostras de fibroma ossificante (sendo um fibroma ossificante juvenil e outra pertencente a síndrome HPT-TM) e 2 amostras de osteossarcoma. Sete fragmentos de ossos normais, coletados durante acerto ósseo de exodontia, foram incluídos para servirem de grupo controle. Os *primers* utilizados estão descritos na tabela 4 e foram desenhados utilizando-se o programa Software Primer Express v 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Tabela 4. Sequência de *primers* utilizados no qPCR do gene *HRPT2* e do gene *Ciclina D1*.

qPCR	Sequência de primers		Amplicon
Gene <i>HRPT2</i> Exon 2 ao 3	Senso	5'- GCCAACCCAGAGAGTACTACACATT-3''	125 pb
	Anti-senso	5'- GATCAGGTCTTCTAACCCACAGGAATAT-3'	
Gene <i>Ciclina D1</i> Exon 3 ao 4	Senso	5` TGA GGA GCC CCA ACA ACT T-3'	116 pb
	Anti-senso	5´ CAG CAG GGC TTC GAT CTG-3'	

Para análise da expressão dos genes *HRPT2* e *Ciclina D1*, foi utilizado o gene β -*actina* como endógeno. Após a seleção do endógeno, torna-se necessário verificar a eficiência de amplificação do endógeno em relação ao gene alvo que será estudado. Para se obter a eficiência de amplificação, é utilizado o valor de *slope*, que corresponde à inclinação da reta passando por diferentes pontos de diluição, sendo o valor ideal igual a -3,33, e o valor de R², que deve ser aproximadamente 0,99. O valor de eficiência ideal tem de variar entre 88 e 105%. Foram realizadas diluições seriadas de uma solução de estoque com concentração conhecida, na qual se obtém uma série com 5 pontos, uma diluição seriada 1:10 e a variação de Ct (Threshold cycle) esperada de 3,3. As reações foram realizadas em um volume total de 20uL, contendo 150ng de cDNA, 0,25uM de cada par de primer e 1x de SYBR Green. As condições de amplificação utilizadas foram 95⁰C por 10 minutos seguidos de 40 ciclos de 95⁰C 15 segundos e 59⁰C por 1 minuto.

O teste de eficiência (Eff%) foi realizado para verificar a expressão do gene endógeno β -*actina* e do gene alvo *ciclina D1*, em diluições seriadas na relação

1:10, em amostra de carcinoma de células escamosas. A eficiência entre o endógeno e o gene alvo mostrou-se próximo a 100%, revelando a melhor dinâmica de amplificação e capacidade total dos primers (Figura 6).

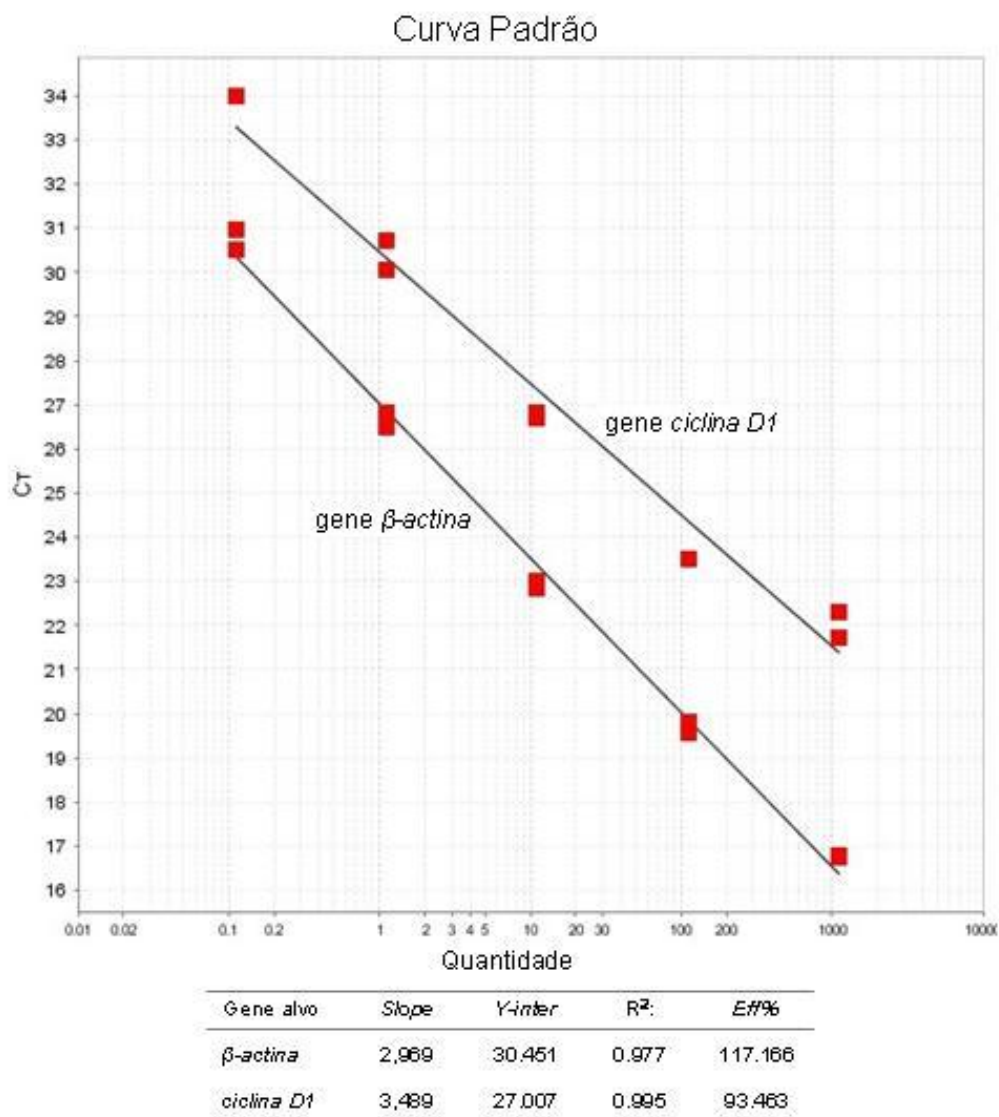


Figura 6. Eficiência de amplificação de aproximadamente 100% do gene endógeno *β-actina* e do gene alvo *ciclina D1* com diluições seriadas (1:10).

Realizou-se também o teste de eficiência (Eff%) para verificar a expressão do endógeno *β-actina* e do gene alvo *HRPT2*, em diluições seriadas na relação

1:10, em amostra de mucosa normal. A eficiência entre o endógeno e o gene alvo mostrou-se próximo a 100%, revelando a melhor dinâmica de amplificação e capacidade total dos primers (Figura 7).

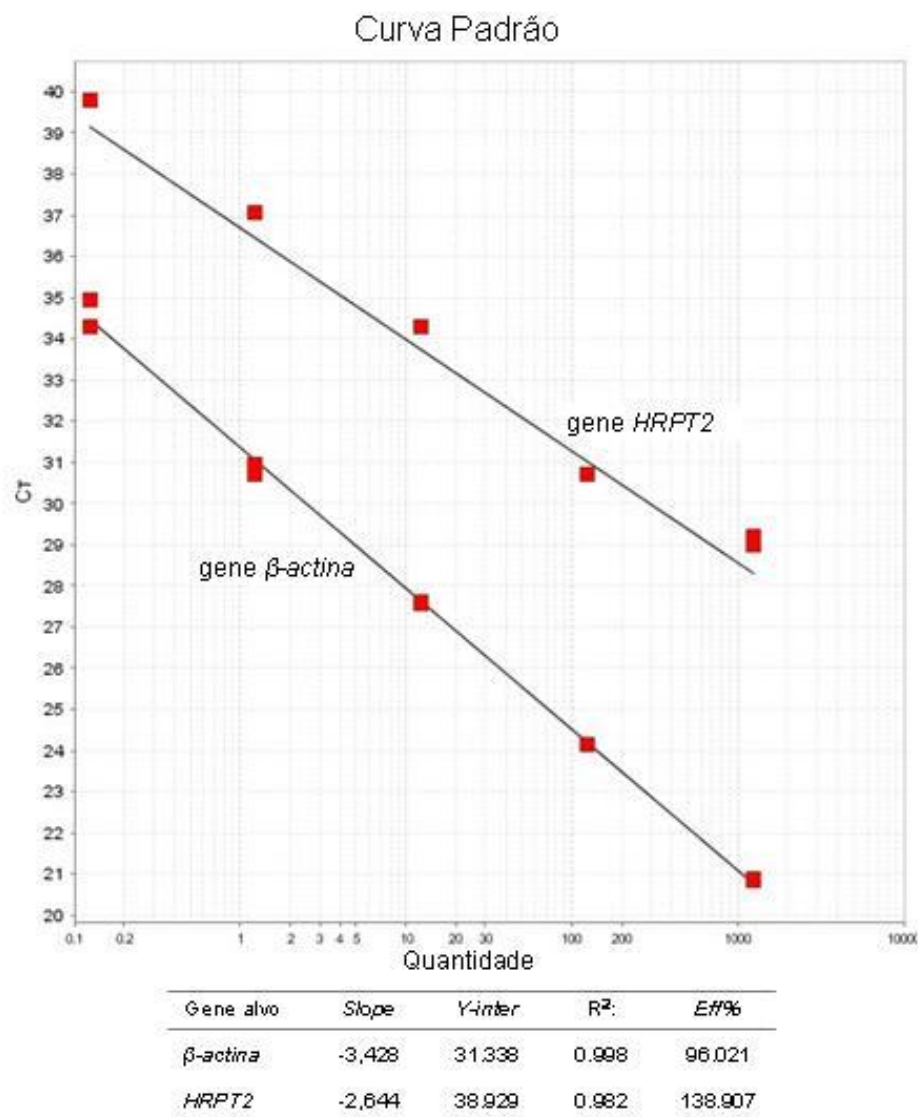


Figura 7. Eficiência de amplificação de aproximadamente 100% do gene endógeno *β-actina* e do gene alvo *HRPT2* com diluições seriadas (1:10).

Para o cálculo da quantificação relativa do nível de expressão, foi utilizado o método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ (Livak & Schmittgen, 2001). O método do $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ou método comparativo de Ct (*Threshold cycle*) é uma equação matemática, na qual as mudanças na expressão gênica são calculadas baseadas nas diferenças entre as amostras calibradoras e as experimentais, normalizadas por uma referência. Vale destacar que o valor inferido à ΔCt equivale à diferença entre o valor da média dos Cts do gene de interesse e a média dos Cts do gene normalizador. Já o cálculo da fórmula $\Delta\Delta Ct$ envolve a subtração entre o valor de ΔCt para cada amostra experimental e o valor de ΔCt para as amostras calibradoras. Neste estudo um *pool* de amostras de mucosa normal foi usado como amostras calibradoras.

Todas as reações foram realizadas em duplicatas e a média obtida foi utilizada para obtenção do resultado final.

4.7.6 Extração de DNA a partir de tecido fresco

O DNA de 5 amostras de displasia fibrosa (casos 1, 3, 4, 5, e 6), de 6 fibromas ossificantes (casos 9, 10, 11, 14, 15 e 16) foi extraído utilizando-se o reagente Tri-Phasis Reagent (BioAgency) e um tampão de extração composto por Tiocianato de Guanidina 4M, citrato de sódio 50mM e TRIS 1M pH 8,0, seguindo as recomendações do fabricante. Foram adicionados 500 uL desse tampão de extração para cada 1mL de trizol utilizado durante a extração inicial do RNA. O protocolo consistiu em homogeneizar a cada 5 minutos e incubar durante 20 minutos em temperatura ambiente a amostra. Após isso, esta foi

centrifugada durante 20 minutos a 15.200g (Centrífuga 5415 D). O sobrenadante, que contém o DNA, foi transferido para um novo eppendorf de 1,5ml e foi acrescentado 1uL de glicogênio (20mg/mL) para ajudar na precipitação do DNA. Após centrifugação, o precipitado de DNA foi lavado com isopropanol (100%) e a amostra foi incubada por 20 minutos em temperatura ambiente. Então, foi realizada uma nova centrifugação durante 30 minutos a 12.800 rpm em temperatura ambiente. Logo após, o sobrenadante foi descartado cuidadosamente e adicionou-se 1mL de etanol (70%) gelado seguido de sua mistura por meio de inversão. Em seguida, centrifugou-se durante 15 min a 15.200g para sedimentação do DNA. O sobrenadante foi descartado, e o DNA ficou secando em temperatura ambiente. O DNA foi ressuspenso em 25uL de água e armazenado a -20°C. Resultados falsos negativos do DNA foram avaliados por meio da amplificação do fragmento do gene endógeno *β-globina* utilizando os primers 5'-CAACTTCATCCACGTTCCACC-3' e 5'-GAAGAGCCAAGGACAGGTAC-3'. As condições de amplificação foram as seguintes: 94°C por 2 minutos seguido de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 56°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos e extensão final por 7 minutos.

4.7.7 Extração de DNA a partir de material parafinado

O DNA das amostras de fibroma ossificante (caso 08* e caso 13) e osteossarcoma (caso 18, caso 19 e caso 20) tiveram seu DNA extraído a partir de material parafinado.

As lâminas histológicas provenientes das biópsias das lesões, descritas anteriormente, foram analisadas por dois patologistas para determinar e limitar o tecido tumoral do tecido normal. Posteriormente a essa análise, foi feita a microdissecção manual dessas amostras, extraindo-se separadamente o DNA do tecido tumoral do tecido normal dos espécimes. A extração do DNA foi realizada através do kit Dneasy Tissue Kit QIAGEN® de acordo com o protocolo do fabricante.

4.7.8 Análise de Perda de Heterozigosidade (LOH)

A perda de heterozigosidade (LOH) é um evento que busca mudanças na dosagem de um alelo gênico em um *locus* específico em relação a outro alelo. Essa mudança na dosagem pode ser causada por mutação de deleção, ou perda de um cromossomo, resultando uma hemizigosidade anormal (van Houten *et al.*, 2000). A LOH pode ser detectada quando um marcador polimórfico para um *locus* se apresenta monomórfico, porque um dos alelos se encontra deletado no tumor.

Os marcadores de microssatélites selecionados foram amplificados pela reação de cadeia da polimerase (PCR). Cada marcador microssatélite foi amplificado pela PCR convencional com um par de oligonucleotídeos (*primers*) específicos marcados com os agentes fluorescentes, previamente descritos (Hunt *et al.*, 2005), como observado na tabela 5 a seguir: A figura 8 ilustra a posição física dos marcadores D1S384 e D1S461 no braço curto do cromossomo 1 que foram selecionados para este estudo e a sua distância relativa ao gene *HRPT2*.

Tabela 5. Marcadores microsatélites

Marcadores	Locus	Sequência de <i>primers</i>	Produto de PCR	Gene relacionado
D1S384	1q25.3	F: CAT CAC ACT GGG GGT TAG G R: GCC TTG TGA AGG TAT ATT GC	149-245 pb	<i>HRPT2</i>
D1S461	1q25.3	F: TTA CTG CAC TCC TGT CTG GG R: TGG GCT ATC AGA AGC CTC TT	234-246 pb	<i>HRPT2</i>

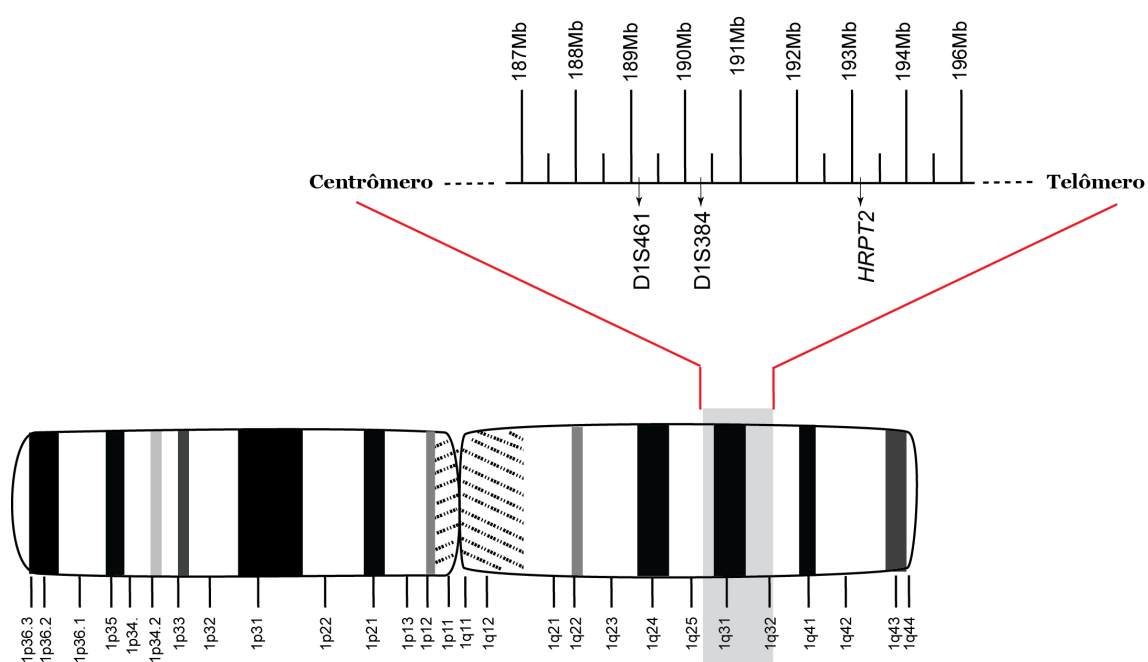


Figura 8. Ideograma do cromossomo 1. Ilustração da posição física dos marcadores D1S384 e D1S461 e a distância relativa ao gene *HRPT2* (Figura cedida por Diniz MG).

Foram incluídas nesta análise 5 displasias fibrosas, 9 fibromas ossificantes e 4 osteossarcomas. As reações de PCR foram realizadas em uma capela de fluxo laminar, com um volume final de 15µL, contendo 0,33µM de cada primer, 2,5mM MgCl₂, 0,25mM dNTP mix, 1,0 x PCR tampão e 0,6U Taq Platinum DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen Life Technologies, Foster City, CA, USA). Foram feitos quarenta e cinco ciclos de amplificação, utilizando um termociclador Mastercycler Gradient (Eppendorf, AG, Hamburg, Germany), com o seguinte programa: desnaturação inicial a 95⁰C por 10 minutos, 96⁰C por 10 segundos, 60⁰C por 30 segundos, 70⁰C por um minuto e extensão final a 72⁰C durante 30 minutos. O gene β-globina foi utilizado como controle para qualidade do DNA. Os produtos da PCR foram verificados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5%, corados pela prata. Após a eletroforese capilar, os produtos do sequenciamento foram analisados no programa Sequencing Analysis 5.3.1 e os dados da LOH foram analisados no programa Genescan software version 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

A LOH foi calculada a partir da relação entre o alelo curto normal e alelo longo normal dividido por alelo curto da lesão e alelo longo da lesão na fórmula (van Houten *et al.* 2000):

$$LOH = \frac{\frac{\text{Altura do alelo curto normal}}{\text{Altura do alelo longo normal}}}{\frac{\text{Altura do alelo curto da lesão}}{\text{Altura do alelo longo da lesão}}}$$

LOH é determinada se um alelo for reduzido na amostra de tecido lesional, quando comparado com o mesmo alelo do DNA normal. O critério de LOH adotou os valores <0.66 ou >1.50 (van Houten *et al.*, 2000). O tecido normal foi analisado primeiramente para avaliar o status da amostra no que diz respeito aos alelos individualmente. Quando um dos microssatélites apresentou na amostra de tecido normal apenas um único pico, esse indivíduo foi considerado homocigoto para o marcador em questão e, portanto, não informativo. Resultados duvidosos levaram à repetição ou exclusão das amostras. Não foi realizada a correção dos fragmentos de amplicons que não foram completamente amplificados (*stutter*) para o marcador D1S384, porque o homocigoto não tinha *stutter*. Em relação ao marcador D1S461, não foi necessário fazer a correção de *stutter*. Todos os casos estudados e as técnicas utilizadas neste trabalho podem ser visualizadas no APENDICE 3.

4.7.9 Análise Estatística

Os testes estatísticos de Mann-Whitney, Correlação de Spearman e Teste Exato de Fisher foram utilizados quando apropriados. Todas as análises estatísticas foram feitas no programa BioEstat 4.0 e valores $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5. RESULTADOS

5. Resultados

5.1 Descrição da amostra e resultados da expressão imunoistoquímica

A amostra estudada consistiu em um total de 43 lesões, sendo 15 displasias fibrosas, 19 fibromas ossificantes e 9 osteossarcomas (Tabela 1). A mediana de idade dos pacientes com displasia fibrosa foi de 27,5 anos (07-56), sendo 12 indivíduos do gênero feminino e 3 indivíduos do gênero masculino, em relação a localização cinco casos estavam em mandíbula e dez casos em maxila. Em relação aos pacientes que apresentavam fibroma ossificante a mediana de idade foi de 28 anos (11-70), sendo 14 do gênero feminino e 5 do gênero masculino, 15 lesões acometiam mandíbula e 4 estavam localizadas na maxila. No pacientes com diagnóstico de osteossarcoma a mediana foi de 34 anos (15-42), seis casos do gênero feminino e 3 casos do gênero masculino, dos quais 5 casos estavam em mandíbula e 4 casos em maxila.

Os casos numerados de 1 a 20 são de amostras de tecido fresco, enquanto os casos numerados de 21 a 43 são de tecido extraído de bloco de parafina.

Um total de 41 amostras foi selecionado para realização da técnica imunoistoquímica dos anticorpos parafibromina e ciclina D1 (Tabela 6). Os resultados globais da imunoistoquímica estão dispostos no gráfico 1.

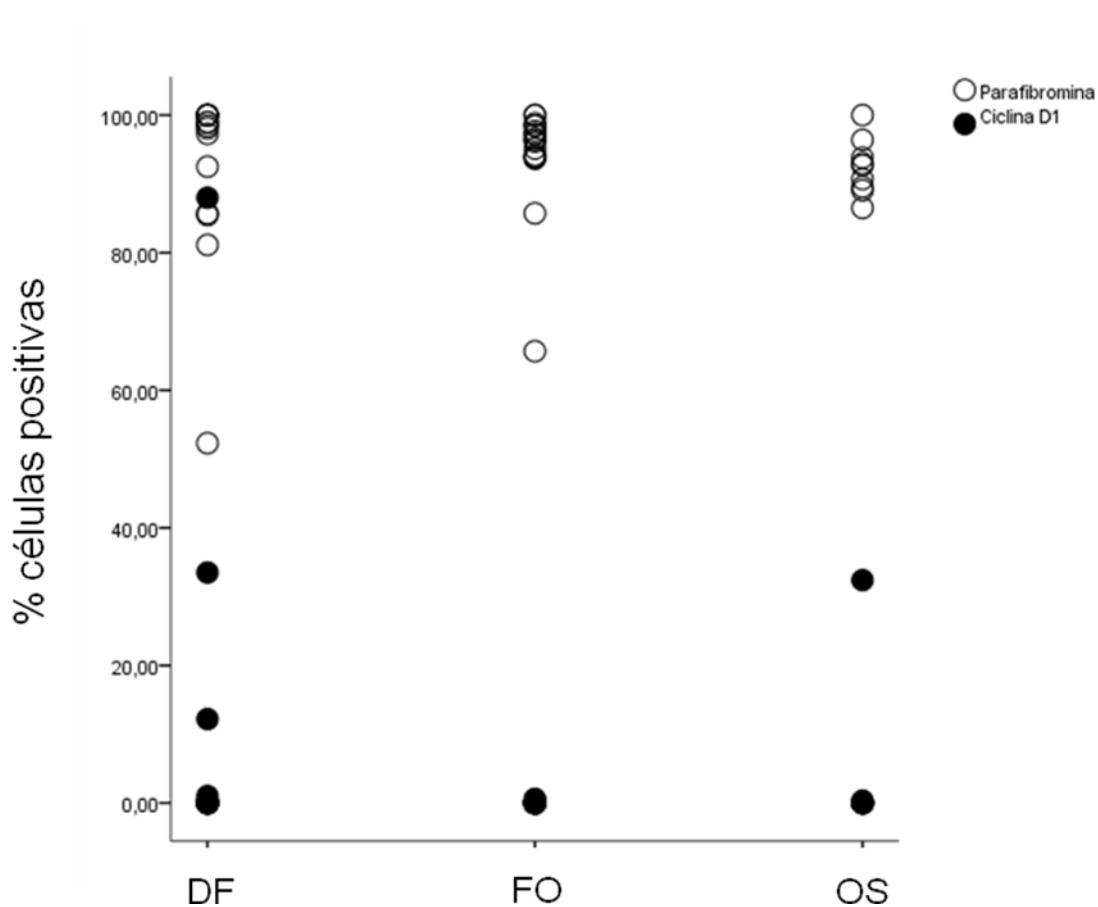


Gráfico 1. Gráfico da porcentagem de células positivas para os anticorpos parafibromina e ciclina D1 das 41 amostras estudadas. DF (displasia fibrosa), FO (fibroma ossificante) e OS (osteossarcoma).

A imunomarcagem das proteínas parafibromina e ciclina D1 foram observadas exclusivamente nos núcleos das células tumorais. A maioria das amostras dos 3 grupos foram fortemente positivas para a parafibromina, contudo, algumas amostras apresentaram também positividade para a ciclina D1 (Figura 9).

Tabela 6. Resultados da expressão imunoistoquímica das proteínas parafibromina e ciclina D1 em percentual de núcleos positivos.

Amostras	Ciclina D1	Parafibromina
	% positividade IIQ	% positividade IIQ
Displasia Fibrosa		
Caso 01	0	85,73
Caso 02	ND	ND
Caso 03	88	100
Caso 04	0	100
Caso 05	0	99
Caso 06	33,5	100
Caso 21	0	100
Caso 22	12	81,13
Caso 23	0	85,47
Caso 24	1	98,44
Caso 25	0	97,28
Caso 26	0	98,08
Caso 27	0	98,94
Caso 28	0	52,32
Caso 29	0	92,50
Fibroma Ossificante		
Caso 07	0	98,43
Caso 08*	0	65,67
Caso 09	0	85,73
Caso 10 ^a	0	100
Caso 11 ^b	0	98,81
Caso 12	0,6	94,20
Caso 13	0,4	97,70
Caso 14	0	96,50
Caso 15	0	100
Caso 16	ND	ND
Caso 30	0	97,27
Caso 31	0	96,59
Caso 32	0	94,04
Caso 33	0	95,13
Caso 34	0,08	93,82
Caso 35	0	93,64
Caso 36	0	97,20
Caso 37	0	96,14
Caso 38	0	98,45
Osteossarcoma		
Caso 17	0	89,56
Caso 18	0	100
Caso 19	0	93
Caso 20	0	86,50
Caso 39	0,34	93,82
Caso 40	0	92,69
Caso 41	32,40	90,72
Caso 42	0	96,39
Caso 43	0	89,05

ND: não disponível; IIQ: imunoistoquímica Caso 08*: recidiva do caso 07. ^a Fibroma ossificante juvenil. ^b: HPT-TM

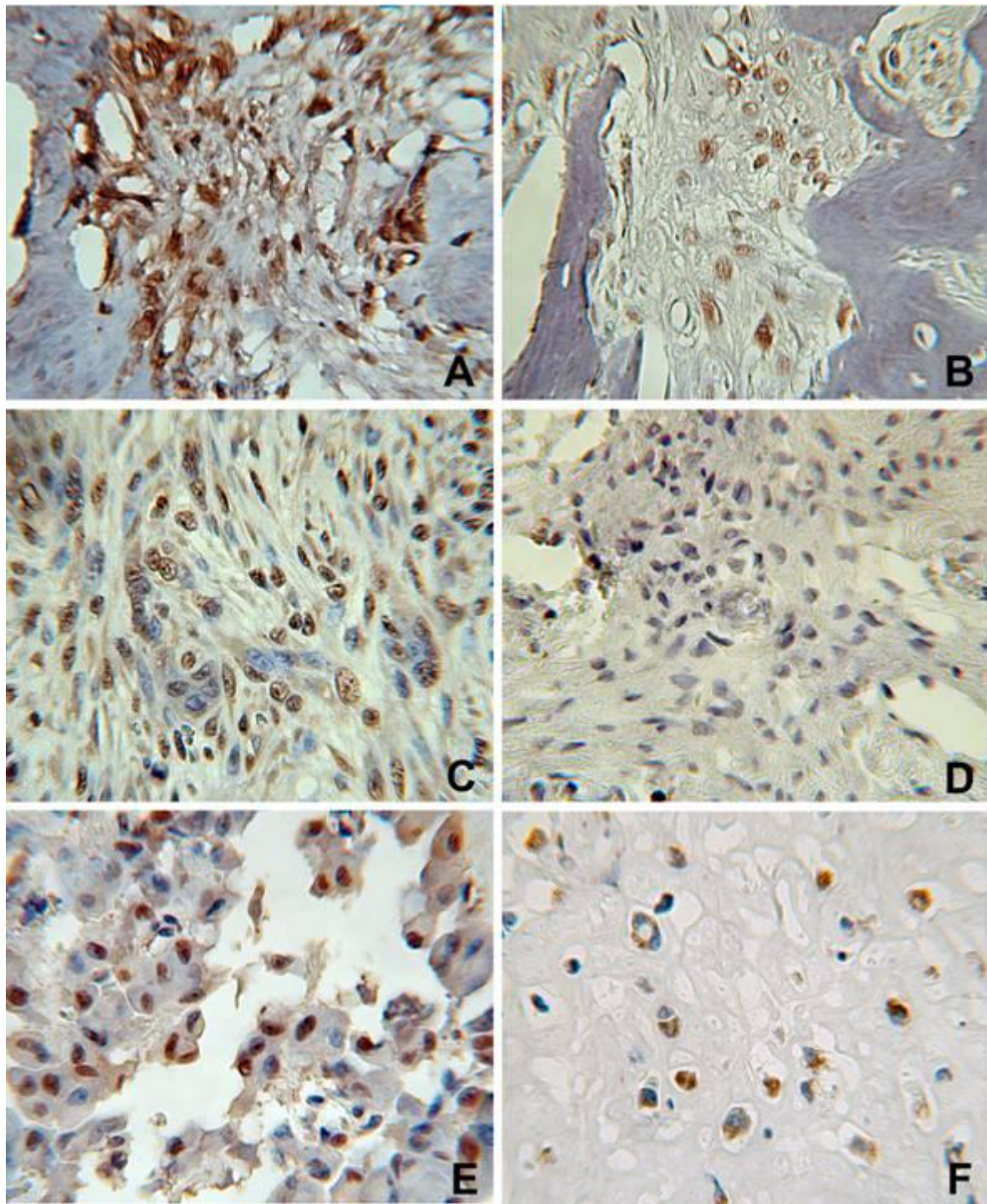


Figura 9. Padrão imunoistoquímico da parafibromina e ciclina D1. A e B (Displasia Fibrosa); C e D (Fibroma Ossificante) e E e F (Osteossarcoma). A, C e E marcação da parafibromina (aumento original $\times 400$); B, D e F marcação da ciclina D1 (aumento original $\times 400$). Observar o padrão de expressão de ambas as proteínas.

Não foi observada diferença estatística entre a DF e FO e a DF e o OS quando avaliada a expressão imunistoquímica da proteína parafibromina ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney). No entanto, as lesões de FO expressaram mais parafibromina que os OS ($p = 0,037$; teste de Mann-Whitney).

Em relação à proteína ciclina D1, não se encontrou diferença entre os grupos DF, FO e OS ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney). Além disso, não se observou correlação entre a expressão da proteína parafibromina com a presença da proteína ciclina D1 ($p > 0,05$; teste de Correlação de Spearman). Por fim, não houve diferença na expressão imunistoquímica da parafibromina entre os grupos positivos para ciclina D1 na imunistoquímica e negativos para ciclina D1 na imunistoquímica ($p > 0,05$; teste de Mann-Whitney).

5.2 Resultados da análise da perda de heterozigosidade (LOH)

O critério utilizado para análise da LOH nos tumores estudados foram os valores $< 0,66$ ou $> 1,50$, com isso foram observados 11 lesões com LOH: 3 de 5 amostras informativas de DF (caso 01, caso 05 e caso 06), 6 de 9 amostras informativas de FO (caso 08, caso 10, caso 11, caso 13, caso 14 e caso 15) e 2 de 2 amostras informativas de OS (caso 17 e caso 18), como observados na tabela 7 e na figura 10. Não foi possível fazer a extração de DNA nos casos 02 e 12.

Tabela 7. Resultados da análise de perda de heterozigosidade (LOH) na região 1q25.3 do gene *HRPT2* das amostras de tecido fresco.

Diagnóstico	Marcador Microsatélite / Locus no cromossomo 1	
	D1S384 / 1q25.3	D1S461 / 1q25.3
Displasia Fibrosa		
Caso 01	●	□
Caso 03	○	□
Caso 04	○	□
Caso 05	○	●
Caso 06	○	●
Fibroma Ossificante		
Caso 07	○	○
Caso 08*	●	●
Caso 09	□	○
Caso 10 ^a	□	●
Caso 11 ^b	●	○
Caso 13	○	●
Caso 14	□	●
Caso 15	○	●
Caso 16	○	○
Osteossarcoma		
Caso 17	□	●
Caso 18	●	□
Caso 19	□	□
Caso 20	□	□

Caso 08*: recidiva do caso 07. ^a Fibroma ossificante juvenil. ^b: HPT-TM. ● LOH (score < 0.66 ou > 1.50). ○ Heterozigoto. □ Homozigoto.

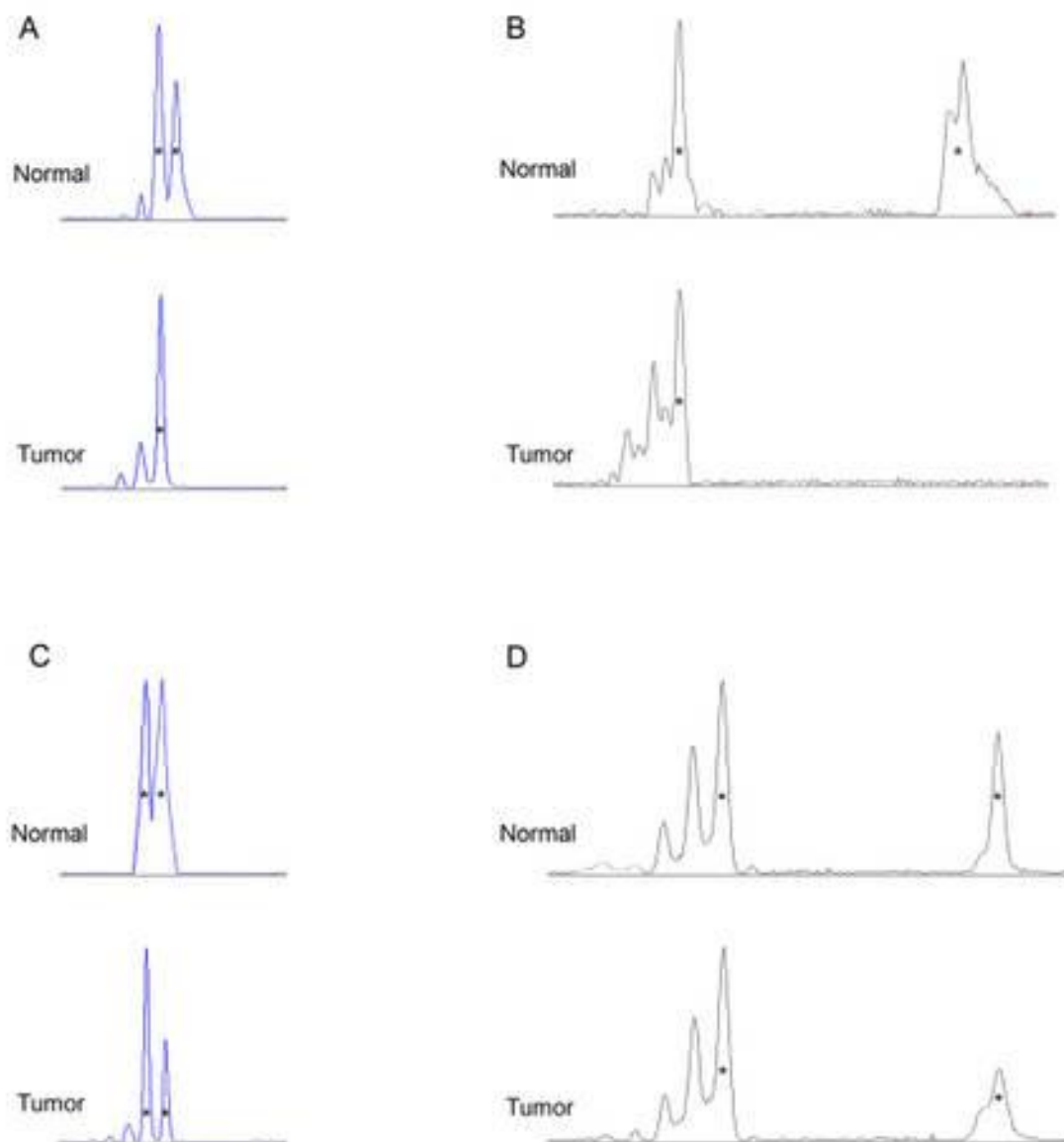


Figura 10. Representação da perda de heteroziguidade (LOH) em microsatélites da região 1q25.3 do gene *HRPT2*. Em A e B é demonstrado à ausência do segundo alelo do DNA tumoral quando comparado ao DNA normal em amostra de recidiva de FO (caso 08*). Em C e D percebe-se a redução do pico correspondente ao segundo alelo do DNA tumoral quando comparado com o DNA normal em amostras de DF. Em todos os casos a análise é positiva para LOH (<0.66 ou >1.50). Em A e C: marcador D1S384. Em B e D: marcador D1S461. *Alelos.

5.3 Resultados do sequenciamento direto do cDNA

Após a análise dos resultados da LOH e do padrão imunoistoquímico, a fim de confirmar se o mRNA de tais amostras apresentava mutação, realizou-se o sequenciamento direto de todos os 17 exons do gene *HRPT2*.

A técnica de PCR foi realizada utilizando-se os 3 pares de primers flanqueando as regiões de exon 1 ao 17, descritos anteriormente na tabela 2.

O fibroma ossificante (caso 07) e a sua recidiva (caso 08) apresentaram deleção c.70delG no exon 1 (Figura 11), o que causou um *stop* códon, ou seja uma parada prematura, gerando uma proteína truncada, no códon 25 (Tabela 8). Além desta, foi vista uma extensa deleção c 1245del GGGCACTGCAATTAGTGTTACAGTACCTTATAGAGTAGTAGACCAGCCCCT TAACTTATGCCTCAAGACTGGGA nos exons 14 e 15 do gene *HRPT2* nesta mesma amostra primária (caso 07). Interessantemente, estas amostras apresentaram positividade imunoistoquímica, para parafibromina, em 98% e 65% das células, respectivamente.

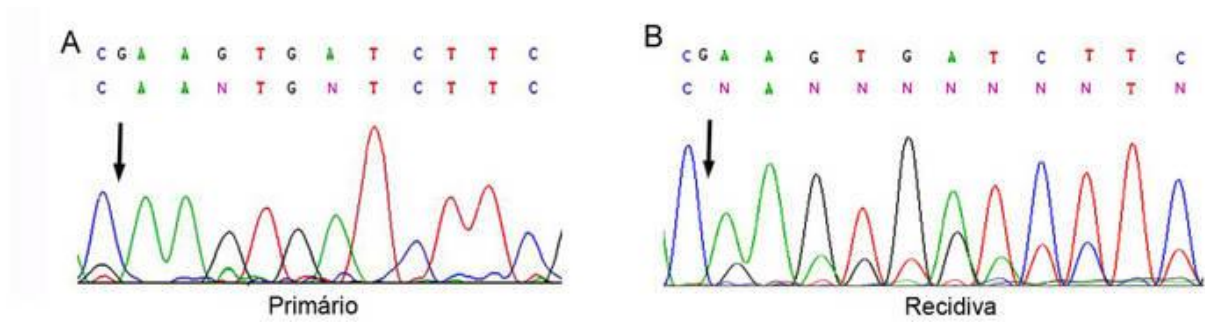


Figura 11. Eletroferograma do fibroma ossificante primário (caso 07) e a sua recidiva (caso 08) mostrando a deleção c.70delG, no exon 1, do gene *HRPT2*. A: tumor primário, B: recidiva. Seta indica o ponto de deleção do nucleotídeo G. Linha superior indica a sequência correta de nucleotídeos (A: adenina, T: timina, C: citosina, G: guanina e N: não é possível distinguir o nucleotídeo).

Tabela 8. Tradução do gene *HRPT2* e a mutação non-sense encontrada no FO (caso 07) e sua recidiva (caso 08).

Número do códon		24	25	26
Nucleotídeo	Wt	GAA	GTG	ATC
	Mt	AAG	TGA	
Aminoácido	Wt	Glicina	Valina	Isoleucina
	Mt	Lisina	Códon de-parada	

Legenda: Wt: selvagem, Mt: mutante

5.4 Resultados da quantificação da transcrição gênica por meio de PCR quantitativo em Tempo Real (qPCR)

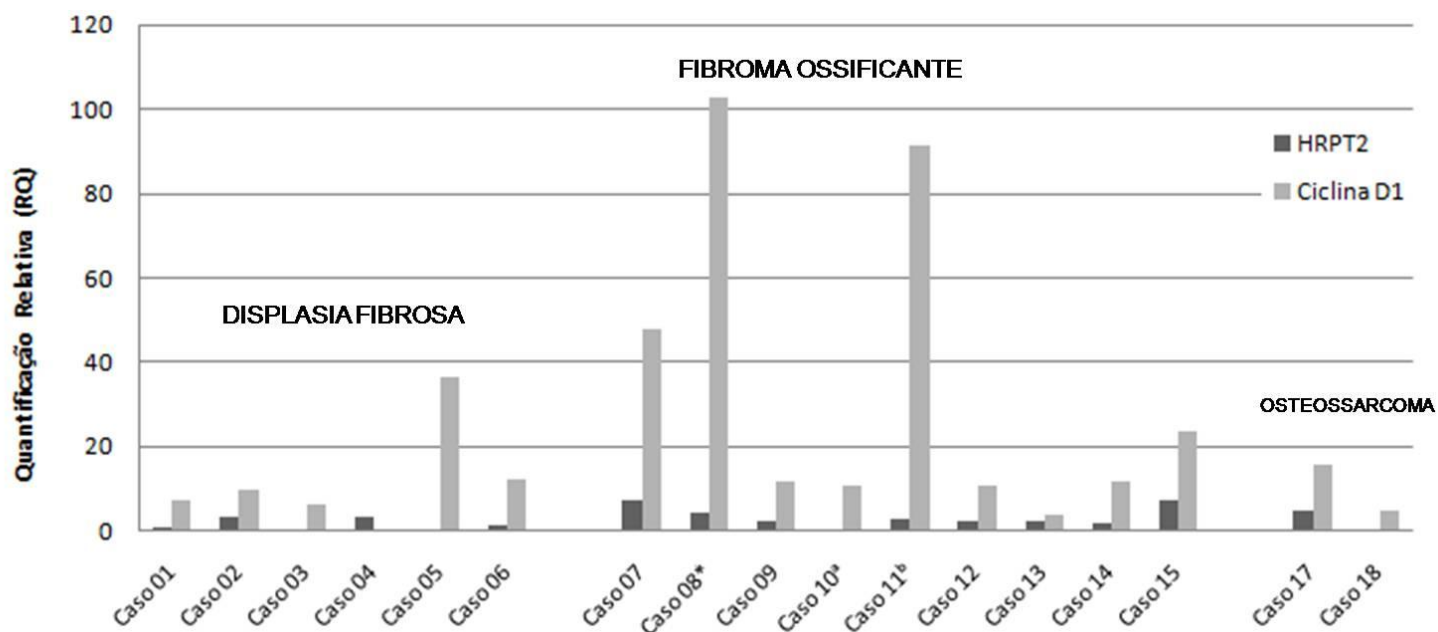
Para completar a análise molecular do gene *HRPT2* e *ciclina D1* em nível transcricional, realizou-se o qPCR nas lesões estudadas.

Os resultados da quantificação relativa do gene *HRPT2* e *ciclina D1* estão dispostos na tabela 9 e gráfico 2.

Tabela 9. Resultados da análise de transcrição do mRNA dos genes *ciclina D1* e *HRPT2* das amostras de tecido fresco.

Diagnóstico	qPCR	
	Gene <i>ciclina D1</i> (RQ)	Gene <i>HRPT2</i> (RQ)
Displasia Fibrosa		
Caso 01	7.246	0.706
Caso 02	9.881	3.085
Caso 03	6.223	0.324
Caso 04	ND	3.304
Caso 05	36.594	0
Caso 06	12.351	1.113
Fibroma Ossificante		
Caso 07	47.954	7.366
Caso 08*	102.882	4.503
Caso 09	12.001	2.281
Caso 10 ^a	10.632	0.372
Caso 11b	91.392	2.627
Caso 12	10.794	2.428
Caso 13	3.905	2.384
Caso 14	11.890	1.198
Caso 15	23.729	7.056
Osteossarcoma		
Caso 17	15.640	4.912
Caso 18	4.973	0

RQ: valores da quantificação relativa; Caso 08*: recidiva do caso 07. ^a Fibroma ossificante juvenil. ^b: HPT-TM ND: não disponível



Caso 08^a: recidiva do caso 07. ^a Fibroma ossificante juvenil. ^b: HPT-TM

Gráfico 2. Gráfico da quantificação relativa (RQ) dos genes *HRPT2* e *ciclina D1*. PCR quantitativo da transcrição do mRNA do gene *HRPT2* (barra preta) e *ciclina D1* (barra cinza) comparado com as mucosas normais (eixo x). Displasia fibrosa (caso 01 ao 06), fibroma ossificante (caso 07 ao 15) e osteossarcoma (caso 17 e 18).

Dos sete fragmentos ósseos normais incluídos neste estudo, dois expressaram *β-actina*, mas não expressaram parafibromina e ciclina D1. As outras cinco amostras restantes foram excluídas da análise, pois apresentaram nas reações de PCR-tempo real um valor de CT muito baixo e discrepante das demais amostras.

Cem por cento (17/17) e 88,2% (15/17) das amostras estudadas apresentaram maior expressão da *ciclina D1* e *HRPT2*, respectivamente, que a mucosa normal (gráfico 2). Entretanto, o caso 05 (DF) e o caso 18 (OS) não apresentaram transcrição de mRNA do gene *HRPT2*. Além disso, não foram

observadas diferenças estatisticamente significantes em nível de transcrição dos genes *HRPT2* e *ciclina D1* entre os grupos DF, FO e OS ($p > 0,05$; Mann-Whitney). Foi observada uma correlação positiva entre a transcrição do mRNA do *HRPT2* e da *ciclina D1* quando feito o teste de Correlação de Spearman ($p = 0,03$, $R = 0,522$). Não foi observada uma correlação entre a expressão imunohistoquímica destas proteínas com a transcrição dos genes quando feito o teste de Correlação de Spearman ($p = 0,8143$).

Em relação à expressão de *ciclina D1* e *HRPT2* no qPCR entre as amostras positivas para ciclina D1 na imunohistoquímica e negativas para ciclina D1 na imunohistoquímica, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes ($p > 0,05$; Mann-Whitney). Além disso, não foi encontrada correlação entre a transcrição de mRNA do *HRPT2* e da *ciclina D1* e a expressão imunohistoquímica de suas respectivas proteínas entre todos os grupos estudados.

A LOH no *locus HRPT2* não mostrou associação com a transcrição da *ciclina D1*, além disso, a quantificação relativa do mRNA do gene *HRPT2* não foi diferente no grupo de lesões que apresentaram LOH comparado com o grupo que não apresentou LOH ($p > 0,05$).

Dois casos de DF (caso 01 e caso 03) e um caso de FOJ (caso 10) expressaram níveis muito baixos de mRNA *HRPT2*. Interessantemente, o caso 01 e o caso 10 mostraram LOH no *locus* 1q25.3 próximo ao gene *HRPT2*. Contudo, estes casos apresentaram positividade imunohistoquímica para parafibromina em 85% e 100%, respectivamente. Além disso, não mostraram alterações na análise do sequenciamento do cDNA.

6. DISCUSSÃO

6. Discussão

As lesões de displasia fibrosa (DF), de fibroma ossificante (FO) e de osteossarcoma (OS) são consideradas lesões ósseo-relacionadas pela Organização Mundial de Saúde (2005). Em um estudo prévio, realizado no laboratório da Faculdade de Odontologia, da UFMG, pelos pesquisadores Pimenta *et al.* (2006), foi feito o seqüenciamento do gene *HRPT2*. Pimenta *et al.* (2006) observaram uma mutação não germinativa do DNA deste gene na amostra primária de fibroma ossificante do tipo esporádico estudada neste trabalho (caso 07). Não obstante, Sarquis *et al.* (2008), não observaram esta mesma mutação em nível de cDNA de adenoma de paratireóides. Neste trabalho, levantou-se a hipótese de que a DF e o OS poderiam também apresentar alterações do gene *HRPT2*. Sendo assim, propôs-se uma avaliação do gene *HRPT2* e sua proteína parafibromina no intuito de caracterizar, por meio das técnicas de biologia molecular (LOH, sequenciamento direto dos transcritos mRNA, PCR quantitativo em tempo real e imunohistoquímica), possíveis alterações que possam ter levado ao desenvolvimento destas doenças.

Neste estudo foi investigada a possível inativação do gene supressor de tumor *HRPT2* por meio da LOH. A LOH é definida quando 50% do pico correspondente a um dos alelos do tumor são perdidos, contudo, a literatura mostra variações nos scores utilizados para definir a LOH (Zhou *et al.*, 2004; Hunt *et al.*, 2005; Rao *et al.*, 2005; Yip *et al.*, 2008; Pan *et al.*, 2010; van Houten *et al.*, 2010). Seis de nove (66%) casos de FO, 3/5 (60%) casos de DF e 2 (100%) casos de osteossarcoma apresentaram LOH no *locus* 1q25.3 do gene

HRPT2. Este é o primeiro trabalho, até a presente data, a estudar LOH nas lesões ósseo-relacionadas encontradas na cavidade oral. A LOH foi um evento relativamente frequente nos casos estudados. Contudo, como nem todas as amostras demonstraram alterações genéticas, esta não deve ser uma ferramenta utilizada como método de diagnóstico diferencial. Adicionalmente, este é o primeiro trabalho a estudar LOH do gene *HRPT2* em FO da cavidade oral.

A proteína parafibromina, codificada pelo gene *HRPT2*, tem a capacidade de inibir o crescimento e a proliferação celular, além de induzir a parada do ciclo celular na fase G1 (Farber *et al.*, 2010), por meio da metilação da histona H3 durante a transcrição, diminuindo assim a quantidade de ciclina D1 (Woodard *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2006). A presença de mutações tanto germinativas quanto somáticas no gene *HRPT2* nos tumores de paratireóide esporádicos e familiares reforça a idéia de que o gene *HRPT2* é um gene supressor de tumor (Howell *et al.*, 2003; Shattuck *et al.*, 2003; Bradley *et al.*, 2006)

A parafibromina foi utilizada pela primeira vez por Tan *et al.* (2004) no diagnóstico diferencial de carcinomas de paratireóide. Estes autores observaram completa ausência ou uma perda focal da expressão nuclear da proteína parafibromina na maioria dos casos de carcinoma de paratireóide, demonstrando uma sensibilidade de 96% e uma especificidade de 99% deste anticorpo. Diante destes achados, sugeriu-se, então, que a ausência de parafibromina poderia indicar mutações no gene *HRPT2* (Tan *et al.*, 2004; Gill *et al.*, 2006; Juhlin *et al.*, 2007).

Mais de 68 tipos de mutações heterozigóticas germinativas já foram descritas nas famílias com síndrome do hiperparatireoidismo (HPT-TM e HPFI), sendo

que a grande maioria destas mutações resulta em uma proteína truncada ou em uma forma inativa da parafibromina (Cavaco *et al.*, 2011; Newey *et al.*, 2009; Newey *et al.*, 2010). Não obstante, a presença de imunoeexpressão da parafibromina pode ser observada em alguns casos de carcinoma de paratireoide, independentemente se há ou não uma mutação do gene *HRPT2* (Juhlin *et al.*, 2007). Aproximadamente 30% dos casos de carcinoma de paratireoide não apresentam mutação deste gene (Zhang *et al.*, 2006; Juhlin *et al.*, 2007). Neste trabalho, encontrou-se mutação em um caso de FO e na sua recidiva, no entanto, estes tumores apresentaram expressão imunohistoquímica da proteína parafibromina codificada pelo *HRPT2*. Este dado sugere que o FO pode surgir devido à haploinsuficiência do gene *HRPT2*.

Um fato importante na interpretação imunohistoquímica da proteína parafibromina é que parte das mutações germinativas e somáticas já estabelecidas é do tipo *missense* ao invés dos tipos mais comuns *nonsense* e *frameshift* (Newey *et al.*, 2010). As mutações do tipo *missense*, em teoria, produzem uma proteína de tamanho normal, porém não funcional (Juhlin & Höög *et al.*, 2010). Esta proteína defeituosa poderia ser reconhecida pelo anticorpo. Sendo assim, a imunoeexpressão da parafibromina, isoladamente, como marcador de diagnóstico é limitado e não deveria substituir nenhum teste genético.

Neste estudo todas as amostras, exceto um DF e um OS, expressaram transcritos mRNA do gene *HRPT2*. Interessantemente, estas duas amostras também mostraram LOH no *locus* 1q25.3 próximo ao gene *HRPT2*. Pimenta *et al.* (2006) descreveram que somente o transcrito do tipo selvagem foi detectado no FO, sugerindo que o alelo mutado não foi transcrito, ou, se transcrito, os

produtos de mRNA eram altamente instáveis e seriam rapidamente degradados. Howell *et al.* (2003) não conseguiram detectar transcritos de *splice* aberrantes gerados por carcinomas de paratireóide esporádicos. Moon *et al.* (2010) quantificaram os transcritos de mRNA do gene *HRPT2* na síndrome do HPT-TM resultantes das anormalidades de *splice* (através da técnica de qPCR) e encontraram que os mRNAs eram instáveis e que a parafibromina traduzida destes mRNAs eram truncadas e inativas, possivelmente degradadas de forma rápida.

O oncogene *ciclina D1* é um importante regulador das quinases (quinase dependente de ciclina) que controla a progressão das células durante o ciclo celular (Motokura *et al.*, 1991). A parafibromina possui propriedades antiproliferativas e habilidade de inibir a expressão da proteína ciclina D1 (Arnold *et al.*, 2002; Woodard *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2010) sugerindo assim, um modelo para formação de neoplasias através da perda da função da proteína parafibromina. Neste trabalho, encontrou-se uma correlação positiva entre os níveis de transcrição do mRNA do *HRPT2* e *ciclina D1* apesar de não ter sido identificada uma correlação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas parafibromina e ciclina D1. Embora estes dados não estejam de acordo com a possível ação inibitória do *HRPT2* sobre a ciclina D1, esta ação pode ser indireta. Outros modelos experimentais podem ser utilizados para a sua elucidação. Além disso, devemos lembrar que repressão da tradução através de mecanismos epigenéticos como a ação dos miRNAs pode também colaborar para este fenômeno. O mecanismo molecular detalhado de como a parafibromina regula a ciclina D1 continua obscuro (Yang *et al.*, 2010).

Os resultados sugerem que alterações moleculares no gene *HRPT2* foram encontradas nas lesões ósseo-relacionadas estudadas e a expressão da proteína parafibromina nem sempre está interligada às alterações moleculares do gene *HRPT2*.

7. CONCLUSÕES

7. Conclusões

- Apesar da mutação no gene *HRPT2* ter sido encontrada somente em alguns casos de fibroma ossificante, LOH neste gene é também observada no fibroma ossificante juvenil, displasia fibrosa e osteossarcoma.
- A mutação encontrada gerou uma proteína truncada, contudo este evento não mostrou associação com o nível de transcrição dos genes estudados.
- A presença de mutação ou LOH não foi associada a alterações na transcrição do gene ou à expressão da proteína do gene *HRPT2*.
- Aumento da transcrição do mRNA do gene *HRPT2* está correlacionado com o aumento da transcrição do gene *CCND1/Ciclina D1*, embora os mecanismos relacionados a este evento sejam desconhecidos.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

1. Adami S, Marcocci C, Gatti D. Epidemiology of primary hyperparathyroidism in Europe. **J Bone Miner Res.** 17: 18-23, 2002.
2. Agarwal SK, Simonds WF, Marx SJ. The parafibromin tumor suppressor protein interacts with actin-binding proteins actinin-2 and actinin-3. **Mol Cancer.** 7: 65, 2008.
3. Ahmad R, Hammond JM. Primary, secondary, and tertiary hyperparathyroidism. **Otolaryngol Clin North Am.** 37:701-13, 2004.
4. Aldred MJ, Talacko AA, Savarirayan R, Murdolo V, Mills AE, Radden BG, Alimov A, Villablanca A, Larsson C. Dental findings in a family with hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome and a novel HRPT2 gene mutation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 01:212-8, 2006.
5. Amin R & Ling R. Case report: malignant fibrous histiocytoma following radiation therapy of fibrous dysplasia. **Br J Radiol.** 68: 1119-22, 1995.
6. Arnold A, Motokura T, Bloom T, Kronenberg H, Ruderman J, Jüppner H, Kim HG. The putative oncogene PRAD1 encodes a novel cyclin. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** 56: 93-7, 1991.
7. Arnold A, Shattuck TM, Mallya SM, Krebs LJ, Costa J, Gallagher J, Wild Y, Saucier K. Molecular pathogenesis of primary hyperparathyroidism. **J Bone Miner Res.** 17: 30-6, 2002.
8. Baldin V, Lukas J, Marcote MJ, Pagano M, Draetta G. Cyclin D1 is a nuclear protein required for cell cycle progression in G1. **Genes Dev.** 7: 812-21, 1993.

9. Bennett JH, Thomas G, Evans AW, Speight PM. Osteosarcoma of the jaws: a 30-year retrospective review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 90: 323-32, 2000.
10. Berger AH, Knudson AG, Pandolfi PP. A continuum model for tumour suppression. **Nature.** 10;476:163-9, 2011.
11. Betz JL, Chang M, Washburn TM, Porter SE, Mueller CL, Jaehning JA. Phenotypic analysis of Paf1/RNA polymerase II complex mutations reveals connections to cell cycle regulation, protein synthesis, and lipid and nucleic acid metabolism. **Mol Genet Genomics.** 268: 272-85, 2002.
12. Bianco P, Riminucci M, Majolagbe A, Kuznetsov SA, Collins MT, Mankani MH, Corsi A, Bone HG, Wientroub S, Spiegel AM, Fisher LW, Robey PG. Mutations of the GNAS1 gene, stromal cell dysfunction, and osteomalacic changes in non-McCune-Albright fibrous dysplasia of bone. **J Bone Miner Res.** 15: 120-8, 2000.
13. Bradley KJ, Bowl MR, Williams SE, Ahmad BN, Partridge CJ, Patmanidi AL, Kennedy AM, Loh NY, Thakker RV. Parafibromin is a nuclear protein with a functional monopartite nuclear localization signal. **Oncogene.** 26: 1213-21, 2007.
14. Bradley KJ, Cavaco BM, Bowl MR, Harding B, Cranston T, Fratter C, Besser GM, Conceição Pereira M, Davie MW, Dudley N, Leite V, Sadler GP, Seller A, Thakker RV. Parafibromin mutations in hereditary hyperparathyroidism syndromes and parathyroid tumours. **Clin Endocrinol (Oxf).** 64: 299-306, 2006.

15. Bradley KJ, Hobbs MR, Buley ID, Carpten JD, Cavaco BM, Fares JE, Laidler P, Manek S, Robbins CM, Salti IS, Thompson NW, Jackson CE, Thakker RV. Uterine tumours are a phenotypic manifestation of the hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. **J Intern Med.** 257: 18-26, 2005.
16. Brannon RB & Fowler CB. Benign fibro-osseous lesions: a review of current concepts. **Adv Anat Pathol.** 8: 126-43, 2001.
17. Carpten JD, Robbins CM, Villablanca A, Forsberg L, Presciuttini S, Bailey-Wilson J, Simonds WF, Gillanders EM, Kennedy AM, Chen JD, Agarwal SK, Sood R, Jones MP, Moses TY, Haven C, Petillo D, Leotlela PD, Harding B, Cameron D, Pannett AA, Höög A, Heath H 3rd, James-Newton LA, Robinson B, Zarbo RJ, Cavaco BM, Wassif W, Perrier ND, Rosen IB, Kristoffersson U, Turnpenny PD, Farnebo LO, Besser GM, Jackson CE, Morreau H, Trent JM, Thakker RV, Marx SJ, Teh BT, Larsson C, Hobbs MR. HRPT2, encoding parafibromin, is mutated in hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. **Nat Genet.** 32: 676-80, 2002.
18. Cavaco BM, Barros L, Pannett AA, Ruas L, Carneiro M, Ruas MM, Krausz T, Santos MA, Sobrinho LG, Leite V, Thakker RV. The hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome in a Portuguese kindred. **QJM.** 94: 213-22, 2001.
19. Cavaco BM, Santos R, Félix A, Carvalho D, Lopes JM, Domingues R, Sirgado M, Rei N, Fonseca F, Santos JR, Sobrinho L, Leite V. Identification of de novo germline mutations in the HRPT2 gene in two

- apparently sporadic cases with challenging parathyroid tumor diagnoses. **Endocr Pathol.** 22:44-52, 2011.
20. Chapurlat RD. Medical therapy in adults with fibrous dysplasia of bone. **J Bone Miner Res.** 21: 114-9, 2006.
 21. Chapurlat RD & Orcel P. Fibrous dysplasia of bone and McCune-Albright syndrome. **Best Pract Res Clin Rheumatol.** 22: 55-69, 2008.
 22. Chapurlat RD, Hugueny P, Delmas PD, Meunier PJ. Treatment of fibrous dysplasia of bone with intravenous pamidronate: long-term effectiveness and evaluation of predictors of response to treatment. **Bone.** 35: 235-42, 2004.
 23. Chen JD, Morrison C, Zhang C, Kahnoski K, Carpten JD, Teh BT. Hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome. **Intern Med.** 253: 634-42, 2003.
 24. Chindia ML. Osteosarcoma of the jaw bones. **Oral Oncol.** 37: 545-7, 2001.
 25. Cohen MM Jr & Howell RE. Etiology of fibrous dysplasia and McCune-Albright syndrome. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 28: 366-71, 1999.
 26. Costanzi MA & Velasco e Cruz AA. McCune Albright syndrome - diffuse orbital involvement due to fibrous dysplasia: a case report. **Arq Bras Oftalmol.** 70: 1021-3, 2007.
 27. Cruz AA, Alencar VM, Figueiredo AR, de Paula S, Eichenberger GC, Chahud F, Pedrosa MS. Ossifying fibroma: a rare cause of orbital inflammation. **Ophthal Plast Reconstr Surg.** 24: 107-12, 2008.

28. De Araujo PI, Soares VY, Queiroz AL, Santos AM, Nascimento LA. Sarcomatous transformation in the McCune-Albright syndrome. **Oral Maxillofac Surg.** 3, 2011.
29. DeLellis RA. Parathyroid carcinoma: an overview. **Adv Anat Pathol.** 12: 53-61, 2005.
30. Delgado R, Maafs E, Alfeiran A, Mohar A, Barrera JL, Zinser J, Beltran A. Osteosarcoma of the jaw. **Head Neck.** 16: 246-52, 1994.
31. DiCaprio MR & Enneking WF. Fibrous dysplasia: Pathophysiology, evaluation, and treatment. **J Bone Joint Surg Am.** 87: 1848-64, 2005.
32. DiMeglio LA. Bisphosphonate therapy for fibrous dysplasia. **Pediatr Endocrinol Rev.** 4: 440-5, 2007.
33. Diniz MG, Borges ER, Pimenta FJ, De Mesquita Netto AC, De Marco L, Gomez RS, Gomes CC. Evidence of molecular alterations in the tumour suppressor gene WWOX in benign and malignant bone related lesions of the jaws. **Oncol Rep.** 25:499-502, 2011.
34. Doganavsargil B, Argin M, Kececi B, Sezak M, Sanli UA, Oztop F. Secondary osteosarcoma arising in fibrous dysplasia, case report. **Arch Orthop Trauma Surg.** 129:439-44, 2009.
35. Dujardin F, Binh MB, Bouvier C, Gomez-Brouchet A, Larousserie F, Muret A, Louis-Brennetot C, Aurias A, Coindre JM, Guillou L, Pedeutour F, Duval H, Collin C, de Pinieux G. MDM2 and CDK4 immunohistochemistry is a valuable tool in the differential diagnosis of low-grade osteosarcomas and other primary fibro-osseous lesions of the bone. **Mod Pathol.** 24:624-37, 2011.

36. 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.** 93: 296-304, 2002.
37. Eversole R, Su L, ElMofty S. Benign fibro-osseous lesions of the craniofacial complex. A review. **Head Neck Pathol.** 2:177-202, 2008.
38. Fabbro M & Henderson BR. Regulation of tumor suppressors by nuclear-cytoplasmic shuttling. **Exp Cell Res.** 282: 59-69, 2003.
39. Farber LJ, Kort EJ, Wang P, Chen J, Teh BT. The tumor suppressor parafibromin is required for posttranscriptional processing of histone mRNA. **Mol Carcinog.** 49:215-23, 2010.
40. Fernandes R, Nikitakis NG, Pazoki A, Ord RA. Osteogenic sarcoma of the jaw: a 10-year experience. **J Oral Maxillofac Surg.** 65: 1286-91, 2007.
41. Garrington GE, Scofield HH, Cornyn J, Hooker SP. Osteosarcoma of the jaws: Analysis of 56 cases. **Cancer.** 20: 377-91, 1967.
42. Gill AJ, Clarkson A, Gimm O, Keil J, Dralle H, Howell VM, Marsh DJ. Loss of nuclear expression of parafibromin distinguishes parathyroid carcinomas and hyperparathyroidism-jaw tumor (HPT-JT) syndrome-related adenomas from sporadic parathyroid adenomas and hyperplasias. **Am J Surg Pathol.** 30:1140-9, 2006.
43. Gillett CE & Barnes DM. Demystified cell cycle. **Mol Pathol.** 51: 310-6, 1998.
44. Gunaseelan R, Anantanarayanan P, Ravindramohan E, Ranganathan K. Large cemento-ossifying fibroma of the maxilla causing proptosis: a

- case report. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 104: 21-5, 2007.
45. Guru SC, Goldsmith PK, Burns AL, Marx SJ, Spiegel AM, Collins FS, Chandrasekharappa SC. Menin, the product of the MEN1 gene, is a nuclear protein. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 95: 1630-4, 1998.
46. Ha PK, Eisele DW, Frassica FJ, Zahurak ML, McCarthy EF. Osteosarcoma of the head and neck: a review of Johns Hopkins experience. **Laryngoscope.** 109: 964-9, 1999.
47. Hahn MA & Marsh DJ. Identification of a functional bipartite nuclear localization signal in the tumor suppressor parafibromin. **Oncogene.** 24: 6241-8, 2005.
48. Hall M & Peters G. Genetic alterations of cyclins, cyclin-dependent kinases, and Cdk inhibitors in human cancer. **Adv Cancer Res.** 68: 67-108, 1996.
49. Hart ES, Kelly MH, Brillante B, Chen CC, Ziran N, Lee JS, Feuillan P, Leet AI, Kushner H, Robey PG, Collins MT. Onset, progression, and plateau of skeletal lesions in fibrous dysplasia and the relationship to functional outcome. **J Bone Miner Res.** 22: 1468-74, 2007.
50. Hartwell LH & Kastan MB. Cell cycle control and cancer. **Science.** 266: 1821-8, 1994.
51. Hasselblatt M, Jundt G, Greiner C, Rama B, Schmä F, Iglesias-Rozas JR, van de Nes JA, Paulus W. Juvenile psammomatoid ossifying fibroma of the neurocranium. Report of four cases. **J Neurosurg.** 102:1151-4, 2005.

52. Haven CJ, Wong FK, van Dam EW, van der Juijt R, van Asperen C, Jansen J, Rosenberg C, de Wit M, Roijers J, Hoppener J, Lips CJ, Larsson C, Teh BT, Morreau H. A genotypic and histopathological study of a large Dutch kindred with hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. **J Clin Endocrinol Metab.** 85: 1449-54, 2000.
53. High CL, Frew AL Jr, Glass RT. Osteosarcoma of the mandible: Report of a case. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol.** 45: 678-84, 1978.
54. Howell VM, Haven CJ, Kahnoski K, Khoo SK, Petillo D, Chen J, Fleuren GJ, Robinson BG, Delbridge LW, Philips J, Nelson AE, Krause U, Hammje K, Dralle H, Hoang-Vu C, Gimm O, Marsh DJ, Morreau H, Teh BT. HRPT2 mutations are associated with malignancy in sporadic parathyroid tumours. **J Med Genet.** 40: 657-63, 2003.
55. Hunt JL, Carty SE, Yim JH, Murphy J, Barnes L. Allelic loss in parathyroid neoplasia can help characterize malignancy. **Am J Surg Pathol.** 29: 1049-55, 2005.
56. Hunter T & Pines J. Cyclins and cancer II: Cyclin D and CDK inhibitors come of age. **Cell.** 79: 573-82, 1994.
57. Huvos AG. Bone tumours: diagnosis, treatment, and prognosis. **Philadelphia: WB Saunders** 2nd ed; 88-156, 1991.
58. Inoue H, Miki H, Oshimo K, Tanaka K, Monden Y, Yamamoto A, Kagawa S, Sano N, Hayashi E, Nagayama M, *et al.* Familial hyperparathyroidism associated with jaw fibroma: case report and literature review. **Clin Endocrinol (Oxf).** 43: 225-9, 1995.
59. Jackson CE. Hereditary hyperparathyroidism associated with recurrent pancreatitis. **Ann Intern Med.** 49: 829-36, 1958.

60. Jackson CE, Norum RA, Boyd SB, Talpos GB, Wilson SD, Taggart RT, Mallette LE Hereditary hyperparathyroidism and multiple ossifying jaw fibromas: a clinically and genetically distinct syndrome. **Surgery**. 108:1006-12, 1990.
61. Jackson CE. A 50 year perspective on endocrine neoplasia: clinic to genes and back. **J Intern Med**. 243: 419-23, 1998.
62. Juhlin CC, Villablanca A, Sandelin K, Haglund F, Nordenström J, Forsberg L, Bränström R, Obara T, Arnold A, Larsson C, Höög A. Parafibromin immunoreactivity: its use as an additional diagnostic marker for parathyroid tumor classification. **Endocr Relat Cancer**. 14: 501-12, 2007.
63. Juhlin CC, Höög A. Parafibromin as a diagnostic instrument for parathyroid carcinoma-lone ranger or part of the posse? **Int J Endocrinol**. 2010:324964, 2010.
64. Junior AT, de Abreu Alves F, Pinto CA, Carvalho AL, Kowalski LP, Lopes MA. Clinicopathological and immunohistochemical analysis of twenty-five head and neck osteosarcomas. **Oral Oncol**. 39: 521-30, 2003.
65. Kaushik S, Smoker WR, Frable WJ. Malignant transformation of fibrous dysplasia into chondroblastic osteosarcoma. **Skeletal Radiol**. 31: 103-6, 2002.
66. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 68: 820-3, 1971.
67. Krogan NJ, Dover J, Wood A, Schneider J, Heidt J, Boateng MA, Dean K, Ryan OW, Golshani A, Johnston M, Greenblatt JF, Shilatifard A. The

- Paf1 complex is required for histone H3 methylation by COMPASS and Dot1p: linking transcriptional elongation to histone methylation. **Mol Cell.** 11: 721-9, 2003.
68. Krogan NJ, Kim M, Ahn SH, Zhong G, Kobor MS, Cagney G, Emili A, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt JF. RNA polymerase II elongation factors of *Saccharomyces cerevisiae*: a targeted proteomics approach. **Mol Cell Biol.** 22: 6979-92, 2002.
69. Krogan NJ, Kim M, Tong A, Golshani A, Cagney G, Canadien V, Richards DP, Beattie BK, Emili A, Boone C, Shilatifard A, Buratowski S, Greenblatt J. Methylation of histone H3 by Set2 in *Saccharomyces cerevisiae* is linked to transcriptional elongation by RNA polymerase II. **Mol Cell Biol.** 23: 4207-18, 2003.
70. Ladanyi M, Cha C, Lewis R, Jhanwar SC, Huvos AG, Healey JH. MDM2 gene amplification in metastatic osteosarcoma. **Cancer Res.** 53: 16-8, 1993.
71. Lanzkowski P. Malignant bone tumors. In: Redner A, editor. **Manual of pediatric hematology and oncology, 3rd ed.** London: Academic press. : 555-70, 2000.
72. Laskar S, Basu A, Muckaden MA, D'Cruz A, Pai S, Jambhekar N, Tike P, Shrivastava SK. Osteosarcoma of the head and neck region: Lessons learned from a single-institution experience of 50 patients. **Head Neck.** 30:1020-6, 2008.
73. Lee PK, Jarosek SL, Virnig BA, Evasovich M, Tuttle TM. Trends in the incidence and treatment of parathyroid cancer in the United States. **Cancer.** 109: 1736-41, 2007.

74. Levine MA, Modi WS, O'Brien SJ. Mapping of the gene encoding the alpha subunit of the stimulatory G protein of adenylyl cyclase (GNAS1) to 20q13.2---q13.3 in human by in situ hybridization. **Genomics**. 11: 478-9, 1991.
75. Liens D, Delmas PD, Meunier PJ. Long-term effects of intravenous pamidronate in fibrous dysplasia of bone. **Lancet**. 343: 953-4, 1994.
76. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**. 25:402-8, 2001
77. Lopes MA, Nikitakis NG, Ord RA, Sauk J Jr. Amplification and protein expression of chromosome 12q13-15 genes in osteosarcomas of the jaws. **Oral Oncol**. 37: 566-71, 2001.
78. MacDonald-Jankowski DS. Fibro-osseous lesions of the face and jaws. **Clin Radiol**. 59: 11-25, 2004.
79. MacDonald-Jankowski DS. Ossifying fibroma: a systematic review. **Dentomaxillofac Radiol**. 38: 495-513, 2009.
80. Macdonald-Jankowski DS & Li TK. Fibrous dysplasia in a Hong Kong community: the clinical and radiological features and outcomes of treatment. **Dentomaxillofac Radiol**. 38: 63-72, 2009.
81. MacDonald-Jankowski DS & Li TK. Ossifying fibroma in a Hong Kong community: the clinical and radiological features and outcomes of treatment. **Dentomaxillofac Radiol**. 38: 514-23, 2009.
82. Mäkitie AA, Törnwall J, Mäkitie O. Bisphosphonate treatment in craniofacial fibrous dysplasia-a case report and review of the literature. **Clin Rheumatol**. 27:809-12, 2008.

83. Mardinger O, Givol N, Talmi YP, Taicher S. Osteosarcoma of the jaw: The Chaim Sheba Medical Center experience. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 91: 445-51, 2001.
84. Mark RJ, Poen J, Tran LM, Fu YS, Selch MT, Parker RG. Postirradiation sarcomas: A single-institution study and review of the literature. **Cancer.** 73: 2653-62, 1994.
85. Mark RJ, Sercarz JA, Tran L, Dodd LG, Selch M, Calcaterra TC. Osteogenic sarcoma of the head and neck: The UCLA experience. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg.** 117: 761-6, 1991.
86. Marx SJ. Hyperparathyroid and hypoparathyroid disorders. **N Engl J Med.** 343: 1863-75, 2000.
87. Matsushime H, Quelle DE, Shurtleff SA, Shibuya M, Sherr CJ, Kato JY. D-type cyclin-dependent kinase activity in mammalian cells. **Mol Cell Biol.** 14: 2066-76, 1994.
88. Mazabraud A, Semat P, Rose R. A propos de l'association de fibromyxomes des tissus mous a la dysplasie fibreuse des os. **Presse Med** 75:2223-2228, 1967.
89. Meister HP, Lufft W, Schlegel. Differential diagnosis of fibro-osseous jaw lesions (fibrous dysplasia vs. ossifying fibroma). **Beitr Pathol.** 148: 221-9, 1973.
90. Miedlich S, Krohn K, Paschke R. Update on genetic and clinical aspects of primary hyperparathyroidism. **Clin Endocrinol (Oxf).** 59: 539-54, 2003.

91. Moon S, Kim JH, Shim JY, Ahn YB, Song KH, Cha BY, Maeng LS, Han JH. Analysis of aberrantly spliced HRPT2 transcripts and the resulting proteins in HPT-JT syndrome. **Mol Genet Metab.**100:365-71, 2010.
92. Motokura T, Bloom T, Kim HG, Jüppner H, Ruderman JV, Kronenberg HM, Arnold A. A novel cyclin encoded by a bcl1-linked candidate oncogene. *Nature.* 350:512-5, 1991.
93. Mousses S, McAuley L, Bell RS, Kandel R, Andrulis IL. Molecular and immunohistochemical identification of p53 alterations in bone and soft tissue sarcomas. **Mod Pathol.** 9: 1-6, 1996.
94. Mücke T, Mitchell DA, Tannapfel A, Hölzle F, Kesting MR, Wolff KD, Kolk A, Kanatas A. Outcome in adult patients with head and neck sarcomas--a 10-year analysis. **J Surg Oncol.** 102:170-4, 2010.
95. Mueller CL & Jaehning JA. Ctr9, Rtf1, and Leo1 are components of the Paf1/RNA polymerase II complex. **Mol Cell Biol.** 22: 1971-80, 2002.
96. Mueller CL, Porter SE, Hoffman MG, Jaehning JA. The Paf1 complex has functions independent of actively transcribing RNA polymerase II. **Mol Cell.** 14: 447-56, 2004.
97. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. **Cancer Lett.** 160: 3-8, 2000.
98. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, Pauletti G, Aghamohammadi N, Aghamohammadi M, Gornbein JA, Calcaterra TC, Slamon DJ, Wang MB, Srivatsan ES. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. **Laryngoscope.** 112: 472-81, 2002.

99. Newey PJ, Bowl MR, Thakker RV. Parafibromin – functional insights. **J Intern Med.** 266: 84–98, 2009.
100. Newey PJ, Bowl MR, Cranston T, Thakker RV. Cell division cycle protein 73 homolog (CDC73) mutations in the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome (HPT-JT) and parathyroid tumors. **Hum Mutat.** 31:295-307, 2010.
101. Nigro JM, Baker SJ, Preisinger AC, Jessup JM, Hostetter R, Cleary K, Bigner SH, Davidson N, Baylin S, Devilee P, *et al.* Mutations in the p53 gene occur in diverse human tumour types. **Nature.** 342: 705-8, 1989.
102. Oda D, Bavisotto LM, Schmidt RA, McNutt M, Bruckner JD, Conrad EU 3rd, Weymuller EA Jr. Head and neck osteosarcoma at the University of Washington. **Head Neck.** 19: 513-23, 1997.
103. Pan S, Dong Q, Sun LS, Li TJ. Mechanisms of inactivation of PTCH1 gene in nevoid basal cell carcinoma syndrome: modification of the two-hit hypothesis. **Clin Cancer Res.** 15;16:442-50, 2010.
104. Patel SG, Shaha AR, Shah JP. Soft tissue sarcomas of the head and neck: an update. **Am J Otolaryngol.** 22:2-18, 2001.
105. Patel MM, Wilkey JF, Abdelsayed R, D'Silva NJ, Malchoff C, Mallya SM. Analysis of GNAS mutations in cemento-ossifying fibromas and cemento-osseous dysplasias of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 109:739-43, 2010.
106. Petrikowski CG, Pharoah MJ, Lee L, Grace MG. Radiographic differentiation of osteogenic sarcoma, osteomyelitis, and fibrous dysplasia of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 80:744-50, 1995.

107. Pimenta FJ, Gontijo Silveira LF, Tavares GC, Silva AC, Perdigão PF, Castro WH, Gomez MV, Teh BT, De Marco L, Gomez RS. HRPT2 gene alterations in ossifying fibroma of the jaws. **Oral Oncol.** 42:735-9, 2006.
108. Pokholok DK, Hannett NM, Young RA. Exchange of RNA polymerase II initiation and elongation factors during gene expression in vivo. **Mol Cell.** 9: 799-809, 2002.
109. Porter SE, Washburn TM, Chang M, Jaehning JA. The yeast pafl-rNA polymerase II complex is required for full expression of a subset of cell cycle-regulated genes. **Eukaryot Cell.** 1: 830-42, 2002.
110. Pratt CB, Champion JE, Fleming ID, Rao B, Kumar AP, Evans WE, Green AA, George S. Adjuvant chemotherapy for osteosarcoma of the extremity: Long-term results of two consecutive prospective protocol studies. **Cancer.** 65: 439-45, 1990.
111. Raubenheimer EJ & Noffke CE. Low-grade intraosseous osteosarcoma of the jaws. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** 86: 82-5, 1998.
112. Reichart PA & Philipsen HP. Odontogenic tumors and allied lesions. **London: Quintessence Publishing.** : 273-80, 2004.
113. Regezzi JA, Sciubba JJ. Oral Pathology 3rd ed W.B. **Saunders Philadelphia,** 3517-360, 1999.
114. Rekik N, Ben Naceur B, Mnif M, Mnif F, Mnif H, Boudawara T, Abid M. Hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: a case report. **Ann Endocrinol (Paris).** 71: 121-6, 2010.

115. Rozenblatt-Rosen O, Hughes CM, Nannepaga SJ, Shanmugam KS, Copeland TD, Guszczynski T, Resau JH, Meyerson M. The parafibromin tumor suppressor protein is part of a human Paf1 complex. **Mol Cell Biol.** 25: 612-20, 2005.
116. Ruggieri P, Sim FH, Bond JR, Unni KK. Malignancies in fibrous dysplasia. **Cancer.** 73: 1411-24, 1994.
117. Saglik Y, Atalar H, Yildiz Y, Basarir K, Ereku S. Management of fibrous dysplasia: A report on 36 cases. **Acta Orthop Belg.** 73: 96-101, 2007.
118. Sarquis MS, Silveira LG, Pimenta FJ, Dias EP, Teh BT, Friedman E, Gomez RS, Tavares GC, Eng C, De Marco L. Familial hyperparathyroidism: surgical outcome after 30 years of follow-up in three families with germline HRPT2 mutations. **Surgery.** 143: 630-40, 2008.
119. Schwartz DT, Alpert M The malignant transformation of fibrous dysplasia. **Am J Med Sci.** 247:1-20, 1964.
120. Sciubba JJ & Younai F. Ossifying fibroma of the mandible and maxilla: review of 18 cases. **J Oral Pathol Med.** 18: 315-21, 1989.
121. Shattuck TM, Välimäki S, Obara T, Gaz RD, Clark OH, Shoback D, Wierman ME, Tojo K, Robbins CM, Carpten JD, Farnebo LO, Larsson C, Arnold A. Somatic and germ-line mutations of the HRPT2 gene in sporadic parathyroid carcinoma. **N Engl J Med.** 349: 1722-9, 2003.
122. Shenker A, Weinstein LS, Moran A, Pescovitz OH, Charest NJ, Boney CM, Van Wyk JJ, Merino MJ, Feuillan PP, Spiegel AM. Severe endocrine and nonendocrine manifestations of the McCune-Albright

- syndrome associated with activating mutations of stimulatory G protein GS. **J Pediatr.** 123: 509-18, 1993.
123. Sherr CJ. Cancer cell cycles. **Science.** 6;274:1672-7, 1996.
124. Shi X, Chang M, Wolf AJ, Chang CH, Frazer-Abel AA, Wade PA, Burton ZF, Jaehning JA. Cdc73p and Paf1p are found in a novel RNA polymerase II-containing complex distinct from the Srbp-containing holoenzyme. **Mol Cell Biol.** 17: 1160-9, 1997.
125. Shi X, Finkelstein A, Wolf AJ, Wade PA, Burton ZF, Jaehning JA. Paf1p, an RNA polymerase II-associated factor in *Saccharomyces cerevisiae*, may have both positive and negative roles in transcription. **Mol Cell Biol.** 16: 669-76, 1996.
126. Silveira LG, Dias EP, Marinho BC, Gomez RS, De Marco L, Sarquis MS. HRPT2-related familial isolated hyperparathyroidism: could molecular studies direct the surgical approach?. **Arq Bras Endocrinol Metabol.** 52: 1211-20, 2008.
127. Slootweg PJ. Maxillofacial fibro-osseous lesions: classification and differential diagnosis. **Semin Diagn Pathol.** 13: 104-12, 1996.
128. Slootweg PJ & Mofty SK. Ossifying fibroma. In: Barnes L, Everson J, Reichart P, Sidransky D (eds). WHO classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of the head and neck. **Lyon: International Agency for Research on Cancer (IARC).** 319-20, 2005.
129. Slootweg PJ & Müller H. Differential diagnosis of fibro-osseous jaw lesions: A histological investigation on 30 cases. **J Craniomaxillofac Surg.** 18: 210-4, 1990.

130. Speight PM & Roman C. Maxillofacial fibro-osseous lesions. **Current Diagnostic Pathology**. 12: 1–10, 2006.
131. Spiegel AM. Mutations in G proteins and G protein-coupled receptors in endocrine disease. **J Clin Endocrinol Metab**. 81: 2434-42, 1996.
132. Stanton RP, Hobson GM, Montgomery BE, Moses PA, Smith-Kirwin SM, Funanage VL. Glucocorticoids decrease interleukin-6 levels and induce mineralization of cultured osteogenic cells from children with fibrous dysplasia. **J Bone Miner Res**. 14: 1104-14, 1999.
133. Szabó J, Heath B, Hill VM, Jackson CE, Zarbo RJ, Mallette LE, Chew SL, Besser GM, Thakker RV, Huff V, *et al*. Hereditary hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome: the endocrine tumor gene HRPT2 maps to chromosome 1q21-q31. **Am J Hum Genet**. 56: 944-50, 1995.
134. Tan MH & Teh BT. Renal neoplasia in the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome. **Curr Mol Med**. 4: 895-7, 2004.
135. Tan MH, Morrison C, Wang P, Yang X, Haven CJ, Zhang C, Zhao P, Tretiakova MS, Korpi-Hyovalti E, Burgess JR, Soo KC, Cheah WK, Cao B, Resau J, Morreau H, Teh BT. Loss of parafibromin immunoreactivity is a distinguishing feature of parathyroid carcinoma. **Clin Cancer Res**. 10: 6629-37, 2004.
136. Tanzawa H, Uchiyama S, Sato K. Statistical observation of osteosarcoma of the maxillofacial region in Japan: Analysis of 114 Japanese cases reported between 1930 and 1989. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**. 72: 444-8, 1991.

137. Teh BT, Farnebo F, Kristoffersson U, Sundelin B, Cardinal J, Axelson R, Yap A, Epstein M, Heath H 3rd, Cameron D, Larsson C. Autosomal dominant primary hyperparathyroidism and jaw tumor syndrome associated with renal hamartomas and cystic kidney disease: linkage to 1q21-q32 and loss of the wild type allele in renal hamartomas. **J Clin Endocrinol Metab.** 81: 4204-11, 1996.
138. Teh BT, Farnebo F, Twigg S, Höög A, Kytölä S, Korpi-Hyövälti E, Wong FK, Nordenström J, Grimelius L, Sandelin K, Robinson B, Farnebo LO, Larsson C. Familial isolated hyperparathyroidism maps to the hyperparathyroidism-jaw tumor locus in 1q21-q32 in a subset of families. **J Clin Endocrinol Metab.** 83: 2114-20, 1998.
139. Toyosawa S, Yuki M, Kishino M, Ogawa Y, Ueda T, Murakami S, Konishi E, Iida S, Kogo M, Komori T, Tomita Y. Ossifying fibroma vs fibrous dysplasia of the jaw: molecular and immunological characterization. **Mod Pathol.** 20:389-96, 2007.
140. Unni KK & Dahlin DC. Osteosarcoma: pathology and classification. **Semin Roentgenol.** 24: 143-52, 1989.
141. Van Houten VM, Tabor MP, Van Den Brekel MW, *et al.* Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. **Clin Cancer Res.** 6: 3803-16, 2000.
142. Vege DS, Borges AM, Aggrawal K, Balasubramaniam G, Parikh DM, Bhaser B. Osteosarcoma of the craniofacial bones: A clinico-pathological study. **J Craniomaxillofac Surg.** 19: 90-3, 1991.

143. Waldron CA. Bone pathology. In: Neville BW, Damm DD, Allan CM, Bouquot JE (eds) Oral and maxillofacial pathology. **Philadelphia: WB Saunders.** 460-91, 1995.
144. Wanebo HJ, Kness RJ, MacFarlane JK, Eilber FR, Byers RM, Elias EG, Spiro RH. Head and neck sarcoma: report of the Head and Neck Sarcoma Registry. Society of Head and Neck Surgeons Committee on Research. **Head Neck.** 14: 1-7, 1992.
145. Woodard GE, Lin L, Zhang JH, Agarwal SK, Marx SJ, Simonds WF. Parafibromin, product of the hyperparathyroidism-jaw tumor syndrome gene HRPT2, regulates cyclin D1/PRAD1 expression. **Oncogene.** 24: 1272-6, 2005.
146. Yamashita Y, Akiyama T, Mizusawa N, Yoshimoto K, Goto M. A case of hyperparathyroidism-jaw tumour syndrome found in the treatment of an ossifying fibroma in the maxillary bone. **Int J Oral Maxillofac Surg.** 36: 365-9, 2007.
147. Yang YJ, Han JW, Youn HD, Cho EJ. The tumor suppressor, parafibromin, mediates histone H3 K9 methylation for cyclin D1 repression. **Nucleic Acids Res.** 38: 382-90, 2010.
148. Yart A, Gstaiger M, Wirbelauer C, Pecnik M, Anastasiou D, Hess D, Krek W. The HRPT2 tumor suppressor gene product parafibromin associates with human PAF1 and RNA polymerase II. **Mol Cell Biol.** 25: 5052-60, 2005.
149. Yip L, Seethala RR, Nikiforova MN, Nikiforov YE, Ogilvie JB, Carty SE, Yim JH. Loss of heterozygosity of selected tumor suppressor genes in parathyroid carcinoma. **Surgery.** 144: 949-55, 2008.

150. Zacksenhaus E, Bremner R, Phillips RA, Gallie BL. A bipartite nuclear localization signal in the retinoblastoma gene product and its importance for biological activity. **Mol Cell Biol.** 13: 4588-99, 1993.
151. Zhang C, Kong D, Tan MH, Pappas DL Jr, Wang PF, Chen J, Farber L, Zhang N, Koo HM, Weinreich M, Williams BO, Teh BT. Parafibromin inhibits cancer cell growth and causes G1 phase arrest. **Biochem Biophys Res Commun.** 10;350:17-24, 2006.
152. Zhao J, Yart A, Frigerio S, Perren A, Schraml P, Weisstanner C, Stallmach T, Krek W, Moch H. Sporadic human renal tumors display frequent allelic imbalances and novel mutations of the HRPT2 gene. **Oncogene.** 17;26:3440-9, 2007.
153. Zhou CZ, Qiu GQ, Zhang F, He L, Peng ZH. Loss of heterozygosity on chromosome 1 in sporadic colorectal carcinoma. **World J Gastroenterol.** 15;10:1431-5, 2004.

ANEXOS

ANEXO



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

Parecer nº. ETIC 0380.0.203.000-09

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 14 de outubro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Análise molecular do gene HRPT2 em osteossarcoma e lesões fibro-ósseas benignas**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Maria Teresa Marques Amaral'.

Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

APÊNDICES

APÊNDICE 1UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado a participar do projeto de pesquisa **“Análise molecular do gene HRPT2 em osteossarcoma e lesões fibro-ósseas benignas”**. Existem alterações genéticas em outras lesões semelhantes a esta e por isso iremos pesquisar se esta mesma alteração pode ser encontrada na lesão que você apresenta na boca. Para esse estudo, preciso coletar um pedaço da lesão que será removida da sua boca e que não irá interferir em nada no diagnóstico e na condução do seu caso. Todos os resultados serão utilizados para fins de pesquisa e ensino. Estamos a sua disposição para esclarecimentos, antes e durante o curso da pesquisa, sobre a metodologia empregada. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade de recusar a participar ou retirar seu consentimento, sem penalização alguma ou represálias e sem prejuízo ao seu cuidado. Garantimos o sigilo, assegurando assim a sua privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos nesta pesquisa. Este estudo não oferecerá riscos à sua saúde, excluindo a possibilidade de indenização e nem terá custos ou ressarcimentos para você uma vez que a amostra será coletada no momento que você procurou o diagnóstico da mesma. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor as causas destas doenças e isso será muito importante para que num futuro próximo possamos prevenir o seu desenvolvimento e melhorar o tratamento da doença, além de ter a possibilidade de se realizar uma conselheiro genético se for o caso.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a utilização de parte da lesão que foi removida através de biópsia para conclusão do diagnóstico, neste projeto de pesquisa, assim como 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, sem quaisquer represálias ou prejuízo ao meu cuidado.

LOCAL: _____ DATA: ____ / ____ / _____

NOME DO PACIENTE

NOME DO RESPONSÁVEL

ASSINATURA DO PACIENTE

ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

DOCUMENTO APRESENTADO: ____ No. _____

Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/ Ana Carolina de Mesquita Netto Rosales.

Telefone: (31) 34092477.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG (COEP). Em caso de dúvida, você pode ligar para o COEP através do número (31) 3409-4592. Av Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II-2º Andar. Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. 31270-901.

APÊNDICE 2

Isoforma Normal do Transcrito RNA do gene *HRPT2*

```

1      gctactgccc ctgctgctgt cgtaggcgag gacggctggt agtgctgctg ctgttggttc
61     gtgcggcggg cgaaggagga ggaggaagag ggcgaggcga caagagaaga aggaggcagg
121    cgcgcgggca gcggcggcgc cccgagccgg cggagggcag gggggggaag atggcggacg
181    tgcttagcgt cctgcgacag tacaacatcc agaagaagga gattgtggtg aagggagacg
241    aagtgatcct cggggagttc tcttgGCCa agaatgtgaa gaccaactat gttgtttggg
301    ggactggaaa ggaaggccaa cccagagagt actacacatt ggattccatt ttatttctac
361    ttaataacgt gcacctttct catcctgttt atgtccgacg tgcagctact gaaaatattc
421    ctgtggttag aagacctgat graaaagatc tacttgata tctcaatggt gaagcgtcaa
481    catcggaagc tatagacaga agcgctcct tagaaatagg tcttcagcga tctactcaag
541    tcaaacgagc tgcagatgaa gttttagcag aagcaaagaa accacgaatt gaggatgaag
601    agtgtgtgcg ccttgataaa gagagattgg ctgcccgttt ggagggtcac aagaagggga
661    ttgtacagac tgaacagatt agtctttgt ctgaagotat gtcagtgga aaaattgctg
721    caatcaagc caaaattatg gtaagaaa gatctactat caagactgat ctagatgatg
781    acataactgc ccttaaacag aggagttttg tggatgctga ggtagatgag acccgagata
841    ttgtcagcag agagagagta tggaggacac gaacaactat cttacaaagc acaggaaaga
901    atttttocaa gaacattttt gcaattcttc aatctgtaa agccagagaa gaagggcgtg
961    cacctgaaca gcgacctgcc ccaaatgcag cactgtgga tccactttg cgaccaaac
1021   agctatccc agctgcctat aacagatacg atcaggaaag attcaaagga aagaagaaa
1081   cggaaggctt caaaattgac actatgggaa cctaccatgg tatgacactg aaatctgtaa
1141   cggagggtgc atctgcccg aagactcaga ctcctgcagc ccagccagta ccaagaccag
1201   ttctcaagc aagacctccc ccaaatcaga agaaaggatc tcgaacacc attatcataa
1261   ttcotgcagc taccacctct ttaataacca tgottaatgc aaaagacctt ctacaggacc
1321   tgaaatttgt cccatcagat gaaagaaga aacaaggttg tcaacgagaa aatgaaactc
1381   taatacaaag aagaaaagac cagatgcaac cagggggcac tgcaattagt gttacagtac
1441   cttatagagt agtagaccag ccccttaaac ttatgcctca agactgggac cgcttgtag
1501   ccgttttgt gcagggtct gcatggcagt tcaaaggttg gcatggctt ttgcctgatg
1561   gatcaccagt tgatatattt gctaaaatta aagccttcca tctgaagtat gatgaagttc
1621   gtctggatcc aatgttcag aatgggagt taacagtatt agaactcagc tatcacaaaac
1681   gtcatttgga tagaccagtg ttcttacgg ttgggaaac attggacagg tacatggtaa
1741   agcataaaatc gcacttgaga ttctgaatta ttggctcct ccatttctg aaattgagac
1801   tcaagcttta tgaattatc aagaacttaa aatgaagaa ggtcacagat tgatcttta
1861   taagacctta tt tgatgctt tgtgcttcaa ggagatgata cctgtcatcc atataagcaa
1921   actttttggc ttacaactat tttttaata ttagccttct agtctgtaat ggaaattgta
1981   tattttgata gaagttttt ctccattggt taaattagca ttacttaaaa ttgtttctt
2041   tagaaaataa atgcaggta taatgtgtg tatatttaga gattataagg ctctctgagc
2101   catcttctga ttttcattg ctctataact cttttactg aaaatactat gttatgatg
2161   gtattaaat ttagtctctg gaacatccaa aaccaagcaa agggatgtga ctatttgaa
2221   tgaatcagaa tgtcaacttg tatgtacact atatctacac ttactcatta tttaaaaga
2281   ataatgaaa atctagatca attcttcaat ttgattgaac tgttcagcct tttcaagatt
2341   tctttattta caaatgatta catttaaatg aatgtacatt cttctcactg actttggtga
2401   tttgaaacc tagaatgatg tgtttctatc tgtaatatct ttccatttga aaaaaatctc
2461   aaaacacaga ttaaaaccac aataggctgt agtattttt attttgggag ccagagtatg
2521   atttgggga agaatatgta tcagcctat tgcagtataa ctttaagctc cttttctctt
2581   tagtccactt ttgattgtaa ttttatggt ataggatttt gaatcttcta ttttaggctt
2641   gtcagtttg gagttctat cttccattat ccotaaatat tgataaactc ccaggcacca
2701   aagaaaacat ttgcttaat gtctgaaaag aacaagaga aaaacactgg tattttatg
2761   tctgtattca atatggtata aaatataaaa actatatttt aacttagtga aatattttac
2821   tattttctta cttcagacaa aatgttgcat ccaaggtaca tcaagtgacc atttgcttg
2881   aaccttgatt tcactttgtt ttttttttt ccttaaaggc aactaggaag ctttactttc
2941   ctaaagtgtt ttgccattg gaatttttgc tgatcacagt

```

EXON 1 EXON 2 EXON 3 EXON 4 EXON 5 EXON 6 EXON 7 EXON 8 EXON 9 EXON
10 EXON 11 EXON 12 EXON 13 EXON 14 EXON 15 EXON 16 EXON 17
PRIMER 1 (1-7) PRIMER 2 (5-12) PRIMER 3 (10-17)

APÊNDICE 3

Dados clínicos e técnicas de investigação utilizadas.

Laudo	Diagnóstico/ código das amostras	Gênero	Idade	Localização	Origem do material	Sequenciamento	LOH	qPCR	Imuno
Displasia									
Fibrosa									
20651	Caso 01	Feminino	56	Maxila	A fresco	✓	✓	✓	✓
19748	Caso 02	Feminino	24	Mandíbula	A fresco	✓	-	-	✓
12170	Caso 03	Masculino	14	Maxila	A fresco	✓	✓	✓	✓
27138	Caso 04	Feminino	14	Mandíbula	A fresco	-	✓	✓	✓
27191	Caso 05	Feminino	30	Maxila	A fresco	-	✓	✓	✓
27493	Caso 06	Feminino	28	Maxila	A fresco	-	✓	✓	✓
6625	Caso 21	Feminino	27	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
10630	Caso 22	Masculino	7	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
13890	Caso 23	Masculino	37	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
17410	Caso 24	Feminino	14	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
17523	Caso 25	Feminino	36	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
19462	Caso 26	Feminino	ND	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
19544	Caso 27	Feminino	29	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
20997	Caso 28	Feminino	36	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
21352	Caso 29	Feminino	21	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
Fibroma									
Ossificante									
19747	Caso 07	Feminino	30	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
23328	Caso 08*	Feminino	33	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
20651	Caso 09	Feminino	58	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
20527	Caso 10 ^a	Masculino	19	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
18400	Caso 11 ^b	Masculino	15	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
25763	Caso 12	Feminino	25	Mandíbula	A fresco	✓	-	✓	✓
25782	Caso 13	Feminino	28	Maxila	A fresco	✓	✓	✓	✓
26785	Caso 14	Feminino	30	Maxila	A fresco	✓	✓	✓	✓
27431	Caso 15	Feminino	49	Maxila	A fresco	-	✓	✓	✓
28042	Caso 16	Feminino	70	Mandíbula	A fresco	-	✓	-	-
13250	Caso 30	Feminino	38	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
13999	Caso 31	Masculino	16	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
14089	Caso 32	Feminino	26	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
14459	Caso 33	Feminino	36	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
15067	Caso 34	Feminino	28	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓

17485	Caso 35	Feminino	43	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
19147	Caso 36	Feminino	21	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
19669	Caso 37	Masculino	11	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
23046	Caso 38	Masculino	17	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
Osteossarcoma									
21215	Caso 17	Feminino	34	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
23898	Caso 18	Feminino	35	Mandíbula	A fresco	✓	✓	✓	✓
05-145	Caso 19	Feminino	15	Maxila	Em parafina	-	✓	-	✓
06-260	Caso 20	Masculino	21	Mandíbula	Em parafina	-	✓	-	✓
85-035	Caso 39	Feminino	34	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
89-453	Caso 40	Masculino	36	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
93-400	Caso 41	Feminino	42	Mandíbula	Em parafina	-	-	-	✓
05-268	Caso 42	Masculino	21	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓
07-578	Caso 43	Feminino	22	Maxila	Em parafina	-	-	-	✓

✓ Disponível -não disponível ND: não descrito