UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA REGIÃO CENTRO-OESTE

SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC

EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA BOCA E DE SANGUE VENOSO PERIFÉRICO EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA, E SUA MODULAÇÃO PELO ÁCIDO ASCÓRBICO E PROPRANOLOL

CAMPO GRANDE
2025

SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC

EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA BOCA E DE SANGUE VENOSO PERIFÉRICO EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA, E SUA MODULAÇÃO PELO ÁCIDO ASCÓRBICO E PROPRANOLOL

Tese apresentada como exigência para obtenção do grau de Doutora em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS. Linha de pesquisa: Atenção à saúde integral da criança, do adolescente e da gestante.

Orientador: Prof. Dr. Durval Batista Palhares.

CAMPO GRANDE
2025

Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
Coordenadoria de Pós-Graduação (CPG/PROPP)
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste

Ata de Defesa de Tese
Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste
Doutorado

Aos vinte e sete dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e vinte e cinco, às oito horas, na videoconferência, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Durval Batista Palhares (UFMS), Alexandra Maria Almeida Carvalho (UFMS), Almir de Sousa Martins (UFMG), Fabiana Alves (WYDEN) e Robson Augusto Souza dos Santos (UFMG), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC, CPF ***.808.411-**, Área de concentração em Saúde e Sociedade, do Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Curso de Doutorado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "EXPRESSÃO DE GENES DO SISTEMA RENINA ANGIOTENSINA EM CÉLULAS EPITELIAIS DA BOCA E DE SANGUE VENOSO PERIFÉRICO EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA, E SUA MODULAÇÃO PELO ÁCIDO ASCÓRBICO E PROPRANOLOL" e orientação de Durval Batista Palhares. O presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Tese. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, o presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

EXAMINADOR(A)	ASSINATURA	AVALIAÇÃO
Dr. Durval Batista Palhares (Interno) **Presidente da Banca Examinadora**	gov.br Documento assinado digitalmente DURVAL BATISTA PALHARES Data: 27/02/2025 14:38:43-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Alexandra Maria Almeida Carvalho (Interno)		☐ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Almir de Sousa Martins (Externo)	gov.br Documento assinado digitalmente ALMIR DE SOUSA MARTINS Data: 27/02/2025 15:12:49-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Cesar Augusto Sobrinho (Interno) (Suplente)	gov.br Documento assinado digitalmente CESAR AUGUSTO SOBRINHO Data: 28/02/2025 08:48:37-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dra. Fabiana Alves (Externo)	gov.br Documento assinado digitalmente FABIANA ALVES Data: 27/02/2025 15:27:52-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação
Dr. Robson Augusto Souza dos Santos (Externo)	gov.br Documento assinado digitalmente ROBSON AUGUSTO SOUZA DOS SANTOS Data: 28/02/2025 08:21:16-0300 Verifique em https://validar.iti.gov.br	☒ Aprovação ☐ Aprovação c/ revisão ☐ Reprovação

RESULTADO FINAL: ☒ APROVAÇÃO ☐ APROVAÇÃO COM REVISÃO ☐ REPROVAÇÃO

OBSERVAÇÕES: A pós-graduanda apresentou sua tese em tempo hábil. Foi clara e respondeu à arguição adequadamente.

gov.br Documento assinado digitalmente
SUZANA LOPES BOMFIM BALANIUC
Data: 28/02/2025 10:57:24-0300
Verifique em https://validar.iti.gov.br

Assinatura do(a) Aluno(a)

Nada mais havendo a ser tratado, o(a) Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

AGRADECIMENTOS

A Deus e à minha família.

Aos portadores da FOP, seus familiares, e demais participantes do estudo, que contribuíram voluntariamente com a pesquisa.

Ao Professor Dr. Durval Batista Palhares e sua esposa Marilene Palhares.

Ao Professor Dr. Almir de Sousa Martins.

Ao IAPES – Instituto de Assistência e Pesquisa em Educação e Saúde, apoiador financeiro desta pesquisa.

À Ana Lígia e Lorena, pela amizade construída nesse tempo.

À Dra. Paula e ao Daniel, pelo apoio como farmacêuticos e técnicos do laboratório de pesquisa.

“Eu bem sei os planos que tenho para vós, diz o Senhor, planos de paz e não de mal, para vos dar um futuro, e uma esperança.”

Jeremias 29.11

RESUMO

BALANIUC, S. L. B. Campo Grande, 2025. [Tese – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul].

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença ultrarrara e intratável, resultado de uma mutação de ganho-de-função no gene ACVR1 (c.617G>A, p.R206H). Ultimamente compreendida como uma doença de ordem inflamatória, remanescem lacunas no esclarecimento de fatores envolvidos direta ou indiretamente na inflamação e na formação do osso ectópico. Com foco inovador, investigou-se em células epiteliais da boca e células de sangue periférico (leucócitos totais), a expressão relativa de mRNA de seis genes alvos do Sistema Renina Angiotensina (SRA), codificadores para: *ECA, ECA2, AGTR1, AGTR2, MAS1* e *MRGD*. Representando vias correlatas àquele sistema, foram investigados: *TNF-α, RUNX2, ADRB1, ADRB2, NFKB1 (p50), RELA (p65)* e *VEGF-A*. Estudos de expressão gênica e sua modulação pelo ácido ascórbico e propranolol foram realizados em três grupos – controle, portadores de FOP sem tratamento, e portadores de FOP em tratamento com ácido ascórbico + propranolol (FOPCON) –, a partir da extração de RNA total seguida por transcrição reversa e qPCR em tempo real. Demonstrou-se pela primeira vez a expressão de genes do SRA em células epiteliais da boca de portadores de FOP, fortalecendo a viabilidade desse espécime para fins de pesquisa. Aqui, os genes alvos do SRA pesquisados não caracterizaram o perfil fenotípico marcador da FOP nos tecidos analisados. Entretanto, a modulação branda desses genes sugere um papel coadjuvante para esse sistema nos processos anti-inflamatórios, antifibróticos e antinociceptivos em resposta ao uso contínuo de ácido ascórbico e propranolol. Entre os achados, a sub-regulação de *AGTR1, AGTR2* e *MRGD* em células epiteliais da boca foi simultânea à sub-regulação (normalização) de *TNF-α* e *ADRB2*, superexpressos em células epiteliais de portadores FOP sem tratamento, sem influência significativa sobre *RUNX2*. Modulação de *MRGD* em nível tecidual sugere regulação da via inflamatória envolvida na sensação e transdução da dor, que não pôde ser confirmada pelo estudo da via NF-κB em leucócitos totais do sangue periférico. Comparado com o estado basal da FOP, não houve regulação significativa de *MAS1* em células epiteliais em resposta ao tratamento, enquanto em leucócitos totais, o tratamento induziu à regulação positiva de ECA2 e MAS1, simultânea à suprarregulação de ECA e AT1R. As respostas de *MAS1* e *MRGD* incentivam esclarecimentos adicionais quanto a utilidade de adicionar ao tratamento peptídeos sugeridos como anti-inflamatórios. Curta interrupção da medicação não foi suficiente para alcançar efeito *wash-out*, mas sugere efeito residual protetor do tratamento, mediante a perpetuação da modulação na expressão gênica dos receptores do SRA e *TNF-α*, obtida com o tratamento. Em caráter complementar, são descritos brevemente dados de avaliação clínica referentes a efeitos adversos e funcionalidade. Seguir no esclarecimento dos mecanismos de ação do ácido ascórbico e do propranolol no controle da doença, e de como a equalização genômica funcional do SRA pode subsidiá-lo, ainda é necessário.

Descritores: Fibrodisplasia ossificante progressiva; sistema renina-angiotensina; ácido ascórbico; propranolol; inflamação; dor; ossificação heterotópica.

ABSTRACT

BALANIUC, S. L. B. Campo Grande, 2025. [Thesis – Federal University of Mato Grosso do Sul].

Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) is an ultra-rare and untreatable disease resulting from a gain-of-function mutation in the ACVR1 gene (c.617G>A, p.R206H). Recently understood as an inflammatory disease, there are still gaps in the clarification of factors directly or indirectly involved in inflammation and ectopic bone formation. With an innovative approach, the relative mRNA expression of six target genes of the Renin Angiotensin System (RAS) encoding *ACE, ACE2, AGTR1, AGTR2, MAS1* and *MRGD* were investigated in oral epithelial cells and peripheral blood cells (total leukocytes). Representing pathways related to that system, the following were investigated: *TNF-α, RUNX2, ADRB1, ADRB2, NFKB1 (p50), RELA (p65)* and *VEGF-A*. Gene expression studies and their modulation by ascorbic acid and propranolol were performed in three groups – control, FOP patients without treatment, and FOP patients treated with ascorbic acid + propranolol (FOPCON) –, based on total RNA extraction followed by reverse transcription and real-time qPCR. The expression of RAS genes in oral epithelial cells of FOP patients was demonstrated for the first time, strengthening the viability of this specimen for research purposes. Here, the RAS target genes investigated did not characterize the phenotypic marker profile of FOP in the analyzed tissues. However, the mild modulation of these genes suggests a supporting role for this system in the anti-inflammatory, antifibrotic and antinociceptive processes in response to the continuous use of ascorbic acid and propranolol. Among the findings, the downregulation of *AGTR1*, *AGTR2* and *MRGD* in oral epithelial cells was simultaneous to the downregulation (normalization) of *TNF-α* and *ADRB2*, overexpressed in epithelial cells of untreated FOP patients, without significant influence on *RUNX2*. Modulation of *MRGD* at the tissue level suggests regulation of the inflammatory pathway involved in pain sensation and transduction, which could not be confirmed by the study of the NF-κB pathway in total leukocytes from peripheral blood. Compared with the basal state of FOP, there was no significant regulation of *MAS1* in epithelial cells in response to treatment, while in total leukocytes, treatment induced the upregulation of *ACE2* and *MAS1*, simultaneous to the upregulation of *ACE* and *AGTR1*. The responses of *MAS1* and *MRGD* encourage further clarification regarding the usefulness of adding peptides suggested as anti-inflammatory to the treatment. A short interruption of the medication was not sufficient to achieve a wash-out effect, but suggests a residual protective effect of the treatment, through the perpetuation of the modulation in the gene expression of the RAS receptors and *TNF-α*, obtained with the treatment. In addition, clinical evaluation data regarding adverse effects and functionality are briefly described. Further clarification of the mechanisms of action of ascorbic acid and propranolol in controlling the disease, and how the functional genomic equalization of the RAS can support it, is still necessary.

Descriptors: Fibrodysplasia ossificans progressiva; renin-angiotensin system; ascorbic acid; propranolol; inflammation; pain; heterotopic ossification.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Hálux curto e valgo em recém-nascido, criança e adulto 19

Figura 2 – Padrão anatômico e cronológico de progressão das ossificações heterotópicas 19

Figura 3 – Domínios funcionais do complexo receptor de BMP tipo II e tipo I (ACVR1) com respectivas mutações patogênicas, incluindo a mutação clássica de FOP (R206H) 22

Figura 4 – Vias de sinalização BMP e Ativina-A em condições fisiológicas e vias de sinalização na FOP mediadas por ACVR1(R206H) 23

Figura 5 – Esquema representando o reflexo inflamatório, em que vias neurais e hormonais regulam a magnitude da resposta inflamatória na resolução da injúria 26

Figura 6 – Representação esquemática da histopatologia da ossificação heterotópica endocondral na FOP 29

Figura 7 – Mapa do avanço de pesquisas na terapêutica da FOP 33

Figura 8 – Principais vias metabólicas do Sistema Renina-Angiotensina e seus dois eixos principais: clássico e alternativo ou contra-regulatório 35

Figura 9 – Derivados do angiotensinogênio e efetores/receptores associados, com vias de sinalização *dowstream* e alguns dos efeitos relacionados ao desenvolvimento/prevenção do câncer 37

Figura 10 – Goniometria da abdução de ombro e da flexão de cotovelo 41

Figura 11 – Participantes da pesquisa separados por grupo em relação a idade 47

Figura 12 – Escores obtidos na escala CAJIS para avaliação de funcionalidade, em relação à idade, atividades de vida diária (AVD) e locomoção 48

Figura 13 – Média das frequências cardíacas e pressões arteriais dos indivíduos com FOP durante o tratamento com FOPCON. 49

Figura 14 – Perfil da expressão gênica basal dos genes alvo no grupo FOP sem tratamento em relação ao grupo controle sem FOP, em células epiteliais da boca (CEB) . 50

Figura 15 – Expressão relativa dos genes alvos em células epiteliais da boca de indivíduos FOP com interrupção do tratamento (*wash-out*) e FOP tratados com FOPCON, em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento 52

Figura 16 – Efeitos da interrupção do tratamento (*wash-out*) e do tratamento *in vivo* com FOPCON sobre a expressão dos genes alvos em células epiteliais da boca (CEB) de indivíduos com FOP em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento. 53
Figura 17 – Perfil da expressão gênica dos genes alvos no grupo FOP sem tratamento em relação ao grupo controle sem FOP, em leucócitos totais (sangue periférico). 54
Figura 18 – Expressão relativa dos genes alvos em leucócitos totais do grupo FOP após tratamento *in vivo* com FOPCON comparado com grupos controle e FOP sem tratamento 56
Figura 19 – Efeitos do tratamento *in vivo* com FOPCON sobre a expressão dos genes alvos em leucócitos totais de indivíduos com FOP em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento..... 57
Figura 20 – Diferentes posturas de portadores de FOP devido a anquiloses articulares, limitantes à sedestação e locomoção..... 58
Figura 21 – Ilustração da amplitude de movimento do cotovelo necessária para levar um alimento à boca e sua correspondência com o déficit de movimento em porcentagem..... 59
Figura 22 – Evolução clínica de dois participantes da pesquisa no período do estudo..... 60

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Ácido ascórbico
ACVR1	Receptor tipo I de BMP (ALK2)
ACVR1(R206H)	Receptor tipo I de BMP com a mutação genética da FOP
ADCY1	Adenilato ciclase 1
ADCY2	Adenilato ciclase 2
ADCY9	Adenilato ciclase 9
ADRB1	Receptor beta-adrenérgico tipo 1
ADRB2	Receptor beta-adrenérgico tipo 2
AGT	Angiotensinogênio
AGTR1	Gene codificador para o receptor de angiotensina II tipo 1
AGTR2	Gene codificador para o receptor de angiotensina II tipo 2
Akt	*Protein kinase B*
ALK2	*Activin-like kinase 2*
AMPK	Proteína quinase ativada por AMP (monofosfato de adenosina)
Ang II	Angiotensina II
Ang(1-7)	Angiotensina (1-7)
AT1R	Receptor de angiotensina II tipo 1
AT2R	Receptor de angiotensina II tipo 2
ATP	Adenosina trifosfato
AVD	Atividades de vida diária
BMP	*Bone morphogenetic protein* – Proteína morfogênica óssea
BMP-2	*Bone morphogenetic protein 2* – Proteína morfogênica óssea 2
BMP-4	*Bone morphogenetic protein 4* – Proteína morfogênica óssea 4
cAMP	3’ 5’ monofosfato adenosina cíclico; AMP cíclico
cDNA	*Complemetary DNA*; DNA complementar
CAJIS	Cumulative Analogue Joint Involvement Scale
CEB	Células epiteliais da boca
COL1	Colágeno tipo 1
COL3	Colágeno tipo 3
COX-2	Ciclo-oxigenase 2
CTM	Células progenitoras mesenquimais
CT	*Cycle threshold*

CTGF	*Conjuntive tissue growth factor;* fator de crescimento de tecido conjuntivo
CTM	Células-tronco mesenquimais
DEPC	*Diethyl Pyrocarbonate;* dicarbonato de dietila
Dlx5	*Distal-less homeobox 5 gene*
DMO	Densidade mineral óssea
DNAse	Enzima desoxirribonuclease
dNTP	Mix contendo desoxinucleotídeos, citosina (dCTP), guanina (dGTP), timina (dTDP) e adenina (dATP)
ECA	Enzima conversora de angiotensina
ECA2	Enzima conversora de angiotensina 2
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EMA401	Antagonista do receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2R)
EPM	Erro padrão da média
ERK	*Extracelular signal-regulated kinase*; Quinase regulada por sinal extracelular
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FKBP1A	Tipo de proteína de ligação; FKBP12
FOP	Fibrodisplasia ossificante progressiva
FOPCON	Medicação sob patente – "*FOP Control*"
FOXO1	*Forkhead box protein O1*
g	Grama
GPCR	Receptor acoplado à proteína G
GS	Domínio glicina-serina
G292	Linhagem celular derivada de osteosarcoma humano
HEK-293	Células embrionárias de rim humano
HI	Hemangioma infantil
HIF-1α	*Hypoxia-inducible factor 1 alpha*; Fator indutor de hipóxia tipo 1 alfa
IL-10	Interleucina 10
IL-17	Interleucina 17
IL-1β	Interleucina 1 beta
IL-3	Interleucina 3
IL-6	Interleucina 6
IL-7	Interleucina 7
IL-8	Interleucina 8
JAK	Via de sinalização Janus Quinase

JNK	*c-Jun N-terminal kinases*; quinase c-Jun N-terminal
LPS	Lipopolissacarídeo
LT	Leucócitos totais
mACVR1	Mensageiro de ACVR1
MAPK	MAP quinase
MAS1	Receptor da Angiotensina (1-7)
MCP-1	*Monocyte Chemoattractant Protein 1*; proteína quimiotática de monócitos
MDV	Núcleo motor dorsal do vago
mg	Miligrama
mg/kg/dia	Miligramas por quilo de peso ao dia
min	Minutos
mL	Mililitro
mM	Milimolar
MMP12	*Matrix metallopeptidase 12;* matriz metaloproteinase 12
MRGD	Membro D do receptor acoplado a proteína G relacionado a MAS; receptor da alamandina
mRNA	RNA mensageiro
mTOR	*Mammalian target of rapamycin*
NFKB1/p50	*Nuclear factor kappa B subunit 1;* subunidade 1 do fator nuclear kappa B
NF-κB	*Nuclear factor kappa B;* fator nuclear kappa B
ng	Nanograma
NK	*Natural killer*
NLRP3	Inflamassoma: NOD-, LRR- e domínio pirina contendo proteína 3
nm	Nanômetro
NTS	Trato núcleo solitário
OB	Osteoblasto
OH	Ossificação heterotópica
OMIM	*Online mendelian inheritance in man*
ON	Óxido nítrico
Osx	*Osterix*
p38 MAPK	*Mitogen activated protein kinase p38*
pb	Pares de bases
PBMC	*Peripheral blood mononuclear cells*; células mononucleares de sangue periférico

PCR	*Polimerase chain reaction*; reação em cadeia polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
Pi3K	*Phosphoinositide 3-kinase*
PI3ka	*phosphatidylinositol 3-kinase*; fosfatidilinositol 3-quinase
pmol	Picomol
pmol/µl	Picomol por microlitro
PP	Propranolol
qPCRtr	PCR quantitativo em tempo real *(*do inglês *quantitative polimerase chain reaction real time)*
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RANKL	*Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand*; ativador do receptor do ligante do fator nuclear kappa-B
RARγ	Ácido retinóico nuclear
RBMPI	Receptor de BMP tipo I
RBMPII	Receptor de BMP tipo II
Rebec	Registro brasileiro de ensaios clínicos
REGN2477	Anticorpo de anti ativina-A
RELA/p65	Proto-oncogene subunidade de NF-κB
REN	Renina
RhoA	*Ras homolog family member A*; Membro A da família homóloga Ras
RNA	*Ribonucleic acid*; Ácido ribonucleico
RNAi	Interferência de ácido ribonucleico
RNAse	Ribonuclease; enzima
RSPO2	*R-Spondin 2*
RT	*Reverse transcription*; transcrição reversa
RUNX2	*Runt-related transcription factor 2*
s	Segundos
S26	Proteína ribossomal utilizada como normalizador da reação de PCR
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 da síndrome respiratória aguda grave
siRNA	Silenciamento de ácido ribonucleico
SIRT1	Sirtuína 1
SMAD	Proteínas envolvidas na sinalização celular (*Drosophila protein mothers decapentaplegic*)
SNA	Sistema nervoso autônomo

SNC	Sistema nervoso central
SOX9	Fator de transcrição: *SRY-box transcription factor 9*
SRA	Sistema renina-angiotensina
sscDNA	DNA complementar de fita simples
TALE	Termo de assentimento livre esclarecido
TCF4	Fator de transcrição: *Transcription factor 4*
TCLE	Termo de consentimento livre esclarecido
TGF-β	*Transforming growth factor beta*; fator transformador de crescimento beta
TLR	*Toll like receptor;* Receptor tipo toll
TLR4	*Toll like receptor 4;* Receptor tipo toll 4
TNF-α	*Tumoral necrosis factor alpha*; fator de necrose tumoral alfa
U	Unidades
v/v	Volume por volume
VEGF	*Vascular endotelial growth factor*; fator de crescimento endotelial vascular
VEGF-A	*Vascular endotelial growth factor A*; fator de crescimento endotelial vascular A
VEGF-D	*Vascular endotelial growth factor D*; fator de crescimento endotelial vascular D
VEGFR1	Receptor 1 do VEGF
Wnt	*Wingless-related integration site*; via de sinalização
βAR	Receptor beta-adrenérgico
ΔCT	Delta CT (CT amostra – CT normalizador)
ΔΔCT	Delta delta CT
µl	Microlitro
°C	Graus Celsius

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 16
2 REVISÃO DE LITERATURA 18
2.1 Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) 18
2.1.1 Diagnóstico e exames complementares 20
2.1.2 Prognóstico 20
2.1.3 Manifestações extraesqueléticas 21
2.2 Fisiopatologia da FOP 21
2.2.1 Mutação gênica 21
2.2.2 Proteína morfogenética óssea (BMP) 25
2.2.3 Processo inflamatório na FOP 26
2.2.4 Ossificação heterotópica na FOP 28
2.2.5 Dor na FOP 30
2.3 Avaliação clínica da FOP 31
2.4 Abordagens terapêuticas 32
2.5 Sistema Renina Angiotensina (SRA) 35
3 OBJETIVOS 39
3.1 Objetivo geral 39
3.2 Objetivos específicos 39
4 METODOLOGIA 40
4.1 Tipo de pesquisa 40
4.2 População 40
4.3 Avaliação clínica 40
4.4 Tratamento *in vivo* com FOPCON (ácido ascórbico+propranolol) 41
4.5 Amostras 42
4.5.1 Amostras de mucosa oral (células epiteliais da boca) 42
4.5.2 Amostras de sangue venoso periférico (leucócitos totais) 43
4.6 Extração do RNA total e tratamento com DNAse 43
4.7 Oligonucleotídeos iniciadores específicos 44
4.8 Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia polimerase em tempo real (PCRtr) 45
4.8.1 Amostras de mucosa oral (células epiteliais da boca) 45

4.8.2 Amostras de sangue venoso periférico (leucócitos totais) 45
4.9 Análise estatística 46
5 RESULTADOS 47
5.1 População 47
5.2 Avaliação física – CAJIS e goniometria 47
5.3 Análise da pressão arterial e frequência cardíaca dos indivíduos tratados com FOPCON 49
5.4 Expressão basal de mRNA dos genes *AGTR1, AGTR2, MAS1, MRGD, TNF-α, RUNX2* e *ADRB2* em células epiteliais da boca (CEB) nos grupos controle e FOP sem tratamento 50
5.5 Expressão de mRNA dos genes alvos em células epiteliais da boca (CEB) de indivíduos FOP em resposta à interrupção do tratamento (*wash-out*) e em resposta ao tratamento *in vivo* com FOPCON 51
5.6 Expressão basal de mRNA dos genes alvos *AGTR1, AGTR2, MAS1, MRGD, ECA, ECA2, NFKB1, RELA, VEGF-A, TNF-α, RUNX2, ADRB1* e *ADRB2* em leucócitos totais (LT) do sangue venoso periférico nos grupos controle e FOP sem tratamento 53
5.7 Expressão de mRNA dos genes alvos em leucócitos totais (LT) do sangue venoso periférico de indivíduos FOP em resposta ao tratamento *in vivo* com FOPCON 55
6 DISCUSSÃO 58
6.1 Avaliação clínica 58
6.2 Aspectos biomoleculares 61
CONSIDERAÇÕES FINAIS 77
REFERÊNCIAS 79
APÊNDICES 92
ANEXOS 118

1 INTRODUÇÃO

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), OMIM[1] #135100, é uma doença genética ultrarrara, autossômica dominante, marcada pela mais trágica e incapacitante forma de ossificação heterotópica (OH) pós-natal. Decorrente de uma mutação no gene *ACVR1*, um receptor tipo I da proteína morfogenética óssea (BMP), a FOP é caracterizada por malformações ósseas congênitas específicas, e pela progressiva ossificação endocondral heterotópica pós-natal, precedida por surtos inflamatórios intensamente dolorosos. Trata-se de um complexo processo patológico no qual tecidos moles conectivos têm sua estrutura e funcionalidade afetadas ao serem destruídos e substituídos por tecido ósseo maduro, que uma vez desenvolvido, continua a se expandir ao ponto de formar um "segundo esqueleto" sobreposto ao original, ao qual confere irreversível imobilidade articular.

Embora descrita pela primeira vez há mais de três séculos, a FOP ainda é uma doença órfã. Não obstante a intensificação da pesquisa desde seu mapeamento genético em 2006, a raridade da doença, sua complexa fisiopatologia e expressão fenotípica variável, dificultam o estabelecimento de terapias definitivas ou curativas. Assim, o tratamento sintomático é restrito aos surtos inflamatórios, com pouca influência sobre a progressão da OH e sobre o alívio da dor crônica.

Portanto, é oportuno prosseguir no estudo e elucidação dos aspectos moleculares das vias de inflamação, ossificação e dor envolvidas na fisiopatologia da FOP, propondo terapias acessíveis, que visam a reduzir a recorrência das crises, amenizar sinais e sintomas, aliviar a dor e, assim, controlar a progressão da doença, como se propõe no tratamento contínuo com ácido ascórbico e propranolol – composto patenteado como FOPCON. Nesse sentido, é necessário abordar perspectivas biomoleculares não exploradas, e investigar o comportamento de genes moduladores de plasticidade e remodelamento ósseo, de inflamação e de dor, como os participantes do Sistema Renina-Angiotensina (SRA).

É proposta desta pesquisa avaliar a expressão gênica dos seguintes componentes do SRA: enzima conversora de angiotensina (*ECA*), enzima conversora de angiotensina 2 (*ECA2*), receptor tipo 1 da angiotensina II (*AGTR1*), receptor tipo 2 da angiotensina II (*AGTR2*), receptor de angiotensina (1-7) (*MAS1*) e receptor acoplado à proteína G relacionado a MAS (*MRGD*). Vias correlatas à sinalização do SRA serão estudadas por meio da expressão gênica de *TNF*-α,

[1] *Online Mendelian Inheritance in Man*®. Compêndio on-line de genes humanos e fenótipos genéticos (https://www.omim.org/about).

RUNX-2, *ADRB1*, *ADRB2*, *NFKB1*, *RELA* e *VEGFA*, representando vias potencialmente inflamatórias, angiogênicas e/ou osteogênicas.

Uma vez esclarecido o papel do SRA na fisiopatologia da FOP, surgem novos potenciais alvos terapêuticos, direcionando a exploração e desenvolvimento de abordagens inovadoras objetivando a melhora da qualidade e expectativa de vida dos portadores de FOP. Os resultados obtidos nesta pesquisa poderão ser úteis, ainda, para o tratamento de outras manifestações da ossificação heterotópica, genéticas ou adquiridas.

Igualmente relevante, espera-se confirmar a viabilidade de um método minimamente invasivo, indolor e de baixo custo, para coleta de amostras para fins de pesquisa.

2 REVISÃO DE LITERATURA

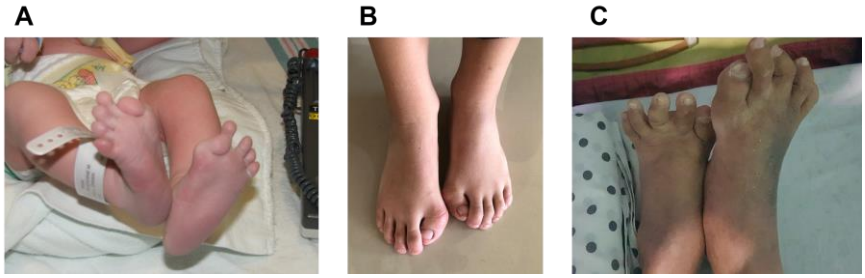
2.1 Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP)

O primeiro relato de Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) datado de 1648, foi poeticamente registrado pelo médico francês Guy Patin, quando, em uma de suas cartas, fez referência a uma mulher que se tornou "dura como madeira" (Patin, 1692). A primeira descrição científica da doença, entretanto, foi consignada em 1736, pelo médico cirurgião inglês John Freke (Freke, 1740). A doença foi associada ao nome Miosite Ossificante Progressiva por von Dusch, em 1868. Posteriormente, em 1918, Rosenstirn publicou uma extensa revisão de 119 casos relatados até aquela data, seguida da descrição detalhada de um novo caso por ele diagnosticado. Em suas conclusões, o autor expõe as primeiras sugestões de uma doença de ordem congênita, de caráter progressivo, marcada por ossificação de tecido conjuntivo, e precedida por expressiva alteração vascular (Rosenstirn, 1918a, 1918b). A partir do esclarecimento de que os músculos esqueléticos eram afetados secundariamente a eventos inflamatórios de tecidos moles subjacentes, Victor McKusic adotou em 1960 o nome outrora sugerido por Bauer e Bode: Fibrodisplasia Ossificante Progressiva, nomenclatura mais apropriada e amplamente aceita desde a década de 70 (Kaplan et al., 2020). Utilizados com menos frequência, remanescem na literatura: Miosite Ossificante, Doença do Homem Pedra (*Stone Man Disease*) e Doença de *Munchmeyer* (Chaurasia; Mishra; Katheriya, 2016; De Gorter; Jankipersadsing; Tem Dijke, 2012).

Com frequência de 0,6-1,39:1.000.000, há cerca de 900 casos confirmados em todo o mundo, não havendo prevalência de etnia, raça, gênero ou localização geográfica (Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024). Segundo Zorzi et al. (2022), há 89 casos de FOP registrados no Brasil, representando a terceira maior comunidade de indivíduos com FOP.

A FOP é uma desordem hereditária autossômica dominante, de penetrância completa e expressividade variável. Casos novos em famílias não afetadas anteriormente, têm relacionado a doença a mutações novas ou espontâneas (Petrie et al., 2009). A criança portadora de FOP aparenta-se normal no nascimento, exceto pela malformação do grande dedo do pé ou hálux, que em geral é curto e/ou valgo, presente em praticamente todos os casos de FOP clássica (De Brasi et al., 2021) (Figura 1).

Figura 1 – Hálux curto e valgo em (A) recém-nascido, (B) criança e (C) adulto.

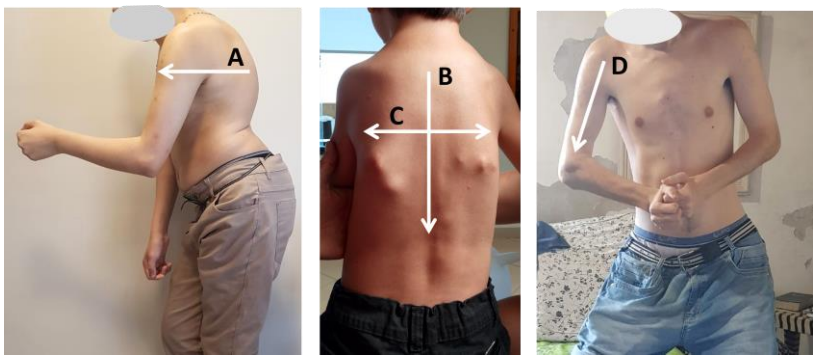


Fonte: A) IFOPA (2015); B) e C) Arquivo pessoal (2021; 2022) – reprodução proibida.

Ainda na primeira infância surgem as principais manifestações clínicas da doença: as crises ou surtos inflamatórios, conhecidos como *flare-ups*. Episódicos, os surtos podem ser espontâneos ou provocados por trauma direto, quedas, imunizações/injeções intramusculares, infecções virais, intervenções cirúrgicas, biópsias, anestesias locais, e estresse emocional. São caracterizados pelo aparecimento de nódulos intensamente dolorosos, acompanhados dos demais sinais clássicos da inflamação: calor, rubor e edema. Como em um processo de metamorfose, o processo inflamatório exacerbado e desordenado, em geral, resulta na substituição progressiva de tecidos moles – músculos, tendões, ligamentos, fáscias e aponeuroses – por osso verdadeiro heterotópico (Kaplan; Chakkalakal; Shore, 2012).

A OH instala-se episodicamente, seguindo um padrão anatômico e cronológico de progressão que, curiosamente, parece imitar a formação esquelética embriogênica normal (Bauer et al., 2018). As ossificações ocorrem primeiramente na região dorsal e mais tardiamente na região ventral, e progridem nas direções cranial para caudal, axial para apendicular, e proximal para distal, acometendo inicialmente os músculos do pescoço, seguindo para coluna e cinturas escapular e pélvica (Cohen et al., 1993; Rocke et al., 1994) (Figura 2).

Figura 2 – Padrão anatômico e cronológico de progressão das ossificações heterotópicas: (A) dorsal para ventral; (B) crânio-caudal; (C) axial-perpendicular; (D) proximal-distal.



Fonte: Arquivo pessoal (2021; 2022). Reprodução proibida.

2.1.1 Diagnóstico e exames complementares

O exame padrão-ouro para confirmação do diagnóstico da FOP é o sequenciamento genético, um exame pouco acessível devido seu alto custo. O diagnóstico ou a suspeita clínica são bastante comuns e, quando realizados precocemente, evitam a realização de exames invasivos com fins diagnósticos e outros procedimentos iatrogênicos que podem agravar a progressão da doença, tais como biópsias exploratórias, injeções intramusculares, punções arteriais, procedimentos cirúrgicos eletivos e remoção cirúrgica de osso ectópico (De Brasi et al., 2021).

Exames de imagem avançados como cintilografia óssea, tomografia computadorizada e ressonância magnética identificam áreas de lesão inicial pré-ossificação e fornecem detalhes valiosos quanto ao grau de OH, auxiliando o diagnóstico e a avaliação da progressão da doença em seus aspectos volumétrico e quantitativo. No entanto, não são indicados rotineiramente, considerando-se a dose de radiação e a acessibilidade limitada – tanto pelo custo, quanto pela mobilidade restrita dos pacientes (Bauer et al., 2018). Imagens radiológicas simples revelam a OH somente quando já instaladas, mas são úteis como auxílio ao diagnóstico, acompanhamento da progressão da doença e avaliação de respostas terapêuticas (Al-Salmi; Raniga; Al-Hadidi, 2014).

Usualmente, os exames laboratoriais de rotina são normais. A atividade de fosfatase alcalina sérica e a taxa de sedimentação eritrocitária (velocidade de hemossedimentação) podem estar aumentadas, especialmente durante os surtos, quando também se podem encontrar alterados os níveis do fator de crescimento fibroblástico básico na urina, coincidindo com a fase angiogênica pré-óssea de lesões fibroproliferativas iniciais (Pignolo; Shore; Kaplan, 2013).

Incluem o diagnóstico diferencial para a FOP: fibromatose juvenil agressiva, condrossarcoma, osteossarcoma, linfedema, heteroplasia óssea progressiva e distrofia hereditária de Albright (Pignolo; Shore; Kaplan, 2011).

2.1.2 Prognóstico

A incapacidade cumulativa subsequente aos *flare-ups* torna os portadores de FOP dependentes do auxílio de cuidadores, de dispositivos assistivos e de adaptações, por volta dos 20 anos de idade (Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024); não é incomum a dependência de cadeira de rodas ou restrição ao leito entre os 20 e 30 anos. A média estimada para expectativa de vida é de 56 anos de idade (Pignolo; Wang; Kaplan, 2020). O óbito precoce tem sido

associado a complicações cardiopulmonares decorrentes da anquilose das articulações costovertebrais e da ossificação dos músculos intercostais e paravertebrais. A anquilose da junção temporomandibular está presente em 70% dos pacientes, favorecendo a perda de peso e o risco de inanição (De Brasi et al., 2021).

2.1.3 Manifestações extra esqueléticas

Ainda que não sejam comuns a todos os pacientes, alterações do SNC incluem a desmielinização focal do SNC, com possível acometimento da substância branca supratentorial, núcleo denteado e medula espinhal (Bauer et al., 2018; Kan et al., 2012). É também relatada a perda de acuidade auditiva devido à ossificação do ouvido médio ou distúrbio neurossensorial. Pode ocorrer acometimento de glândulas submandibulares em estágios tardios e compressão extravascular de vasos linfáticos pelo edema, com consequente estase venosa e trombose (Bauer et al., 2018). Além destes, aspectos de envelhecimento precoce como alopecia, lipodistrofia subcutânea, osteoartrite, anormalidades na menstruação e nefrolitíase são associados à mutação de ACVR1 (Pignolo; Wang; Kaplan, 2020).

Palhares et al. (2018) destacam a queixa de câimbras frequentes em 51,6% em um grupo de portadores de FOP, possivelmente, devido à má circulação, compressão pelo osso ectópico ou compressão nervosa.

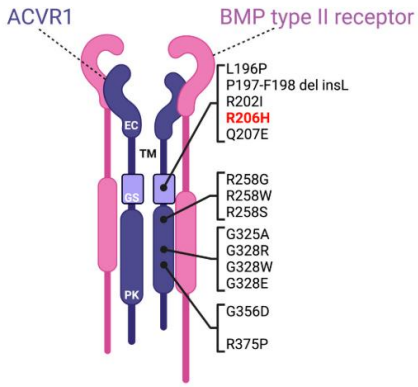
2.2 Fisiopatologia da FOP

2.2.1 Mutação gênica

A FOP foi mapeada geneticamente por meio de uma análise de ligação gênica realizada em cinco famílias com membros afetados em duas gerações. Uma ligação ao cromossomo 2q23-24 foi observada em todas as famílias e conduziu à identificação de mutações no gene *ACVR1* que codifica o receptor de ativina A tipo I, também conhecido como *ALK2* (activin-like kinase 2). Em todos os indivíduos com FOP clássica, tanto nos casos hereditários como nos esporádicos, observou-se a idêntica substituição de nucleotídeo único heterozigótico (c.617G>A – guanina por adenina na posição 617) que substitui o aminoácido arginina por histidina no códon 206 (R206H), localizado no domínio de ativação glicina-serina do *ACVR1* (Shore et al., 2006).

Outras mutações patogênicas foram identificadas em aminoácidos dos domínios glicina-serina e proteína-quinase do gene *ACVR1* (Figura 3), podendo caracterizar formas atípicas de FOP classificadas como: variantes FOP e FOP-plus. No primeiro grupo, há variação de uma ou ambas as características principais da FOP (hálux valgo e OH). No segundo, há uma ou mais características atípicas, além das clássicas, tais como comprometimento cognitivo, glaucoma entre outras (De Brasi et al., 2021).

Figura 3 – Domínios funcionais do complexo receptor de BMP tipo II e tipo I (ACVR1) com respectivas mutações patogênicas, incluindo a mutação clássica de FOP (R206H).

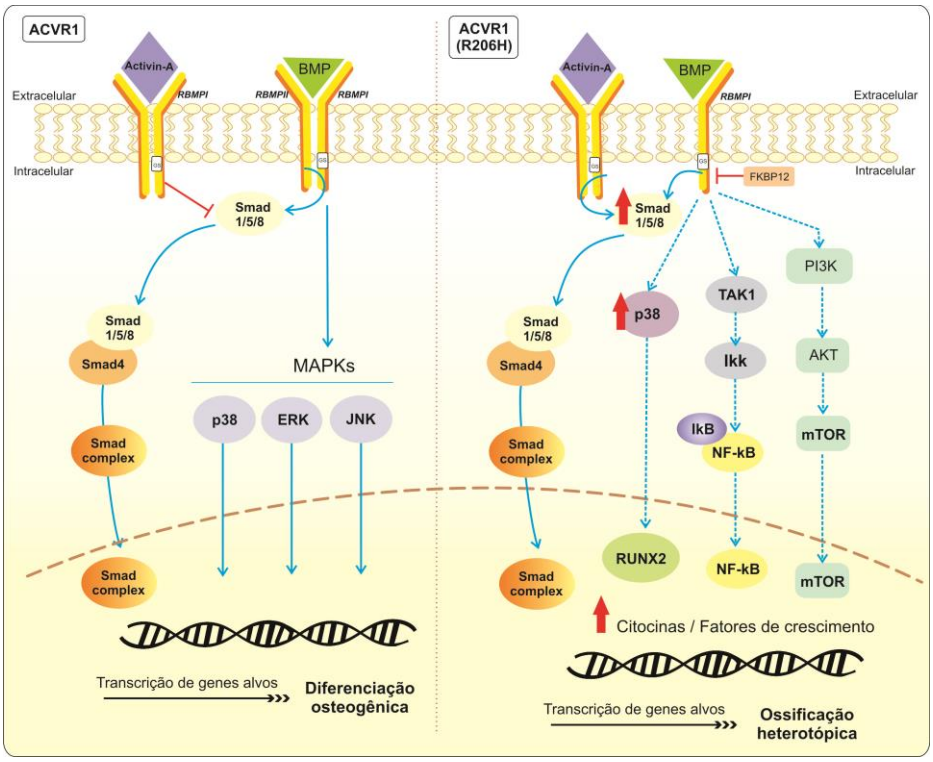


Fonte: Mejias Rivera; Shore; Mourkioti (2024).

O ACVR1 é um dos receptores de superfície celular mediadores da sinalização BMP (do inglês *Bone morphogenetic protein;* proteína morfogenética óssea), que são citocinas multifuncionais, pertencentes a uma família de moléculas sinalizadoras extracelulares altamente conservadas, identificadas em várias espécies de invertebrados e vertebrados, incluindo os mamíferos (Katagiri; Watabe, 2016). Em condições fisiológicas, o receptor ACVR1 (ALK2) forma heterodímeros com outro receptor tipo I, e ao formar um complexo com os receptores tipo II induz a sinalização de cascatas *downstream* (Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024). Peculiar às BMP, elas são capazes de se ligar ao receptor tipo I mesmo na ausência do tipo II, mas suas afinidades de ligação mostram-se expressivamente aumentadas na presença de ambos os receptores (Katagiri; Watabe, 2016). Uma característica comum aos receptores tipo I é a existência de uma região justamembrana citoplasmática rica em glicina e serina (domínio GS). Nesse domínio ocorre a transferência da fosforilação do receptor tipo II para o receptor tipo I, por meio da adição de serinas e treoninas pelos receptores tipo II, sinalizando a via canônica SMAD 1/5/8. Os receptores SMAD fosforilados, por sua vez, associam-se a SMAD 4 e se translocam para o núcleo, onde regulam a transcrição nuclear e a expressão dos genes alvos responsivos a BMP: genes pró-condrogênicos e osteogênicos, como

Runx2. Vias BMP não-canônicas também são sinalizadas a partir da ativação de ACVR1, tais como p38MAPK, ERK e JNK; e PI3K/AKT/mTOR, também induzindo a transcrição de fatores osteogênicos (Figura 4) (Cholok et al., 2018; Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024; Meng; Wang; Hao, 2022).

Figura 4 – Vias de sinalização BMP e Ativina-A em condições fisiológicas (esquerda) e vias de sinalização na FOP mediadas por ACVR1(R206H) (direita).



Fonte: Elaboração própria (2024). RBMPI = receptor de BMP tipo I; RBMPII = receptor de BMP tipo II.

Na região do domínio GS, uma proteína de ligação denominada FKBP1A (ou FKBP12) tem essencialmente a função de ligar e estabilizar a conformação inativa de todos os receptores de TGF-β/BMP tipo I (incluindo o *ACVR1/ALK2*), prevenindo uma ativação irregular desses receptores na ausência do ligante, além de regular sua concentração na membrana celular. Há evidências de uma alteração na interação da FKBP12 com o domínio GS, no caso da FOP, permitindo a ativação do *ACVR1* mutado e subsequente sinalização da cascata BMP/SMAD, independente do ligante de BMP, podendo ser este um dos fatores causadores da desregulação da via BMP (Kaplan; Pignolo; Shore, 2009; Song *et al.*, 2010). Hatsell et al. (2015) não confirmaram essa correlação, mas mostraram em modelo experimental que um alelo ACVR1(R206H) é suficiente para a sinalização alterada de vias canônicas, independente da presença de um alelo selvagem.

Além disso, De Gorter, Jankipersadsing e Tem Dijke (2012) afirmam que as células que expressam *ACVR1(R206H)* exibem fosforilação aumentada dos receptores SMAD, com atividade constitutiva branda em estado basal, que se torna hiperativa na presença de BMP. Sendo assim, a *ACVR1(R206H)* é considerada uma mutação de ganho de função pela ativação da via de sinalização BMP mesmo na ausência de ligantes (ativação constitutiva), pela atuação do gene mutado como receptor de BMP independente do receptor tipo II e pela hiperatividade da via quando ativada/estimulada pelo ligante (Fukuda et al., 2009; Hino et al., 2015).

Além da desregulação da via canônica SMAD, Kaplan *et al.* (2006) assumem que os receptores BMP tipo I ativados fosforilam proteínas intracelulares também da via não-canônica p38 MAPK (Figura 4). Os autores pressupõem que, não obstante o *crosstalk* existente entre as vias, a sinalização SMAD seria a predominante no desenvolvimento embrionário – relacionado à perda de função e malformações congênitas –, enquanto a via p38 MAPK seria a predominante nos processos inflamatórios relacionados ao estresse, tais como resposta a lesões teciduais – referente ao ganho de função e fenótipo pós-natal. Outro experimento do grupo evidenciou que os linfócitos em pacientes FOP são primariamente sinalizados por meio da via BMP-p38 MAPK, mais do que a via BMP-SMAD, em resposta a BMP4, sugerindo um importante papel da desregulação da via p38 MAPK na patogênese da FOP (Fiori et al., 2006). Outras evidências apontam ainda o envolvimento de sinalização PI3K e mTOR na formação da OH (Figura 4) (Hino et al., 2017; Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024).

Um importante avanço na compreensão da fisiopatologia da FOP foi o reconhecimento do papel da Ativina-A, uma citocina relacionada ao TGF-β, que, no ACVR1 selvagem atua como antagonista competitivo das citocinas BMP, e que no receptor mutado pelo *ACVR1(R206H)* atua como agonista, com subsequente ativação da via BMP (Figura 4). Comprovou-se que a presença da Ativina-A como ligante foi tanto necessária como suficiente para direcionar a OH em modelo experimental geneticamente preciso de FOP (Han; Jain; Resnick, 2018; Hatsell et al., 2015). Vários estudos subsequentes suportam a aberrante sinalização da via BMP e ativação TGF-β em resposta a Ativina-A como um terceiro mecanismo causador da OH na FOP (Alessi Wolken et al., 2018; De Ruiter et al., 2023; Hino et al., 2015; Lees-Shepard et al., 2018; Schoenmaker et al., 2021, 2023; Upadhyay et al., 2017), direcionando, inclusive, experimentos de abordagem terapêutica (Hino et al., 2017; Wang et al., 2018). Contraponto, é possível que a ativação de SMAD 1/5/8 pela Ativina-A, no contexto da FOP, sofra variações conforme o tipo celular em questão (Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024).

De modo relevante, Haupt et al. (2018) mostraram *in vitro* (modelo animal) que as células mutadas por ACVR1(R206H) interpretam erroneamente seu microambiente, hiperativando a sinalização da proteína transformadora RhoA (membro A da família homóloga Ras) e efetores *downstream* em resposta a estímulos mecânicos.

2.2.2 Proteína morfogenética óssea (BMP)

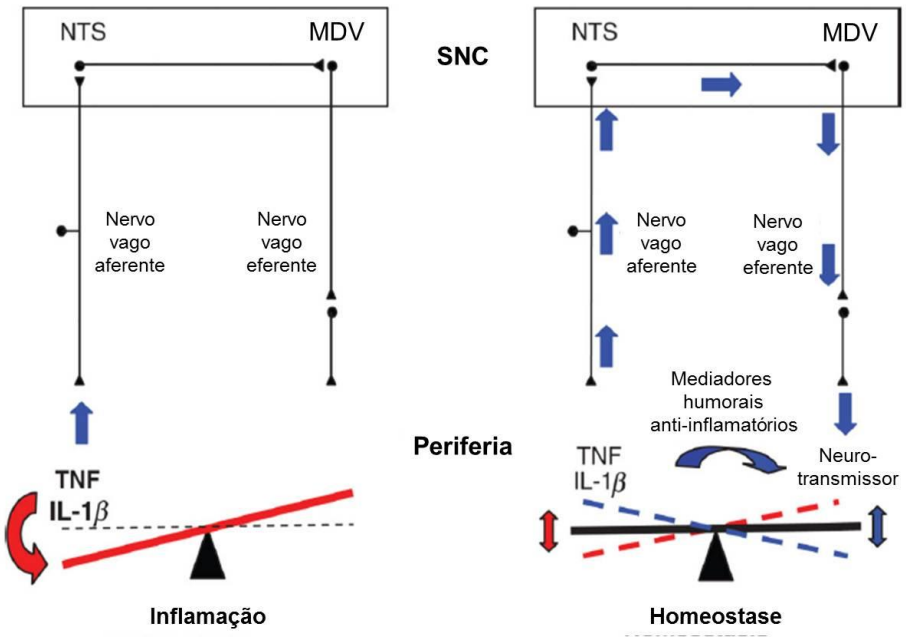
As BMP são membros da superfamília de proteínas TGF-β (fatores de crescimento transformador-beta) e desempenham papel fundamental na embriogênese, organogênese e esqueletogênese, coordenando vários processos do desenvolvimento incluindo determinação do eixo corporal, especificação da camada germinativa, morfogênese tecidual e especificação do destino das células multipotentes (indiferenciadas). Após o nascimento, com expressão reduzida e restrita a tecidos específicos, as BMP atuam crucialmente na regeneração ou reparo dos tecidos ósseo, conjuntivo e vascular, e participam de processos fisiológicos de homeostase, regulando a proliferação, diferenciação e morte de diferentes tipos de células (Katagiri; Watabe, 2016; Salazar; Gamer; Rosen, 2016; Shafritz et al., 1996). Dependendo de quais mecanismos transcricionais são ativados, as BMP são capazes de direcionar a diferenciação de células tronco mesenquimais em adipócitos, condrócitos ou osteoblastos (Kaplan; Pignolo; Shore, 2009; Olmsted-Davis et al., 2007).

Uma das primeiras contribuições científicas na FOP evidenciou a expressão aumentada do gene *BMP4* nos linfócitos presentes na fase fibroproliferativa das lesões iniciais. Pesquisadores propuseram que uma ligação ávida de colágeno tipo IV à proteína BMP-4 provoca aumento em sua concentração local e consequentemente sua autorregulação positiva na expressão de células mesenquimais osteogênicas, resultando no desenvolvimento das lesões fibroproliferativas iniciais (Shafritz et al., 1996). Adicionalmente à BMP-4, pouco se sabe sobre o real papel de BMP-2 na FOP, além de sua expressão demonstrada por imunocoloração em lesões fibroproliferativas iniciais, antes do aparecimento de cartilagem e formação de osso (Gannon et al., 1997). Todavia, a BMP-2, que difere estruturalmente de BMP-4 apenas por um único aminoácido alterado, tem-se mostrado potente indutor de osso ectópico endocondral em modelo experimental, e, por isso, sua sinalização aumentada tem sido relacionada às apresentações de OH genética e adquirida (Kaplan; Pignolo; Shore, 2009; Olmsted-Davis et al., 2007; Salisbury et al., 2010).

2.2.3 Processo inflamatório na FOP

Em condições fisiológicas, todo dano tecidual ou atividade de um agente agressor gera um processo inflamatório externamente manifestado por rubor, edema, calor e dor. Em nível tecidual, células do sistema imunológico induzem a liberação fisiológica de citocinas e outras células pró-inflamatórias importantes para a reparação tecidual ou combate ao patógeno. Concomitante, por meio do reflexo inflamatório sinalizado via nervo vago, mediadores de origem humoral e neural regulam localmente a magnitude da resposta inflamatória, para que o sistema orgânico se mantenha equilibrado enquanto a injúria e a inflamação são resolvidas (Figura 5). Falhas nessa regulação, frequentemente levam ao desenvolvimento de doenças inflamatórias (Ranjbar et al., 2019; Rosas-Ballina; Tracey, 2009).

Figura 5 – Esquema representando o reflexo inflamatório, em que vias neurais e hormonais regulam a magnitude da resposta inflamatória na resolução da injúria.



Fonte: Adaptado de Rosas-Ballina; Tracey (2009). NTS = núcleo do trato solitário; MDV = núcleo motor dorsal do vago; SNC = sistema nervoso central.

Ultimamente sugerida como uma doença de ordem inflamatória, acumulam-se, no estudo da FOP, as evidências de um sistema imune pré-disposto à hiperativação, configurando um estado pró-inflamatório constante, e crucial para formação do osso heterotópico (Barruet et al., 2018; Haviv et al., 2019; Hsieh et al., 2017; Huang et al., 2022; Maekawa et al., 2022; Nikishina et al., 2023; Pignolo et al., 2022a).

Hsieh *et al.* (2017) se propuseram a identificar na saliva citocinas que pudessem ser reconhecidas como biomarcadores diagnósticos da OH, genética ou adquirida. No modelo genético utilizado na pesquisa (*Nfactc1-Cre/caAcvr1*$^{fl/wt}$ *mice*), foram encontrados níveis significativamente aumentados de *IL-1β* na saliva, de *TNF-α* no soro sanguíneo e de *MCP-1* (quimiocina pró-inflamatória) em ambos saliva e soro. Sob análise histológica, os três genes foram localizados nas áreas de formação cartilaginosa da OH. Haviv et al. (2019) mostraram altos níveis plasmáticos de IL-1β em um menino adolescente com FOP.

Barruet *et al.* (2018) sugerem um estado pró-inflamatório contínuo em pacientes FOP associado a hiper-responsividade dos monócitos e macrófagos do sangue periférico à estímulos inflamatórios. Consideram a FOP como uma doença autoinflamatória, cuja mutação genética é capaz de causar alterações bem específicas no sistema imune, mas com efeitos globais. Entre os vários aspectos explorados pelo grupo, a análise multiplex de 69 citocinas no soro sanguíneo revelou níveis significativamente aumentados das interleucinas IL-3, IL-7, IL-8 e IL-10 em um grupo FOP sem crise comparado ao grupo controle. Análises adicionais conduziram ao achado de atividade prolongada de NF-κB nos monócitos FOP estimulados por lipopolissacarídeo (LPS), que seria suficiente para mediar um estado de inflamação crônica.

Estudos prévios do nosso grupo em cultivo celular de PBMC (do inglês, *peripheral blood mononuclear cells*) sugerem um perfil fenotípico inflamatório na FOP, caracterizado pelo desbalanço na expressão de genes envolvidos em vias de sinalização dependentes de cAMP (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADCY1*, *ADCY2* e *ADCY9*), em vias de fibrose e ossificação (*RUNX2*, *COL1* e *COL3*), e em vias inflamatórias (*TNF-α, ADRB1, ADRB2*) (Nascimento et al., 2017; 2021).

Mais recentemente, Pignolo et al. (2022a), ao buscarem potenciais biomarcadores plasmáticos na FOP, mostraram alta correlação de adiponectina e tenascina-C com o genótipo da FOP, além de correlacionar a calicreína-7 com a fase aguda dos *flare-ups*.

Ademais, é importante ressaltar a atividade do sistema imune inato no processo inflamatório e subsequente OH na FOP, evidenciada pela infiltração de mastócitos e macrófagos em lesões iniciais de OH em resposta à ativação dos linfócitos, como revisado por Convente et al. (2015). Gannon et al. (2001) mostraram pela primeira vez a presença de mastócitos em todos os estágios de desenvolvimento das lesões FOP, expressos principalmente na fase fibroproliferativa – altamente vascularizada –, e em densidade muito maior do que em qualquer outra miopatia inflamatória. Os macrófagos, por sua vez, são capazes de secretar numerosas citocinas e quimiocinas pró- e anti-inflamatórias (tais como IL-6 e IL-10), cuja sinalização é fundamental no recrutamento de células fibroproliferativas nos processos de cicatrização e fibrose (Convente et al., 2015).

2.2.4 Ossificação heterotópica na FOP

A ossificação ou osteogênese é um processo rigorosamente coordenado de formação de tecido ósseo que se inicia por volta da sexta semana de gestação e perpetua-se ativo até completos crescimento e maturação dos ossos. No período pós-natal, é um processo normalmente restrito ao reparo ósseo de fraturas. Tanto na embriogênese como no reparo de fraturas, a osteogênese ocorre por meio de duas vias relacionadas, porém distintas: ossificação intramembranosa e ossificação endocondral. Na primeira, as células progenitoras mesenquimais (CPM) se diferenciam em osteoblastos, enquanto na endocondral, as CPM desenvolvem-se primeiro em condrócitos (formadores de cartilagem) para posteriormente haver diferenciação em osteoblastos e formação de osso (Fujimoto; Suda; Katagiri, 2017; Shafritz et al., 1996). Assim, a formação e o remodelamento do tecido ósseo decorrem de um complexo e equilibrado esquema de deposição e reabsorção óssea simultâneas, pelos osteoblastos e osteoclastos, respectivamente. É um processo meticuloso por meio do qual as CPM têm seu destino regulado por diversos estímulos celulares, parácrinos e mecânicos. São atividades antagônicas, acopladas por fatores específicos que ainda requerem esclarecimentos (Boyce et al., 2023; Cholok et al., 2018; Katagiri; Tsukamoto; Kuratani, 2018).

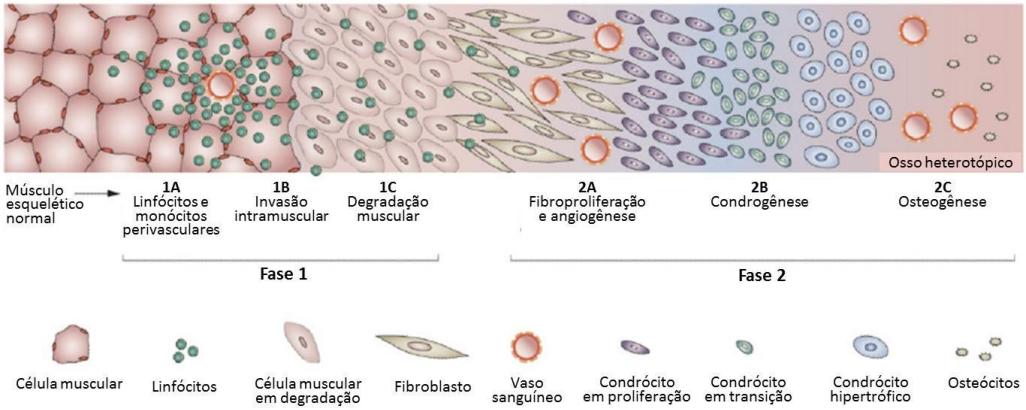
A ossificação heterotópica (OH) é uma condição patológica, na qual a formação de osso ocorre onde e quando não deveria ser formado. Pode ser dividida em duas grandes categorias: OH adquirida (não-genética) e OH hereditária (genética), ambas precedidas por prevalente mecanismo inflamatório, e interpretadas por alguns pesquisadores como resultado de um reparo tecidual anormal e desequilibrado, decorrente da diferenciação inadequada de células progenitoras e influenciado por fatores microambientais locais e/ou sistêmicos (Cholok et al., 2018; Convente et al., 2015).

Especificamente na FOP, além dos achados radiológicos e histológicos, modelos experimentais geneticamente precisos têm confirmado a origem endocondral da OH, muito semelhante à osteogênese fisiológica no período embrionário (Kaplan; Chakkalakal; Shore, 2012; Shafritz et al., 1996; Upadhyay et al., 2017), e ao reparo tecidual pós-fratura (Katagiri; Tsukamoto; Kuratani, 2018; Olmsted-Davis et al., 2007).

O processo histopatológico da OH na FOP pode ser sumarizado em duas fases, conforme ilustrado na figura 6: (1) inflamação e destruição dos tecidos conectivos e (2) formação óssea. Na primeira fase, um estágio catabólico associa-se à injúria e morte celular no tecido afetado, caracterizado por intenso infiltrado mononuclear e perivascular envolvendo macrófagos, linfócitos e mastócitos. A segunda fase, por sua vez, caracteriza-se por

fibroproliferação e angiogênese acompanhada e sequenciada pelo recrutamento e proliferação de células progenitoras, sua diferenciação em condrócitos, maturação e hipertrofia de cartilagem, diferenciação em osteoblastos e formação de osso ectópico maduro (Chakkalakal et al., 2016; Hino et al., 2015; Shore; Kaplan, 2010)

Figura 6 – Representação esquemática da histopatologia da ossificação heterotópica endocondral na FOP, dividida em 2 fases principais: 1) inflamação e destruição de tecidos conectivos, e 2) formação óssea.



Fonte: Adaptado de Shore; Kaplan (2010).

Estudos pré-clínicos mais recentes, utilizando modelos animais geneticamente modificados, têm sugerido como progenitoras da OH, e, por isso, como alvos terapêuticos: células endoteliais, células progenitoras de tenócitos e células mesenquimais residentes no músculo esquelético com potencial condro-osteogênico, especificamente, as células progenitoras fibroadipogênicas (Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024).

Em outro aspecto, um microambiente hipóxico parece não ser suficiente, mas é crucial na patogênese da OH, desempenhando papel crítico como gatilho dos surtos na FOP. Há evidências de que o fator indutor de hipóxia (HIF-1α) retém mACVR1 no endossoma, amplificando e prolongando a sinalização BMP, promovendo a condrogênese e ossificação ectópica endocondral (Wang et al., 2016a). Um amplo estudo constatou por imunocoloração, a expressão significativa de *HIF-1α* nos tecidos analisados de três modelos experimentais de OH (traumático, híbrido e genético), nas fases precedentes à formação de cartilagem e no osso ectópico imaturo (Agarwal et al., 2016). Olmsted-Davis et al. (2007) sugerem, também, que a expressão excessiva de BMP-2 e BMP-4 estimula a produção de adipócitos marrons, cuja atividade respiratória aeróbica leva à rápida queda de tensão local de oxigênio, propiciando a condrogênese, e favorecendo a formação de matriz cartilaginosa.

Salisbury et al. (2010) consideram, ainda, que adipócitos marrons são capazes de expressar fatores angiogênicos, tais como VEGF-A e VEGF-D, necessários para a transição da fase cartilaginosa avascular para a fase de formação óssea, pelo que insinuam a existência de um mecanismo responsável pela regulação local tanto da tensão de oxigênio como da formação de novos vasos no processo de OH. Acredita-se, portanto, na ocorrência de significativas modelagem e remodelagem vascular nas diferentes fases da OH, sugerindo que, nesse processo, a angiogênese e a osteogênese são eventos coordenadamente acoplados por meio de uma relação altamente interdependente (Ben Shoham et al., 2016; Cocks et al., 2017; Olmsted-Davis et al., 2007).

Curiosamente, o osso ectópico na FOP, além de sofrer remodelamento como um osso normal, continua sofrendo expansão, o que poderia explicar a formação do "segundo esqueleto" nos portadores da doença (Upadhyay et al., 2017). Nesse ponto, é interessante considerar que na OH, possivelmente os osteoclastos tenham características estruturais e funcionais diferentes dos expressos em ossos normais, que ainda necessitam de esclarecimentos (Kawao et al., 2016; Schoenmaker et al., 2021, 2023)

Finalmente, acredita-se que esses e outros processos obrigatórios no desenvolvimento do osso endocondral ectópico resultam da interação não incidental de vias complexas de sinalização celular, de modo que a alteração de uma via invariavelmente afeta outra (Cholok et al., 2018). Assim, embora sujeito à mesma fisiologia de um esqueleto normal, a OH decorre da profunda desregulação de mais de uma via de sinalização, que resulta na exacerbação de seus efeitos (Kaplan; Chakkalakal; Shore, 2012).

2.2.5 Dor na FOP

Os surtos recorrentes e as injúrias musculoesqueléticas provenientes da OH, conferem ao portador de FOP não apenas irreversível imobilidade articular, mas também fenótipos variáveis de dor, de difícil manejo clínico e alto impacto na saúde física e emocional (Markowitz et al., 2022; Peng et al., 2019; Yu et al., 2023).

A sensação da dor na FOP é, em geral, intensa e contínua durante o *flare-up*. Entretanto, não é incomum que a dor inflamatória aguda passe a ter caráter crônico, sendo referida mesmo na ausência de crises, no que seria conhecido como período quiescente da doença. A dor persistente varia em intensidade e, por vezes, é diagnosticada clinicamente como dor neuropática (Kitterman et al., 2012; Peng et al., 2019; Yu et al., 2023).

Kitterman et al. (2012) relataram frequência de dor neuropática 20 vezes maior em pacientes com FOP em relação ao relatado pela população geral, correspondendo a 10,1% dos pacientes arrolados no estudo, sendo 16 mulheres e um homem. Outras manifestações neurosensitivas foram relatadas como cefaleia, alodinia e hiperalgesia. Em outro estudo, 55% dos pacientes com FOP relataram, na ausência de crise, níveis de dor tão altos quanto aos associados a *flare-ups*; ainda, 13% dos pacientes foram diagnosticados com dor neuropática (Peng et al., 2019).

Yu et al. (2023) confirmaram hipersensibilidade nociceptiva a estímulos térmicos (calor) e mecânicos em adultos com FOP, na ausência de surtos. Os autores concluíram ainda, em experimento *in vitro*, que a mutação ACVR1(R206H) é tanto necessária quanto suficiente para provocar hiperexcitabilidade de neurônios sensoriais nociceptivos, podendo contribuir para o desenvolvimento da dor neuropática na FOP.

Dados nossos mostraram que em um grupo de portadores de FOP tratados continuamente com ácido ascórbico e propranolol (FOPCON), 47,4% (9/19) afirmaram sentir dor na ausência de *flare-up*, e destes, 55,6% (5/9) relataram dor moderada (publicação em andamento) (Apêndice A).

2.3 Avaliação clínica da FOP

Pignolo e Kaplan (2018) propuseram o estadiamento clínico da FOP em cinco estágios – inicial/leve, moderado, severo, profundo e tardio/final –, a partir de uma avaliação que abrange características da FOP e suas consequências em sete áreas (Anexo B). A princípio, o estágio é definido pela característica mais severa, pois, provavelmente, é a que mais influencia a morbimortalidade, somada a outras características clínicas consistentes com tal estágio. O método inclui a aplicação da Cumulative Analogue Joint Involvement Scale (CAJIS) para FOP, uma avaliação rápida e abrangente da mobilidade funcional grosseira, englobando 12 articulações, além da mandíbula, pescoço e coluna toracolombar (Anexo C). Esta escala avalia o déficit funcional, interpretado como porcentagem de perda do movimento. Escores de zero a dois para cada articulação ou região avaliada, totalizam de zero a 30 pontos. Quanto mais alto o escore final, maior a incapacidade. Acompanha a escala, anotação referente à locomoção e dependência para atividades de vida diária (AVD), que pode ser relacionada às pontuações obtidas em MMII e MMSS, respectivamente (Kaplan; Al Mukaddam; Pignolo, 2017). Visando ao acompanhamento clínico longitudinal, foi desenvolvida a Patient-Reported Mobility

Assessment (PRMA), uma autoavaliação baseada nos critérios da CAJIS (Kaplan; Al Mukaddam; Pignolo, 2018).

Investigações mais recentes visam avaliar o impacto da doença na qualidade de vida física e mental de portadores de FOP e seus familiares e/ou cuidadores. Estudos observacionais têm mostrado associação da dor, imobilidade e incapacidade com relevantes prejuízos sociais e emocionais. Dentre os métodos utilizados nesses estudos citam-se a CAJIS, o FOP-Physical Function Questionnaire (PFQ), escalas PROMIS, e questionários semiestruturados (Patient-Reported Outcomes Measurement Information System) (Markowitz et al., 2022; Peng et al., 2019; Pignolo et al., 2022c).

2.4 Abordagens terapêuticas

Não obstante a intensificação da pesquisa, a FOP permanece uma doença órfã, sem tratamento curativo. O manejo seguro da FOP recomenda medidas de cuidados para a prevenção de traumas e para o controle sintomático dos surtos inflamatórios, visando a manutenção de mobilidade e funcionalidade, com pouca efetividade sobre a progressão natural da doença (Wentworth; Masharani; Hsiao, 2019). A retirada cirúrgica do osso heterotópico com esse objetivo não é indicada (Colmenares-Bonilla; Gonzalez-Segoviano, 2018).

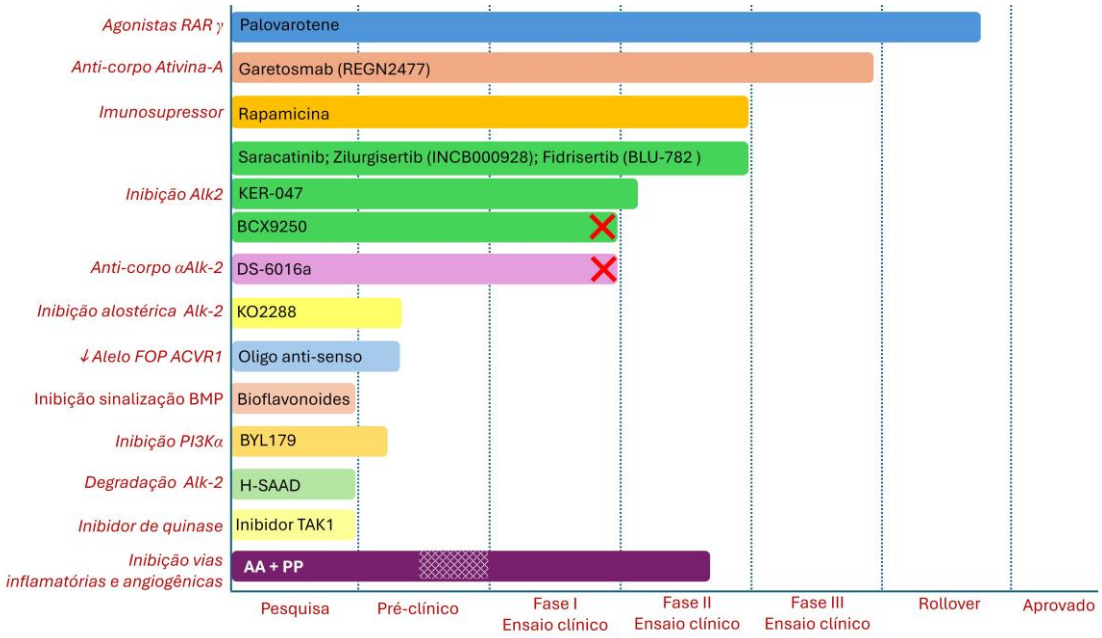
A terapêutica sintomática é amplamente utilizada e inclui o uso de altas doses de corticosteroides (Prednisona, 2 mg/kg/dia) administradas não mais do que quatro dias, visando à redução da inflamação intensa e edema tecidual característicos dos estágios iniciais da doença. Todavia, o benefício da medicação é limitado às primeiras 24 horas do *flare-up* e restrito ao acometimento das grandes articulações e mandíbula. Na descontinuação da prednisona, há relatos do uso de anti-inflamatórios não esteroidais, inibidores de ciclo-oxigenase 2 (COX-2), estabilizadores de mastócitos e inibidores de leucotrienos para o controle da dor crônica e progressão da doença. Pode ser necessário o uso cauteloso de analgesia e relaxantes musculares, tais como ciclobenzaprina, metaxalone ou baclofeno (Kaplan et al., 2019).

Logo após o mapeamento genético da FOP, diversas abordagens terapêuticas foram exploradas: bloqueio da via de sinalização ACVR1/ALK2 (anticorpos monoclonais, inibidores de transdução de sinal, inibidores de RNA e antagonistas BMP); bloqueio dos gatilhos inflamatórios; bloqueio da resposta das células progenitoras do tecido conectivo; alteração da indução e/ou condução dos microambientes que promovem a OH (Kaplan; Groppe; Shore, 2008). A observação *in vitro* da diminuição da sinalização de BMP utilizando-se pequenos RNAs de interferência alelo específicos, capazes de suprimir a expressão do alelo mutante em

células progenitoras mesenquimais de pacientes com FOP, associou a interferência ou silenciamento por RNA (RNAi/siRNA) a um potencial efeito terapêutico no tratamento da FOP (Kaplan; Kaplan; Shore, 2012).

À medida que esclarecimentos biomoleculares foram refinados, potenciais terapias vêm sendo propostas, conforme ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Mapa do avanço de pesquisas na terapêutica da FOP.



Fonte: Adaptado de De Brasi et al. (2021) e IFOPA (2024).

Shimono et al. (2011), considerando ser necessária uma redução da sinalização retinóica durante a condrogênese, demonstraram em modelo animal a atuação de agonistas de receptores gama de ácido retinóico nuclear (RARγ) como inibidores da OH intramuscular e subcutânea. Nesse princípio, o Palovarotene mostrou-se potente inibidor da ossificação ectópica (espontânea e induzida por trauma) desencadeada pela mutação *ACVR1(R206H)* em um modelo animal desenvolvido com células humanas FOP (Chakkalakal et al., 2016). Associado a eventos adversos leves mucocutâneos, Palovarotene é, atualmente, a terapêutica mais avançada nas pesquisas clínicas, aprovada para uso nos Estados Unidos, Canadá e Austrália, mas restrito a pacientes a partir de oito e 10 anos, do sexo feminino e masculino, respectivamente, tendo em vista o comprometimento no crescimento esquelético. Pode, ainda, ter efeitos negativos sobre a audição e a visão em crianças. (Mejias Rivera; Shore; Mourkioti, 2024; Pignolo et al., 2022b; Shaik et al., 2024).

Anticorpos anti-ativina A (REGN2477; Garetosmab) (Hatsell et al., 2015; Hino et al., 2015; Wang et al., 2024) e inibidores da via mTOR (Rapamicina) (Hino et al., 2017; Kaplan et al., 2018; Maekawa et al., 2020) têm se mostrado igualmente promissores, cumprindo fases III e II de ensaios clínicos, respectivamente. Garetosmab, até então, foi testado apenas em adultos, e foi associado com epistaxe leve recorrente, madarose e infecções de pele (Wang et al., 2024). A Rapamicina mostrou-se eficaz na inibição da condrogênese em modelo experimental, mas seu uso contínuo em humanos tem sido associado a efeitos adversos ainda em investigação na FOP. Tem uso limitado em pacientes com comprometimento renal, hepático ou vascular prévio (Shaik et al., 2023), e não mostrou relevância clínica em dois casos clínicos reportados por Kaplan et al. (2018).

Outras abordagens incluem a inibição de transdução de sinal ACVR1/ALK2 (Saracatinib e outros); anticorpos monoclonais anti-ACVR1/ALK2; inibição da sinalização BMP; inibição de quinases; inibidores JAK, entre outras (De Brasi et al., 2021; Nikishina et al., 2023).

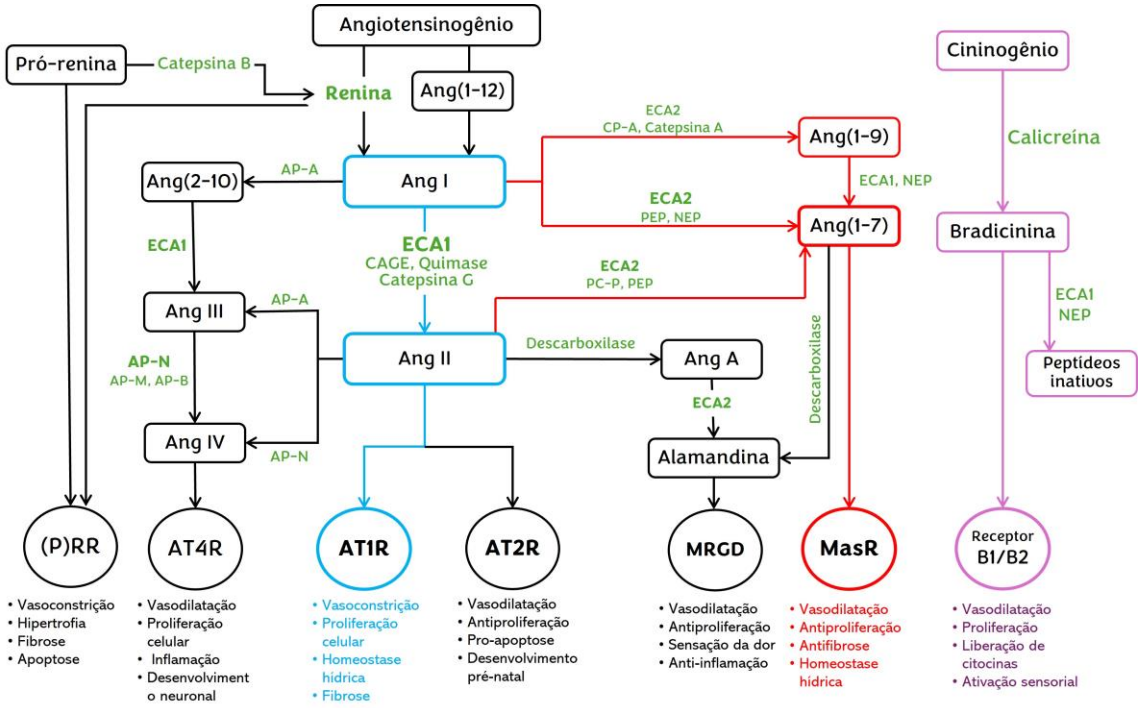
De interesse, e conforme defendido nesta pesquisa, Palhares (1997) observou melhora no controle da doença usando altas doses de ácido ascórbico (500 mg a 2 g/dia) isolado e associado a bifosfonados – especificamente o clodronato dissódico – considerando, em longo prazo, melhora da dor e redução na incidência de surtos (Palhares, 1997; Palhares; Leme, 2001). O uso do ácido ascórbico (AA) tem revelado mínimos efeitos colaterais, e sugerido propriedades neuromoduladoras e neuroprotetoras, melhorando a qualidade do sono e reduzindo a frequência dos *flare-ups* (Palhares et al., 2010). Mais adiante, o grupo propõe a associação do ácido ascórbico com o beta-bloqueador inespecífico propranolol (PP), por seu provável efeito inibidor de angiogênese, etapa necessária ao desenvolvimento de OH. Essa composição foi nomeada *FOPCON*, sob patente BR1020150324928 (Martins et al., 2015; Palhares et al., 2019). Ainda não experimentados em animais, estudos pré-clínicos *in vitro* mostraram viabilidade celular mediante doses experimentais de AA+PP equivalentes às propostas para tratamento *in vivo*, além de modulação gênica de genes potencialmente envolvidos na fisiopatologia da FOP (Nascimento, 2017; Nascimento, 2021). Em geral, o uso de ácido ascórbico e propranolol nas doses propostas por Palhares et al. (2019) não tem sido associado a efeitos adversos ou colaterais, além de representar um composto medicamentoso de baixo custo.

No Brasil, além dos estudos com FOPCON (AA+PP), segundo a IFOPA (2024) há ensaios clínicos de Garetosmab, em fase III; Fidrisertib e Zilurgisertib, em fase II; e Palovarotene em fase *rollover*[2].

2.5 Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

O SRA é classicamente conhecido como um sistema endócrino sintetizado no sistema circulatório, principal responsável pela regulação da pressão sanguínea e equilíbrio hidroeletrolítico. Entretanto, ultimamente, tem sido evidenciado um alto potencial inflamatório do SRA, também por meio de seus efeitos parácrinos (Nehme et al., 2019). Trata-se de um sistema complexo, cujo desbalanço entre seus dois eixos principais e funcionalmente opostos tem sido implicado na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, renais, endócrinas e hepáticas, de ordem inflamatória, fibrótica e tumoral (Cantero-Navarro et al., 2021; Nehme et al., 2019; Santos et al., 2019) (Figura 8).

Figura 8 – Principais vias metabólicas do Sistema Renina-Angiotensina e seus dois eixos principais: clássico e alternativo ou contra-regulatório.



Fonte: Adaptado de Holappa; Vapaatalo; Vaajanen (2017). Eixo clássico (ECA-AngII-AT1) sinalizado em azul e eixo alternativo ou contra-regulatório (ECA2-Ang(1-7)-MAS) sinalizado em vermelho.

[2] Extensão do ensaio clínico que dá continuidade na observação e mensuração da segurança, tolerabilidade e eficácia do medicamento a longo prazo (Burcu et al., 2022).

O eixo clássico, pró-hipertensivo, inclui a enzima conversora de angiotensina (ECA), a angiotensina II (Ang II), e o receptor de angiotensina II tipo 1 (AT1R). O eixo alternativo, anti-hipertensivo ou contra-regulatório, inclui a enzima conversora de angiotensina 2 (ECA2), a angiotensina (1-7) (Ang(1-7)) e o receptor Mas (MAS1) (Cantero-Navarro et al., 2021; Saldanha da Silva et al., 2017; Santos et al., 2019) (Figura 8).

Em geral, ao eixo clássico (ECA-AngII-AT1R) atribui-se a mediação de processos pró-inflamatórios, pró-trombóticos e pró-fibróticos, principalmente pela ativação de receptores AT1. Em contextos patológicos, sua ativação está relacionada a efeitos deletérios como vasoconstrição, inflamação, fibrose, migração e crescimento celular e retenção de fluidos. Por outro lado, o eixo alternativo (ECA2-Ang(1-7)-MAS), por meio da ligação da Ang(1-7) ao receptor Mas, mostra-se protetivo por induzir efeitos fisiológicos normalmente opostos aos produzidos pela AngII, isto é, efeitos anti-inflamatórios, antifibrogênicos e antiproliferativos, modulando negativamente a expressão de citocinas inflamatórias tais como: TNF-α, IL-1β, IL-6, MCP-1, TGF-β, bem como reduzindo a migração e função pró-inflamatória de leucócitos (Cantero-Navarro et al., 2021; Nehme et al., 2019; Santos et al., 2019).

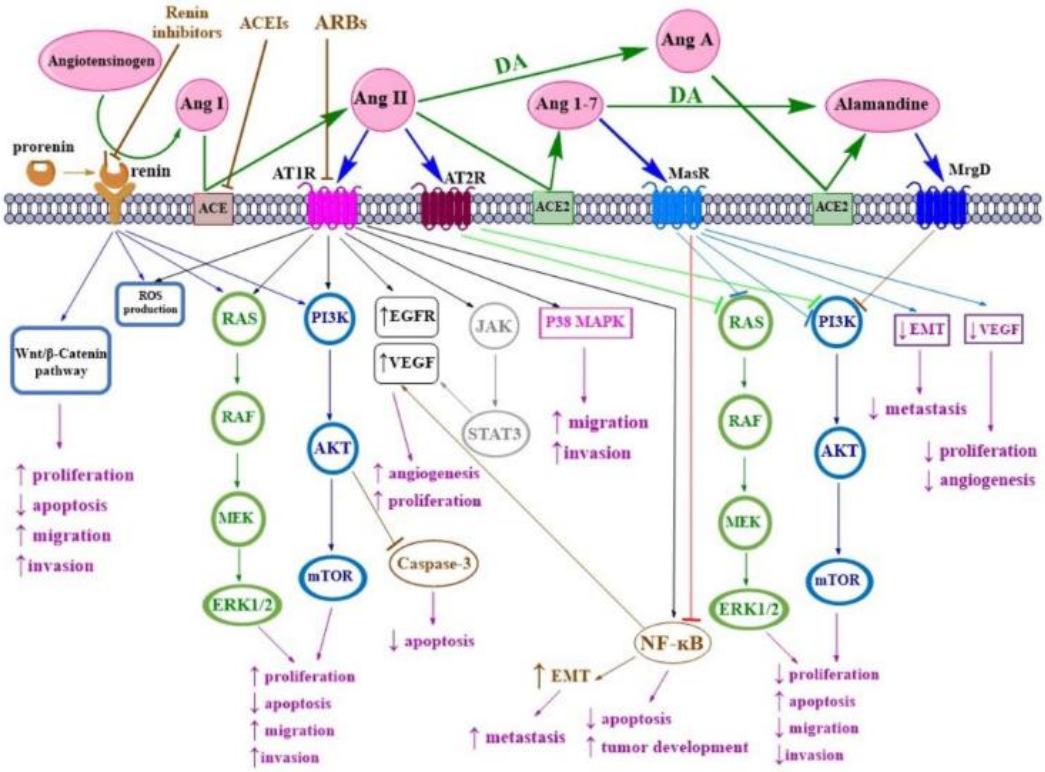
Embora ativados pelo mesmo peptídeo, o receptor de angiotensina II tipo 2 (AT2R) em geral desempenha papel similar, senão somatório, ao da Ang(1-7)/MAS, portanto oposto aos efeitos da AngII/AT1R, e, ao que parece, reservado às situações patológicas (Hassani; Attar; Firouzabadi, 2023; Santos et al., 2019).

Adicionalmente, um novo componente hormonal do SRA foi descrito por Lautner *et al.* (2013) – a alamandina, com estrutura e atividade biológica similares aos da Ang (1-7), que atua por meio da ligação ao receptor MRGD (membro D do receptor acoplado a proteína G relacionado a Mas). O papel de ambos, hormônio e receptor, não é totalmente esclarecido. Presente no sangue, em modelos experimentais, eles foram associados a efeitos anti-hipertensivos e cardiovasculares centrais, bem como efeitos antifibróticos, pela redução de colágeno I, colágeno III e fibronectina (Lautner et al., 2013). Interessantemente, o receptor MRGD tem expressão predominante em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro que inervam as camadas externas da pele dos mamíferos e respondem a estímulos mecânicos e de alteração de temperatura, participando de funções do SNC como sensação ou transdução da dor (Cavanaugh et al., 2009; Lan et al., 2020). Há, ainda, evidências de seu envolvimento na origem e proliferação de câncer (Nishimura et al., 2012).

Além de sua fundamental ação sistêmica, têm sido identificadas expressão e atividade locais do SRA nos tecidos de diferentes órgãos como: coração, rim, medula óssea, vasos sanguíneos, cérebro, intestino, olhos e pele (Bayar et al., 2015; Diao et al., 2014; Holappa;

Vapaatalo; Vaajanen, 2017; Silva et al., 2020). Nesse sentido, à medida que receptores e efetores do SRA foram descobertos e estudados, ampliou-se o conhecimento das vias de sinalização por ele reguladas, implicando sua participação não só na homeostase corporal, mas também na imuno modulação e inflamação, proliferação celular, apoptose, angiogênese, entre outros processos, em contextos fisiológicos e/ou patológicos, como exemplificado na figura 9.

Figura 9 – Derivados do angiotensinogênio e efetores/receptores associados, com vias de sinalização *dowstream* e alguns dos efeitos relacionados ao desenvolvimento/prevenção do câncer.



Fonte: Hassani et al. (2023).

O SRA é um sistema multifacetado, capaz de exercer atividades endócrinas, parácrinas e autócrinas, por meio de expressão gênica tecido-específica, e da complexa sinalização de receptores acoplados à proteína G (GPCR). Trata-se de um sistema que pode tanto ativar quanto inibir diferentes vias de sinalização, com desfechos variáveis a depender do contexto patológico e do órgão/tecido envolvidos (Cantero-Navarro et al., 2021; Nehme et al., 2019).

Há evidências de que a Ang II ativa a fosforilação de p38 MAPK, que medeia sinais críticos para o desenvolvimento de fibrose em disfunções do coração, músculo liso, retina e rim (Morales et al., 2012; Saldanha da Silva et al., 2017). Por outro lado, a interação Ang(1-7)/MAS pode regular vias de sinalização controladoras de inflamação e fibrose, além de ativar efetores

downstream como ON, COX-2 e FOXO1 (Bader, 2013; Hassani; Attar; Firouzabadi, 2023; Westermeier et al., 2015).

A ativação de AT1R desencadeia múltiplas vias de sinalização e a produção de segundos mensageiros intracelulares, como ERO (espécie reativa de oxigênio), por exemplo, que, por sua vez, ativam proteínas intracelulares da família MAPK, incluindo ERK, JNK e p38MAPK (Cantero-Navarro et al., 2021). AT1R também se mostrou capaz de ativar a via de sinalização NF-κB (potencial via reguladora da inflamação) pela fosforilação da subunidade p65, induzindo a suprarregulação de *MCP-1, IL-8, IL-6, TNF-α* e *IL-17*, em cultivo de células mesangiais (Alique et al., 2015). Envolvidas na proliferação de células tumorais, as vias NF-κB e ERK, entre outras, foram sinalizadas pela interação AngII/AT1R, e inibidas pela interação Ang(1-7)/Mas. Adicionalmente, em condições específicas, a via NF-κB pode ser ativada por ambos os receptores AT1 e AT2, como demonstrado em diferentes linhagens celulares, de modelos experimentais (Ruiz-Ortega et al., 2000; Wolf et al., 2002). Outras evidências estabelecem a sinalização *crosstalk* entre o SRA e receptores tipo Toll (TLR) e a provável ativação da via NF-κB (Cantero-Navarro et al., 2021).

Em outro aspecto, pesquisas experimentais têm confirmado a expressão de renina, ECA e receptores AT1 e AT2 no tecido ósseo, além da atividade deletéria da Ang II sobre o tecido ósseo em diversas situações, como na osteoporose e na reparação de fraturas (Bayar et al., 2015; Diao et al., 2014; Garcia et al., 2010). Shuai et al. (2015) reafirmam, baseados em sua revisão literária, a existência de um SRA local no osso, capaz de induzir desordens do metabolismo ósseo, caracterizadas pela redução de atividade osteoblástica e incremento da atividade osteoclástica. Efeitos pró-fibróticos locais da AngII via AT1R, decorrem de potente indução de proteínas como Colágeno III e fibronectina, inclusive em células dos músculos esqueléticos. Ainda, a AngII é capaz não só de induzir a fibrose, mas de mantê-la pelo aumento da expressão de fatores pró-fibróticos como o TGF-β1 e CTGF (fator de crescimento de tecido conjuntivo). Em modelo animal, houve correlação entre hipertensão mediada por AT1 e fibrose no músculo esquelético (Stilhano et al., 2017).

Finalmente, embora o Sistema Renina-angiotensina (SRA) já tenha papel bem estabelecido nos processos inflamatórios e fibróticos de diversas desordens patológicas, sua possível participação na fisiopatologia da FOP ainda consta aspecto não explorado.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de genes do SRA em dois tipos celulares de pacientes portadores de Fibrodisplasia Ossificante Progressiva, bem como a modulação desses genes em resposta ao tratamento *in vivo* com ácido ascórbico e propranolol.

3.2 Objetivos específicos

Para o alcance do objetivo geral foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos:

a) Desenvolver *primers* de oligonucleotídeos específicos para o estudo da expressão de mRNA dos genes alvos que codificam *ECA, ECA2, AGTR1, AGTR2, MAS1* e *MRGD*; *TNF-α, RUNX2, ADRB1* e *ADRB2; NFKB1 (p50), RELA (p65) e VEGFA.*
b) comparar a expressão basal dos mRNA dos genes alvos em células epiteliais da boca (CEB) e leucócitos totais (LT) de indivíduos sem FOP e de portadores de FOP sem tratamento;
c) analisar o efeito do tratamento *in vivo* com FOPCON na modulação gênica dos mRNA dos genes alvos em CEB e em LT de indivíduos portadores de FOP, comparado com indivíduos sem FOP e com portadores de FOP sem tratamento;
d) apresentar dados de avaliação clínica referentes a funcionalidade e eventos adversos.

4 METODOLOGIA

4.1 Tipo de pesquisa

Trata-se de uma pesquisa clínica, integrada a um projeto “guarda-chuva” e parte do ensaio clínico paralelo registrado pelo número (Rebec RBR-9dkn9ry). A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) (CAEE 40606820.5.0000.0021), e os participantes foram arrolados após esclarecimento e assinatura do termo de consentimento (TCLE/TALE) (Apêndice B).

4.2 População

A população participante desta pesquisa é composta de três grupos: (1) indivíduos sem FOP para o grupo controle (n=8 a 13); (2) indivíduos portadores de FOP sem tratamento (n=8); e (3) indivíduos portadores de FOP tratados com FOPCON (n=8).

Tendo em vista a ultra raridade da doença, poucos são os portadores de FOP identificados no Brasil que não recebam nenhum tratamento para controle da FOP, ou que já não estejam vinculados a outros ensaios clínicos. Em geral, os portadores da doença são encaminhados ao pesquisador principal por outros médicos, ou fazem contato por meios próprios, por indicação de outros participantes, ou a partir de divulgações da mídia e redes sociais tradicionais. Assim, na ocasião do experimento e distribuição dos grupos, para compor o grupo (2), foram identificados apenas oito indivíduos com diagnóstico clínico de FOP, que não recebiam tratamento contínuo para FOP (além dos sintomáticos: anti-inflamatórios e analgésicos), ou que, por opção pessoal, havia mais de seis meses estavam sem tratamento com FOPCON. Esse grupo foi submetido nos meses subsequentes a tratamento específico de outro ensaio clínico do mesmo projeto “guarda-chuva”, não constituindo amostras pareadas com o grupo tratado com FOPCON deste trabalho. Também extraídos do projeto “guarda-chuva”, os oito indivíduos do grupo (3) foram selecionados por conveniência.

4.3 Avaliação clínica

Os participantes da pesquisa foram submetidos a duas ou três avaliações presenciais, abrangendo anamnese, exame físico e registro de imagens autorizado em TCLE/TALE. Na

ocasião, foram aplicadas a escala CAJIS (Kaplan; Al Mukaddam; Pignolo, 2017a) e a goniometria[3] de grandes e/ou médias articulações, tais como ombros, cotovelos, quadris e joelhos, desde que fossem acessíveis e não anquilosadas (Figura 10) (Apêndice C). Na escala CAJIS, escore 0 (zero) corresponde a função normal ou déficit < 10%; escore 1, a déficit de 10%-90%; e escore 2, a déficit > 90%. Na goniometria, consideramos para amplitude de movimento normal: abdução de ombro = 0-180 graus; flexão de cotovelo = 0-145 graus; flexão de quadril = 0-125 graus; e flexão de joelho = 0-140 graus (Marques, 2014).

Figura 10 – Goniometria de abdução de ombro e de flexão de cotovelo.

Fonte: Dados da pesquisa (2021). Reprodução proibida.

A fim de avaliar a necessidade de ajuste de doses e observar a ocorrência de efeitos adversos ou colaterais, dos participantes com FOP foram coletados mensalmente dados de peso, frequência cardíaca e pressão arterial durante o período de tratamento. Em quase todos os participantes, a coleta desses dados foi realizada presencialmente nas ocasiões da primeira e última coleta de amostras; nos demais meses, os dados foram medidos pelos próprios participantes ou por seus familiares, e remetidos aos pesquisadores via aplicativo de rede social.

Na última visita, foi também aplicado um questionário semiestruturado (Apêndice D), caracterizando um estudo piloto transversal preparatório para posterior estudo longitudinal (Apêndice A).

4.4 Tratamento *in vivo* com FOPCON (ácido ascórbico + propranolol)

Após a avaliação médica, para os participantes do grupo (3) foram fornecidas doses individualizadas de ácido ascórbico e propranolol (FOPCON), prescritas de acordo com peso e

[3] Método que avalia a amplitude de movimento pela mensuração dos ângulos dos movimentos passivos ou ativos de uma articulação, em seus respectivos planos (Crasto et al., 2015).

idade. Os medicamentos foram manipulados por profissionais farmacêuticos da equipe de pesquisa, em laboratório da universidade. Respeitando a prescrição médica individualizada, os compostos foram triturados juntos, encapsulados semiautomaticamente e armazenados em frascos com sílica, devidamente lacrados e identificados.

Para os participantes com menos de 18 anos de idade, a dose de propranolol não excedeu 2mg/kg/dia, com base no que se sabe sobre o uso seguro do PP no tratamento de hemangioma infantil. Para os adultos, a dose de propranolol variou de 14 a 17 mg por cápsula, ingerida três vezes ao dia, correspondendo a doses consideradas seguras dentro dos fins aprovados pela ANVISA (Cloridrato de propranolol [bula], 2008; Ji et al., 2018; Palhares et al., 2019). A concentração de ácido ascórbico não excedeu a dose de 250 mg por cápsula, também ingerida três vezes ao dia (Vitamina C [bula], 2019; Palhares et al., 2019). Ajustes deveriam ser realizados caso houvesse significativa alteração de peso, pressão arterial e/ou frequência cardíaca; no entanto, tais ajustes não foram necessários no período da pesquisa.

4.5 Amostras

Foram coletados dois tipos de amostras teciduais dos três grupos: mucosa oral (células epiteliais da boca) e sangue venoso periférico (leucócitos totais). Dos oito portadores de FOP sem tratamento, um não concordou com a coleta de sangue, totalizando, portanto, nesse grupo, oito amostras de mucosa oral e sete amostras de sangue periférico.

Dos componentes do grupo FOP tratado com FOPCON, uma vez que já recebiam a medicação antes do ensaio proposto, em caráter *off label*[4], as coletas ocorreram em dois momentos: (1) após uma pausa na medicação por cinco dias, no que se pretendia caracterizar o período denominado "*wash-out"* e (2) após 90 dias ininterruptos do tratamento com FOPCON.

4.5.1 Amostras de mucosa oral (células epiteliais da boca)

Foram obtidas amostras de células epiteliais da boca (CEB) por meio de raspagem do lado interno de cada lado da bochecha, utilizando-se um palito largo de madeira (abaixador de língua) previamente esterilizado (Messias et al., 2024 - https://doi.org/10.26444/jpccr/188214). Imediatamente após a raspagem, a extremidade do palito foi destacada e imersa em um microtubo previamente preenchido com 500 µl de RNAlater® (Ambion™). As amostras foram

[4]Indicação terapêutica de um medicamento, diferente da aprovada ou orientada na bula (CFM, 2013).

transportadas em ar ambiente, e armazenadas em freezer -20°C até o seu processamento, seguindo os critérios estabelecidos em protocolo de biorrepositório (Anexo A).

4.5.2. Amostras de sangue venoso periférico (leucócitos totais)

Para obtenção de leucócitos totais, amostras de sangue foram coletadas por meio de punção venosa periférica, preferencialmente do dorso de uma das mãos. Imediatamente após a coleta, 500 µl de sangue foram transferidos para um microtudo de 1,5 ml previamente preenchido com 500 µl de RNAlater® (Ambion™). As amostras foram transportadas em ar ambiente e armazenadas em freezer -20°C até o seu processamento, respeitando os critérios estabelecidos em protocolo de biorrepositório (Anexo A).

4.6 Extração do RNA total e tratamento com DNase

Resumidamente, após o descongelamento das amostras, a solução foi centrifugada em 700g a 4°C por 15 minutos, para concentração do *pellet* de células. Em seguida, nas amostras de mucosa oral, a extremidade do palito foi removida e o RNA total foi isolado utilizando-se reagente Trizol®, segundo protocolo descrito pelo fabricante, com algumas modificações padronizadas previamente (Nascimento et al., 2019, 2021). Nas amostras de sangue venoso, após a centrifugação descartou-se o sobrenadante e prosseguiu-se com o protocolo do mesmo reagente, a partir do sangue total.

O RNA total foi ressuspenso em 80 ou 100 µl (CEB e sangue, respectivamente) de água *RNAse free* tipo *DEPC* e alíquotas de 1 µl foram quantificadas por leitura a 260 nm no espectrofotômetro NanoDrop™ One (Thermo Scientific™ Spectrophotometer). Na sequência, alíquotas de amostras de RNA total foram tratadas com *DNAse I* (TURBO DNA-free kit, Ambion Inc., Foster, California, USA), extraídas com 2 volumes de fenol tamponado em Tris-EDTA 1M, pH 4,2 e precipitadas com 50% (v/v) de isopropanol (200 *proof*). O *pellet* de RNA tratado com DNAse foi lavado com 700 µl de etanol ultrapuro e ressuspenso em 25 µl de H_2O DEPC. Alíquotas foram quantificadas por leitura a 260 nm, para subsequente utilização na RT-PCR.

4.7 Oligonucleotídeos iniciadores específicos (*primers*)

Os genes alvos selecionados para o estudo de expressão gênica do SRA foram *ECA, ECA2, AGTR1, AGTR2, MAS1* e *MRGD.* Para vias correlatas, selecionou-se *TNF-α, RUNX2, ADRB1, ADRB2, NFKB1 (p50), RELA (p65)* e *VEGFA*. Os oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para a transcrição reversa (RT) e PCR quantitativo em tempo real (qPCRtr), descritos no Quadro 1, foram desenhados e selecionados a partir das sequências alvos dos mRNA específicos, descritos no GeneBank, utilizando-se o programa BLASTn (https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi) e sintetizados pela IDT (Integrated DNA Technologies). Recebidos liofilizados, os *primers* foram ressuspensos em água estéril filtrada (0.22 µm; q.s.p. 100 pmol/µl) e estocados a 10 pmol/µl a -20°C. Como gene de referência, foi utilizado o gene S26 (Vincent; Marty; Fort, 1993).

Quadro 1 – Oligonucleotídeos iniciadores dos genes alvos selecionados.

Gene	Sequência de nucleotídeos (nt)	Fragmento amplificado
ECA	F<GAAGTTTGATGTGAACCAGTTGC> R<CGTTCTAGGTCCTGAACCTTC>	72 pb
ECA2	F<GGCCGAGAAGTTCTTTGTAT> R<CATTTCCTGGGTCCGTTAG>	86 pb
AGTR1	F<TTCAGCCAGCGTCAGTTTCA> R<GGCGGGACTTCATTGGGT>	101 pb
AGTR2	F<TATGGCCTGTTTGTCCTCATTG> R<CCATTGGGCATATTTCTCAGGT>	115 pb
MAS1	F<GCTACAACACGGGCCTCTATCTG> R<TACTCCATGGTGGTCACCAAGC>	160 pb
MRGD	F<TCCCTGCCTCTGAGCATCTA> R<GAGAGGCGTGACAAGCTGAA>	100 pb
TNF-α	F<CCAGGGACCTCTCTCTAATCA> R<GTTTGCTACAACATGGGCTAC>	95 pb
RUNX2	F<CTTGACCATAACCGTCTTCAC> R<CGAGGTCCATCTACTGTAACT>	81 pb
ADRB1	F<TTCTACGTGCCCCTGTGCATC> R<GATCTTCTTCACCTGCTTCTGG>	78 pb
ADRB2	F<CTGTGCGTGATCGCAGTGGAT> R<CTTATTCTTGGTCAGGCTC>	78 pb
NFKB1 (p50)	F<TGACAGAGGCGTGTATAAGG> R<CCACCTTCTGCTTGCAAAT>	79 pb
RELA (p65)	F<TACCTGCCAGATACAGACGA> R<TCATGATGCTCTTGAAGGTCTC>	79 pb
VEGFA	F<GCGTCGCACTGAAACTTTTCGT> R<ACCACGGCTCCTCCGAAG>	61 pb
S26	F<TGTGCTTCCCAAGCTGTATGTGAA> R<CGATTCCTGACTACTTTGCTGTG>	75 pb

Legenda: (pb) pares de base; (F) forward / sense (5’-3’); (R) reverse / anti-sense (5’-3’).

4.8 Transcrição reversa (RT) e reação em cadeia polimerase em tempo real (PCRtr)

4.8.1 Amostras de mucosa oral (células epiteliais da boca)

A transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA (DNA complementar) de fita simples (sscDNA) foi realizada a partir de ~350 ng de RNA, pré-incubado a 70°C por 10 minutos, com 10 pmol de cada *primer* reverso juntamente com 10 pmol de *primer* oligo dT_{20} (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 10,4 µl do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), contendo 4 µl de dNTP mix (10 mM de cada), foram incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de RNA e *primers* previamente descritos. A reação foi terminada a 4°C e armazenada a -20° até a qPCRtr. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-qPCR). As amostras de sscDNA resultantes da RT foram utilizadas na qPCRtr, realizada no equipamento QuantStudioTM 6 Flex Real-Time PCR System, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2022). Amostras em duplicatas foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em volume final de reação de 10 µl. Alíquotas de 3 µl de sscDNA das amostras foram pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se 7 µl de Sybr Mix (5 µl do SYBR Green PCR Master Mix Kit; 2 µl de cada primer [senso e anti-senso] a 0,3 pmol/µl]). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de qPCRtr ocorreram nos seguintes ciclos termais: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60˚C para análise da especificidade dos fragmentos alvos amplificados (*amplicons*).

4.8.2 Amostras de sangue venoso periférico (leucócitos totais)

A transcrição reversa (RT) para síntese de cDNA (DNA complementar) de fita simples (sscDNA) foi realizada a partir de ~500 ng de RNA, pré-incubado a 70°C por 10 minutos, com 10 pmol de cada *primer* reverso juntamente com 10 pmol de *primer* oligo dT_{20} (Invitrogen), seguido de armazenamento em gelo na bancada. Em seguida, 8 µl do mix de enzima transcriptase reversa (40 U) em tampão RT (KCl 50 mM, Tris-HCl 20 mM, pH 8,4), contendo 2 µl de dNTP mix (10 mM de cada), foram incubados a 45°C por 1 hora, com a solução de

RNA e *primers* previamente descritos. A reação foi terminada a 4°C e armazenada a -20° até a qPCRtr. Todos os reagentes foram provenientes da Invitrogen™ (SuperScript™ First-Strand Synthesis System for RT-qPCR). As amostras de sscDNA resultantes da RT foram utilizadas na qPCRtr, realizada no equipamento QuantStudioTM 6 Flex Real-Time PCR System, utilizando-se o protocolo de reação descrito pelo SYBR Green PCR Master Mix Kit (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2022). Amostras em triplicatas foram aplicadas em placas de 384 poços (ABI PRISM® 384-Well Optical Reaction Plate with Barcode, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), em volume final de reação de 10 µl. Alíquotas de 2 µl de sscDNA das amostras foram pipetadas em cada canaleta da placa, adicionando-se, 8 µl de Sybr Mix (5 µl do SYBR Green PCR Master Mix Kit; 3 µl de cada primer [senso e anti-senso] a 0,3 pmol/µl]). A placa foi selada com adesivo óptico (ABI PRISM® Optical Adhesive Covers, Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). As reações de qPCRtr ocorreram no seguintes ciclos termais: [estágio 1] um ciclo de 50°C/2 min.; [estágio 2] um ciclo a 95°C/10 min.; [estágio 3] 40 ciclos de 95°C/15s, seguidos de curva de dissociação a partir de 60˚C para análise da especificidade dos fragmentos alvos amplificados (*amplicons*).

4.9 Análise estatística

Para a quantificação relativa, realizou-se análise comparativa da expressão dos transcritos dos genes alvos com o controle endógeno, utilizando-se o método CT comparativo (*comparative threshold cycle*), no qual o controle endógeno foi utilizado para normalizar a expressão dos genes alvo (média do CT gene alvo – média do CT controle endógeno) gerando o ΔCT (delta CT). A partir do ΔCT, calculou-se o ΔΔCT (ΔCT amostra – ΔCT do calibrador [amostra de referência]). Ao final, aplicou-se a fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ para chegar-se aos níveis relativos de expressão de cada gene alvo (Livak; Schmittgen, 2001).

Realizou-se a análise estatística no programa *GraphPad Prism* 5. A normalidade dos grupos foi analisada pelo teste Kolmogorov-Smirnov e, em seguida, aplicaram-se os testes paramétricos *t de Student* e ANOVA de 1 via, e não-paramétricos Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O resultado foi considerado estatisticamente significativo (*) quando $p < 0,05$; muito significativo (**) quando $p = 0,001$ a $0,01$; e extremamente significativo (***) quando $p < 0,001$. As barras de erro são representadas pelo erro padrão da média. A variabilidade do *n* nas análises estatísticas devem-se a baixa concentração de mRNA ou posterior amplificação insuficiente.

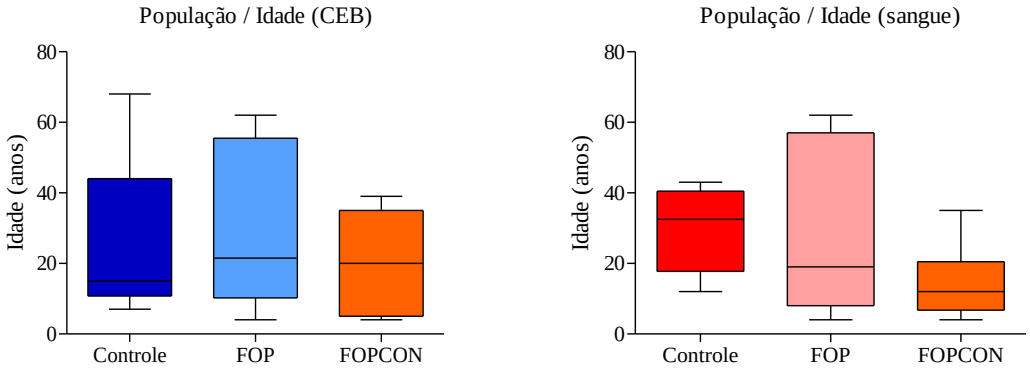
5 RESULTADOS

5.1 População

A condição extremamente rara da doença e a relativa baixa expectativa de vida implicaram na dificuldade de estabelecer padrão de idade ou gênero dentro dos grupos.

A idade dos portadores de FOP sem tratamento variou entre quatro e 62 anos. A idade do grupo tratado com FOPCON variou entre quatro e 39 anos. Não houve diferença entre os grupos, no que diz respeito à idade, tanto nas análises de células epiteliais da boca (CEB) (p=0,81; Kruskal-Wallis) quanto nas de sangue venoso periférico (p=0,12; ANOVA 1 via) (Figura 11). Apesar do pequeno número amostral, também não houve diferença entre os grupos controle e FOP (sem tratamento e tratado) em relação ao gênero (CEB, p=0,32; sangue, p=0,38; Teste Exato de Fisher).

Figura 11 – Participantes da pesquisa separados por grupo em relação a idade.



Fonte: Dados da pesquisa (2023). CEB, p=0,81 (Kruskal-Wallis); sangue, p=0,12 (ANOVA 1 via).

5.2 Avaliação física – CAJIS e goniometria

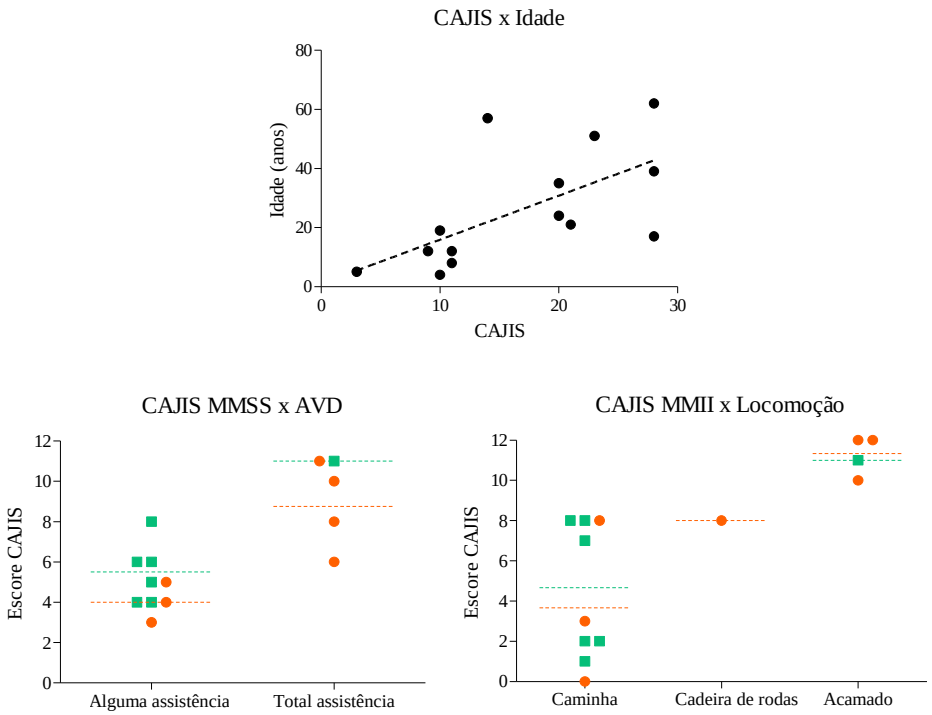
Para avaliar a funcionalidade dos participantes, foram aplicadas a escala CAJIS e a goniometria. Divergências encontradas entre a primeira e a última avaliação foram interpretadas como inexperiência dos avaliadores na aplicação da escala, e não são aqui apresentadas por não serem o escopo principal do trabalho. Após minuciosa reavaliação dos dados, os escores totais da CAJIS obtidos na última avaliação presencial de 14 participantes com FOP[5], variando de 3 a 28, mostraram correlação positiva moderada com a idade dos participantes (p=0,0044, r=0,71;

[5] Compondo grupos FOP sem tratamento e tratados com FOPCON.

Spearman), isto é, escores mais altos da escala (gravidade funcional da doença) foram observados nas idades mais avançadas (Figura 12).

No que tange à realização de atividades de vida diária, 64,3% (9/14) dos participantes necessitam de alguma assistência e pontuaram entre 3 e 8 para membros superiores (MMSS), enquanto 35,7% (5/14) dos participantes necessitam de total assistência, pontuando escores entre 6 e 11 para MMSS. No que se refere à locomoção, 28,6% (4/14) dos participantes estão restritos ao leito, com escores entre 10 e 12 para membros inferiores (MMII). Um participante (7,1%) utiliza cadeira de rodas, com escore de 8 para MMII. Escores entre 0 e 8 de MMII caracterizam os participantes que deambulam (64,3%; 9/14) (Figura 12).

Figura 12 – Escores obtidos na escala CAJIS para avaliação de funcionalidade, em relação à idade, atividades de vida diária (AVD) e locomoção.



Fonte: Dados da pesquisa (2023). Gráfico de correlação, p=0,0044; r=0,71; Spearman. Quadrados verdes: sexo masculino; círculos cor de laranja: sexo feminino.

Embora se pretendesse avaliar por goniometria ao menos quatro grupos articulares, por questões técnicas ou restrições dos pacientes observadas na primeira avaliação, optamos por registrar neste estudo os ângulos de movimento articular para flexão de cotovelos e joelhos, e quando conveniente, para abdução de ombros. Mensurados na última avaliação, valores para cotovelos e joelhos são apresentados no quadro 2, paralelos aos escores CAJIS para as respectivas articulações, dependência para AVD e locomoção.

Quadro 2 – Escala CAJIS de membros superiores (MMSS) e membros inferiores (MMII) e goniometria de cotovelos e joelhos.

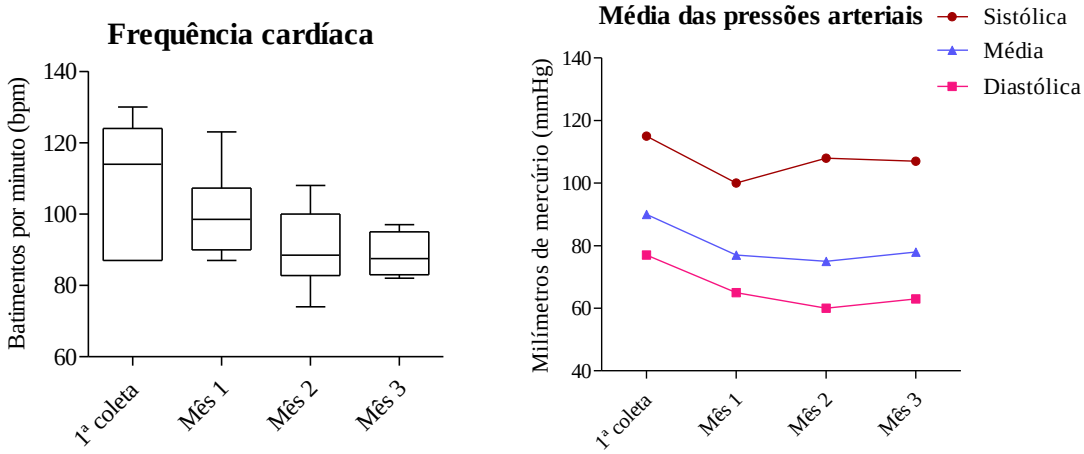
ID	SEXO	IDADE	CAJIS COTOVELO		FLEXÃO DE COTOVELO		ASSISTÊNCIA PARA AVD	CAJIS JOELHO		FLEXÃO DE JOELHO		LOCOMOÇÃO	CAJIS TOTAL
			D	E	D	E		D	E	D	E		
1	F	17	2	2	ANQ	ANQ	TOTAL	1	2	120°-130°	ANQ	ACAMADO	28
3	M	62	2	2	ANQ	ANQ	TOTAL	1	2	0-55°	ANQ	ACAMADO	28
4	F	39	2	2	ANQ	ANQ	TOTAL	2	2	ANQ	ANQ	ACAMADO	28
5	F	12	1	1	50°-130°	70°-136°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA	9
6	F	19	1	0	0-41°	0-135°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA	10
7	F	35	1	1	100°-120°	0-80°	TOTAL	1	1	0-35°	NPT	CADEIRANTE	20
8	M	21	1	1	0-90°	0-108°	ALGUMA	1	1	0-110°	0-55°	CAMINHA	21
9	M	8	1	1	80°-100°	0-120°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA	11
10	M	4	1	1	10°-115°	0-130°	ALGUMA	1	1	0-152°	0-150°	CAMINHA	10
11	F	51	1	1	50°-125°	20-100°	ALGUMA	1	1	10-118°	0-118°	CAMINHA	23
12	M	12	1	1	0-118°	0-120°	ALGUMA	1	2	0-110°	ANQ	CAMINHA	11
13	M	5	1	1	10°-110°	20°-130°	ALGUMA	0	1	0-145°	0-115°	CAMINHA	3
15	M	24	2	2	ANQ	ANQ	ALGUMA	2	1	ANQ	NPT	CAMINHA	20
17	F	57	1	1	10°-110°	0-118°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA	14

Legenda: CAJIS 0 = função normal ou déficit <10%; CAJIS 1 = déficit de 10%-90%; CAJIS 2 = déficit > 90%; ANQ = anquilose; D = direito; E = esquerdo; NPT = não possível testar.

5.3 Análise da pressão arterial e frequência cardíaca dos indivíduos tratados com FOPCON

Dados faltantes de caráter não aleatório (*missing not at random*) (Miot, 2019) comprometeram a análise estatística dos dados de frequência cardíaca e pressões arteriais durante os 90 dias de tratamento. Médias desses dados são apresentadas nos gráficos a seguir (Figura 13).

Figura 13 – Média das frequências cardíacas e pressões arteriais dos indivíduos com FOP durante o tratamento com FOPCON.



Fonte: Dados da pesquisa (2023).

5.4 Expressão basal de mRNA dos genes alvos *AGTR1, AGTR2, MAS1, MRGD, TNF-α, RUNX2* e *ADRB2* em células epiteliais da boca (CEB) nos grupos controle e FOP sem tratamento

Os resultados desta e da próxima subseção compõem o artigo intitulado: "Gene modulation in buccal epithelial cells of patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva treated with ascorbic acid and propranolol" (https://doi.org/10.26444/jpccr/200407).

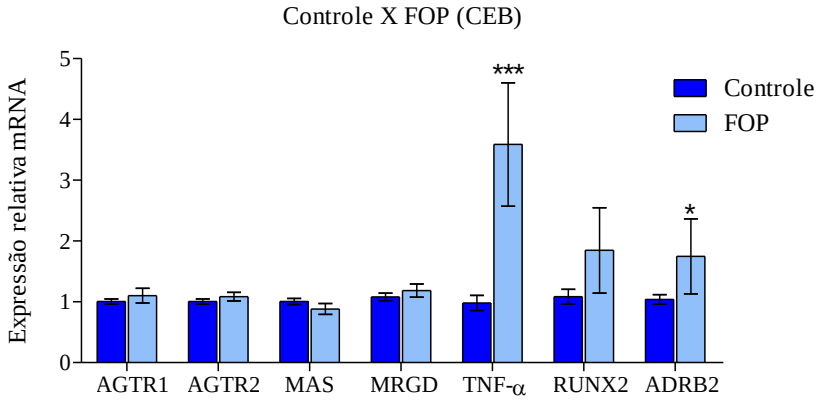
Foi observada a expressão gênica de *AGTR1, AGTR2, MAS1 e MRGD* em CEB dos grupos controle e FOP sem tratamento, sem diferenças entre eles. Na representação de vias correlatas ao SRA observou-se a expressão de *TNF-α*, *RUNX-2* e *ADRB2*, com diferenças significativas na superexpressão de *TNF-α* (p=0,0006) e *ADRB2* (p=0,043) no grupo FOP sem tratamento (Tabela 1; Figura 14).

Tabela 1 – Análise estatística da expressão relativa dos genes alvos em células epiteliais da boca de indivíduos controle e indivíduos FOP sem tratamento.

Gene alvo	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (média ± EPM)		Valor p[a]
	Grupo controle	Grupo FOP	
AGTR1	1,01 ± 0,045 (n=6)	1,10 ± 0,119 (n=5)	0,217
AGTR2	1,01 ± 0,044 (n=6)	1,09 ± 0,070 (n=5)	0,169
MAS1	1,01 ± 0,050 (n=6)	0,88 ± 0,090 (n=5)	0,119
MRGD	1,08 ± 0,062 (n=5)	1,19 ± 0,109 (n=5)	0,215
TNF-α	0,98 ± 0,125 (n=12)	3,59 ± 1,015 (n=5)	0,0006 (↑)
RUNX2	1,09 ± 0,121 (n=13)	1,85 ± 0,703 (n=6)	0,072
ADRB2	1,04 ± 0,080 (n=13)	1,75 ± 0,618 (n=5)	0,043 (↑)

Fonte: Dados da pesquisa (2023). Valor de p < 0,05. [a]Teste *t de Student*. ↑ = suprarregulação.

Figura 14 – Perfil da expressão gênica basal dos genes alvos no grupo FOP sem tratamento em relação ao grupo controle sem FOP, em células epiteliais da boca (CEB).



Fonte: Dados da pesquisa (2023). Teste t de *Student*: *p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

5.5 Expressão de mRNA dos genes alvos em células epiteliais da boca (CEB) de indivíduos FOP em resposta à interrupção do tratamento (*wash-out*) e em resposta ao tratamento *in vivo* com FOPCON

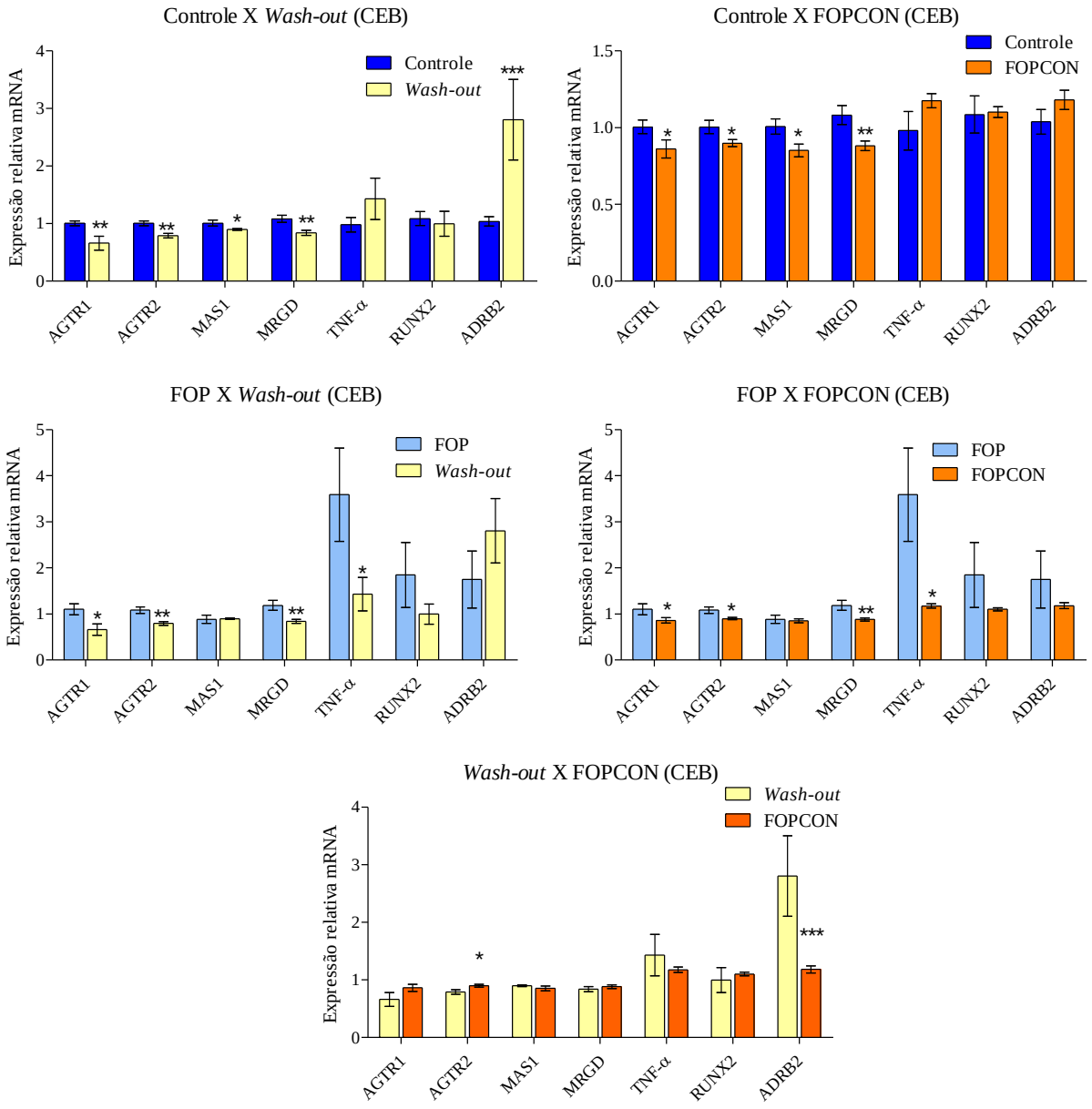
A análise estatística por teste t de *Student* identificou sub-regulação dos quatro genes do SRA tanto na interrupção quanto após o tratamento em relação ao grupo controle. O mesmo comportamento foi observado em relação ao grupo FOP sem tratamento, exceto para o receptor MAS. O tratamento levou à sub-regulação de *TNF-α* em relação ao grupo FOP. Não houve diferenças entre os grupos tratado com FOPCON e interrupção, exceto para a suprarregulação de *AGTR2* e para a sub-regulação de *ADRB2* (Tabela 2; Figura 15).

Tabela 2 - Análise estatística da expressão relativa dos genes alvos em células epiteliais da boca.

Gene	Grupo	$2^{-\Delta\Delta CT}$ / média ± EPM	Valor p[a] (vs. controle)	Valor p[a] (vs. FOP)	Valor p[a] (vs. Interrupção)
AGTR1	Controle	1,01 ± 0,045 (n=6)			
	FOP	1,10 ± 0,119 (n=5)	0,217		
	Interrupção	0,66 ± 0,122 (n=5)	0,010 (↓)	0,016 (↓)	
	FOPCON	0,86 ± 0,059 (n=6)	0,041 (↓)	0,044 (↓)	0,075
AGTR2	Controle	1,01 ± 0,044 (n=6)			
	FOP	1,09 ± 0,070 (n=5)	0,169		
	Interrupção	0,79 ± 0,039 (n=6)	0,002 (↓)	0,002 (↓)	
	FOPCON	0,90 ± 0,023 (n=6)	0,029 (↓)	0,012 (↓)	0,020 (↑)
MAS1	Controle	1,01 ± 0,050 (n=6)			
	FOP	0,88 ± 0,090 (n=5)	0,119		
	Interrupção	0,90 ± 0,016 (n=6)	0,034 (↓)	0,424	
	FOPCON	0,85 ± 0,042 (n=7)	0,018 (↓)	0,371	0,174
MRGD	Controle	1,08 ± 0,062 (n=5)			
	FOP	1,19 ± 0,109 (n=5)	0,215		
	Interrupção	0,84 ± 0,045 (n=6)	0,004[b] (↓)	0,009[b] (↓)	
	FOPCON	0,88 ± 0,032 (n=6)	0,007 (↓)	0,009 (↓)	0,405[b]
TNF-α	Controle	0,98 ± 0,125 (n=12)			
	FOP	3,59 ± 1,015 (n=5)	0,0006 (↑)		
	Interrupção	1,43 ± 0,362 (n=6)	0,080	0,030 (↓)	
	FOPCON	1,18 ± 0,046 (n=8)	0,118	0,005 (↓)	0,214
RUNX2	Controle	1,09 ± 0,121 (n=13)			
	FOP	1,85 ± 0,703 (n=6)	0,072		
	Interrupção	1,00 ± 0,219 (n=7)	0,351	0,121	
	FOPCON	1,10 ± 0,034 (n=8)	0,462	0,119	0,311
ADRB2	Controle	1,04 ± 0,080 (n=13)			
	FOP	1,75 ± 0,618 (n=5)	0,043 (↑)		
	Interrupção	2,81 ± 0,700 (n=6)	0,0008 (↑)	0,148	
	FOPCON	1,18 ± 0,063 (n=8)	0,112	0,132	0,0097 (↓)

Fonte: Dados da pesquisa (2023). Valor de p significativo < 0,05. [a]Teste *t de Student*. [b]Teste Mann-Whitney. ↓ = sub-regulação; ↑ = suprarregulação.

Figura 15 - Expressão relativa dos genes alvos em células epiteliais da boca de indivíduos FOP com interrupção do tratamento (*wash-out*) e FOP tratados com FOPCON, em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento.

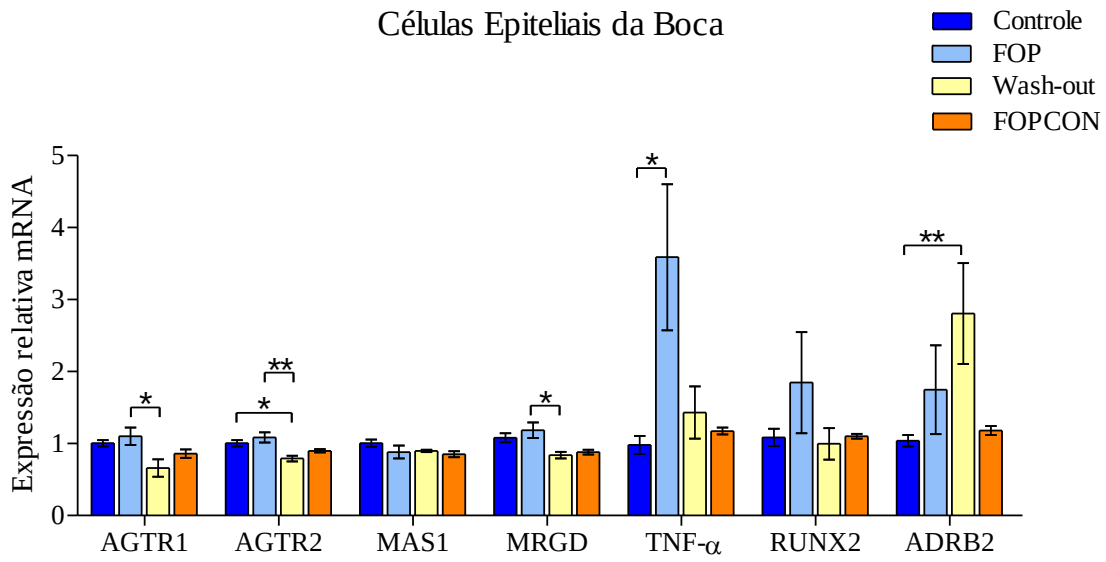


Fonte: Dados da pesquisa (2023). Testes t de *Student* e Mann-Whitney: *p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

Por meio do método ANOVA (pós-teste Bonferroni) ou Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn), nas amostras coletadas no período de interrupção foram confirmadas a sub-regulação de *AGTR2* (p<0,05) e suprarregulação de *ADRB2* (p<0,01) em relação ao grupo controle; e as subregulações de *AGTR1* (p<0,05), *AGTR2* (p<0,01) e *MRGD* (p<0,05) em relação ao grupo FOP sem tratamento.

A ausência de diferenças entre os grupos interrupção e FOPCON sugerem que o efeito de *wash-out* não foi alcançado (Figura 16; Apêndice E).

Figura 16 – Efeitos da interrupção do tratamento (*wash-out*) e do tratamento *in vivo* com FOPCON sobre a expressão dos genes alvos em células epiteliais da boca (CEB) de indivíduos com FOP em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento.



Fonte: Dados da pesquisa (2023). ANOVA (pós-teste de Bonferroni) ou Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn): *p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

5.6 Expressão basal de mRNA dos genes alvos *ECA, ECA2, AGTR1, AGTR2, MAS1, MRGD, TNF-α, RUNX2, ADRB1, ADRB2, NFKB1, RELA* e *VEGF-A*, em leucócitos totais (LT) do sangue venoso periférico nos grupos controle e FOP sem tratamento

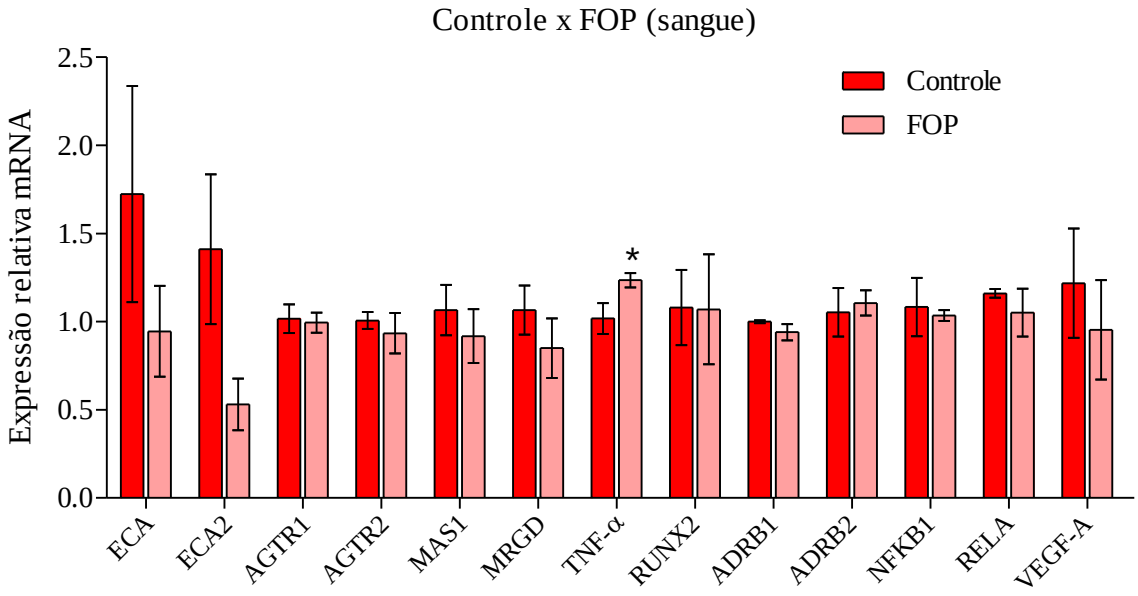
Adicionalmente aos genes pesquisados em CEB, incluiu-se em LT a análise de *ECA, ECA2, NFKB-1 (p50), RELA (p65), VEGF-A* e *ADRB1*. Foi observada a expressão de mRNA de todos os genes alvos pesquisados nas amostras de sangue de ambos os grupos controle e FOP sem tratamento, com diferença apenas para a superexpressão de *TNF-α* (p=0,025) no grupo FOP sem tratamento (Tabela 3; Figura 17).

Tabela 3 – Análise estatística da expressão relativa dos genes alvos em células do sangue periférico de indivíduos controle e indivíduos FOP sem tratamento.

Gene alvo	$2^{-\Delta\Delta CT}$ (média ± EPM)		Valor p[a]
	Grupo controle	Grupo FOP	
ECA	1,72 ± 0,613 (n=6)	0,95 ± 0,257 (n=6)	0,134
ECA2	1,41 ± 0,425 (n=6)	0,53 ± 0,147 (n=5)	0,052
AGTR1	1,02 ± 0,081 (n=6)	0,99 ± 0,057 (n=7)	0,237[b]
AGTR2	1,01 ± 0,047 (n=6)	0,93 ± 0,115 (n=7)	0,298
MAS1	1,07 ± 0,143 (n=7)	0,92 ± 0,152 (n=5)	0,252
MRGD	1,07 ± 0,139 (n=7)	0,85 ± 0,169 (n=5)	0,216[b]
TNF-α	1,02 ± 0,088 (n=6)	1,24 ± 0,041 (n=6)	0,025 (↑)
RUNX2	1,08 ± 0,214 (n=5)	1,07 ± 0,311 (n=6)	0,490
ADRB1	1,00 ± 0,008 (n=5)	0,94 ± 0,046 (n=6)	0,139
ADRB2	1,05 ± 0,137 (n=6)	1,11 ± 0,072 (n=7)	0,366
NFKB1	1,08 ± 0,166 (n=7)	1,04 ± 0,031 (n=6)	0,399
RELA	1,16 ± 0,024 (n=6)	1,05 ± 0,136 (n=7)	0,241
VEGF-A	1,22 ± 0,310 (n=6)	0,95 ± 0,282 (n=5)	0,276

Fonte: Dados da pesquisa (2023; 2024). Valor de p significativo < 0,05; [a]Teste *t de Student*; [b]Teste Mann Whitney.

Figura 17 – Perfil da expressão gênica dos genes alvos no grupo FOP sem tratamento em relação ao grupo controle sem FOP, em leucócitos totais (sangue periférico).



Fonte: Dados da pesquisa (2023;2024). Testes t de *Student* e Mann-Whitney: *p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

5.7 Expressão de mRNA dos genes alvos em leucócitos totais (LT) do sangue venoso periférico de indivíduos FOP em resposta ao tratamento *in vivo* com FOPCON

Por meio da análise estatística *t* de Student, o tratamento *in vivo* com AA+PP mostrou em LT de indivíduos FOP, a suprarregulação de *AGTR1*, *MAS1* e *VEGF-A*, em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento. Suprarregulação de *RUNX2* e sub-regulação de *ADRB1* foram significativas apenas em relação ao grupo controle, enquanto *ECA*, *ECA2* e *NFKB*-1 mostraram-se suprarregulados apenas em relação ao grupo FOP (Tabela 4; Figura 18). Não foram identificadas diferenças significativas para os genes *AGTR2*, *MRGD*, *ADRB2* e *RELA*.

Tabela 4 – Análise estatística da expressão relativa dos genes alvos em células do sangue venoso periférico de indivíduos FOP durante o tratamento com FOPCON.

Gene	Grupo	$2^{-\Delta\Delta CT}$ / média ± EPM	Valor p[a] (vs. controle)	Valor p[a] (vs. FOP)
ECA	Controle	1,72 ± 0,613 (n=6)		
	FOP	0,95 ± 0,257 (n=6)	0,134	
	FOPCON	1,66 ± 0,076 (n=7)	0,459	0,008 (↑)
ECA2	Controle	1,41 ± 0,425 (n=6)		
	FOP	0,53 ± 0,147 (n=5)	0,052	
	FOPCON	1,21 ± 0113 (n=7)	0,314	0,002 (↑)
AGTR1	Controle	1,02 ± 0,081 (n=6)		
	FOP	0,99 ± 0,057 (n=7)	0,237[b]	
	FOPCON	1,20 ± 0,023 (n=8)	0,021[b] (↑)	0,002 (↑)
AGTR2	Controle	1,01 ± 0,047 (n=6)		
	FOP	0,93 ± 0,115 (n=7)	0,298	
	FOPCON	1,07 ± 0,028 (n=8)	0,109	0,115
MAS1	Controle	1,07 ± 0,143 (n=7)		
	FOP	0,92 ± 0,152 (n=5)	0,252	
	FOPCON	1,35 ± 0,014 (n=8)	0,027 (↑)	0,002 (↑)
MRGD	Controle	1,07 ± 0,139 (n=7)		
	FOP	0,85 ± 0,169 (n=5)	0,216[b]	
	FOPCON	1,07 ± 0,018 (n=8)	0,101[b]	0,062
TNF-α	Controle	1,02 ± 0,088 (n=6)		
	FOP	1,24 ± 0,041 (n=6)	0,025 (↑)	
	FOPCON	1,21 ± 0,072 (n=7)	0,060	0,402
RUNX2	Controle	1,08 ± 0,214 (n=5)		
	FOP	1,07 ± 0,311 (n=6)	0,490	
	FOPCON	1,70 ± 0,170 (n=6)	0,024 (↑)	0,054
ADRB1	Controle	1,00 ± 0,008 (n=5)		
	FOP	0,94 ± 0,046 (n=6)	0,139	
	FOPCON	0,86 ± 0,013 (n=6)	<0,0001 (↓)	0,072
ADRB2	Controle	1,05 ± 0,137 (n=6)		
	FOP	1,11 ± 0,072 (n=7)	0,366	
	FOPCON	0,99 ± 0,075 (n=7)	0,334	0,138

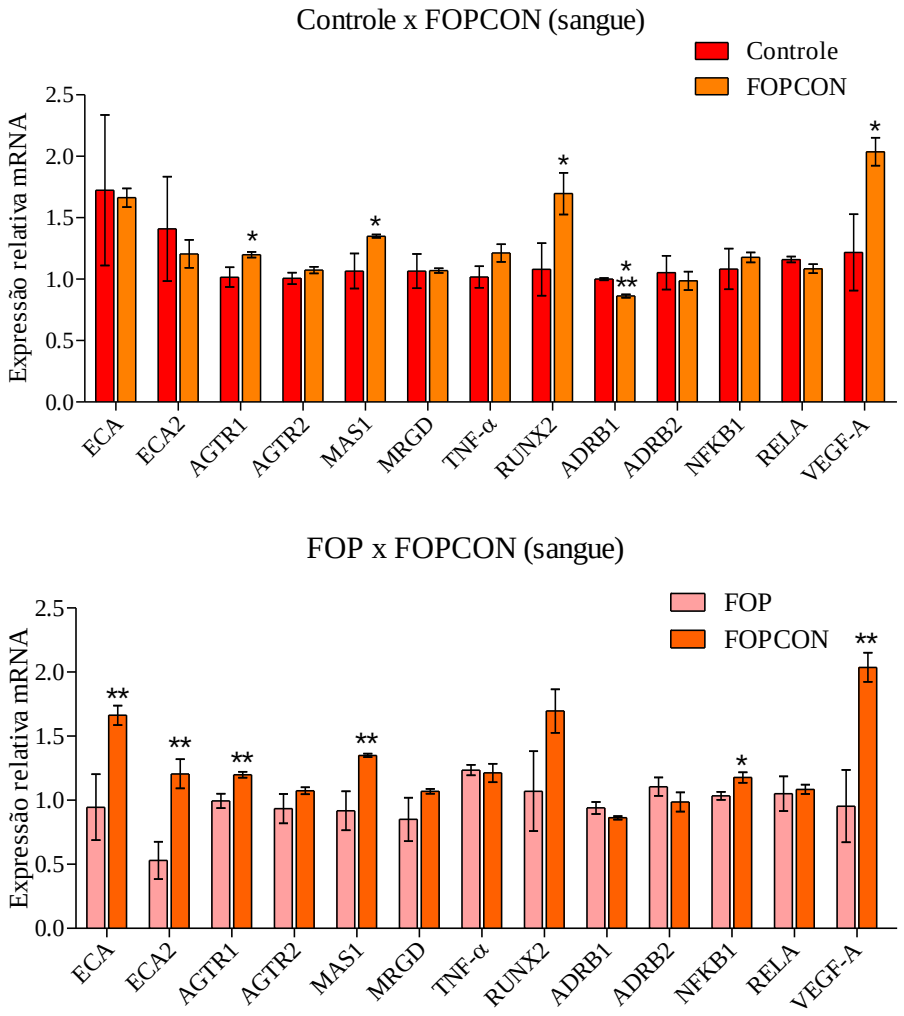
Continua

Continuação

Gene	Grupo	$2^{-\Delta\Delta CT}$ / média ± EPM	Valor p[a] (vs. controle)	Valor p[a] (vs. FOP)
NFKB1	Controle	1,08 ± 0,166 (n=7)		
	FOP	1,04 ± 0,031 (n=6)	0,399	
	FOPCON	1,18 ± 0,040 (n=8)	0,282	0,011 (↑)
RELA	Controle	1,16 ± 0,024 (n=6)		
	FOP	1,05 ± 0,136 (n=7)	0,241	
	FOPCON	1,09 ± 0,036 (n=8)	0,069	0,402
VEGF-A	Controle	1,22 ± 0,310 (n=6)		
	FOP	0,95 ± 0,282 (n=5)	0,276	
	FOPCON	2,04 ± 0,114 (n=6)	0,016 (↑)	0,002 (↑)

Fonte: Dados da pesquisa (2023;2024). Valor de p significativo < 0,05. [a]Teste *t de Student*. [b]Teste Mann-Whitney. ↑ = suprarregulação; ↓ = sub-regulação.

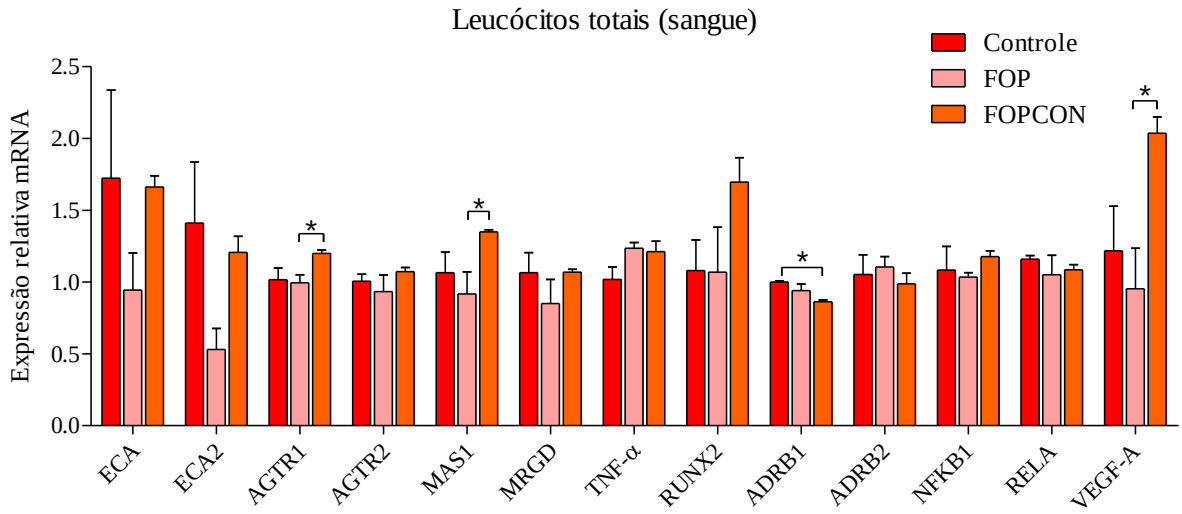
Figura 18 - Expressão relativa dos genes alvos em leucócitos totais do grupo FOP após tratamento *in vivo* com FOPCON comparado com grupos controle e FOP sem tratamento.



Fonte: Dados da pesquisa (2023;2024). *t de Student* ou Mann-Whitney: *p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

Dos efeitos demonstrados acima, além da sub-regulação de *ADRB1* em relação ao grupo controle, apenas as suprarregulações de *AGTR1*, *MAS1* e *VEGF-A* em relação ao grupo FOP sem tratamento são confirmadas, quando os grupos são comparados por ANOVA ou Kruskal-Wallis, (Figura 19; Apêndice F).

Figura 19 - Efeitos do tratamento *in vivo* com FOPCON sobre a expressão dos genes alvos em leucócitos totais de indivíduos com FOP em relação aos grupos controle e FOP sem tratamento.



Fonte: Dados da pesquisa (2023;2024). Anova 1 via com pós teste Bonferroni ou Kruskal-Waliis com pós-teste Dunn. Asteriscos referem-se ao pós-teste:*p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

6 DISCUSSÃO

6.1 Avaliação Clínica

Apesar de uma história natural bem definida, fatores ambientais parecem interferir na evolução/progressão da doença, conferindo certa variabilidade nos fenótipos e prognósticos. Tal fato torna a avaliação clínica da FOP um desafio para clínicos e pesquisadores. Novas perspectivas terapêuticas têm construído paulatinamente um novo cenário na história da FOP (Wentworth; Masharani; Hsiao, 2019). Nesse contexto, mais do que registros evolutivos, é preciso avaliar periódica e criteriosamente a eficácia das terapias experimentais, utilizando instrumentos confiáveis, objetivos, de fácil aplicabilidade e de baixo custo.

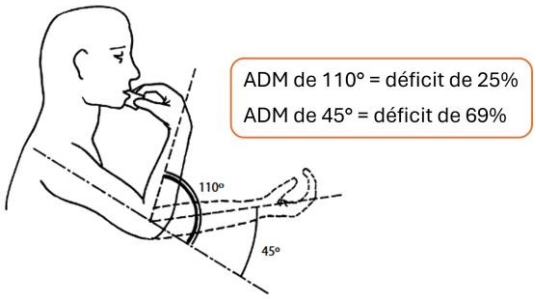
Utilizamos em caráter experimental (estudo piloto) a escala CAJIS para avaliação funcional dos pacientes, complementada pela goniometria de algumas articulações. Um dos aspectos mais impactantes na FOP refere-se à acentuada limitação de movimentos, que compromete precocemente a locomoção e a independência para atividades de vida diária. Embora não seja o escopo principal deste trabalho, foi interessante observar que nem sempre a restrição ao leito ou à cadeira de rodas exclui a capacidade de ficar em pé ou de caminhar, mas representa a posição em que aquele indivíduo permanece por mais tempo, devido a posição de anquilose nos quadris não permitir a posição sentada ou a posição ereta. Certamente, nessas condições, manter-se de pé por algum tempo ou caminhar curtas distâncias pode ser uma atividade exaustiva e pouquíssimo funcional (Figura 20). Por outro lado, entre os que são capazes de caminhar com certa liberdade, não é incomum observar movimentos compensatórios na marcha, e diferentes graus de dificuldade em adotar a posição sentada, o que compromete a acessibilidade e viabilidade de transporte dessas pessoas.

Figura 20 – Diferentes posturas de portadores de FOP devido a anquiloses articulares, limitantes à sedestação e locomoção.

Fonte: Dados da pesquisa (2021, 2022). Reprodução proibida.

Nossos dados corroboram a correlação entre idade e gravidade da doença. Entretanto, apesar da correlação confiável entre os escores totais da CAJIS e a incapacidade de maneira generalizada (Kaplan; Al Mukaddam; Pignolo, 2017a, 2017b), a goniometria permitiu observar níveis de comprometimento muito diferentes, pontuados dentro de um mesmo escore (Quadro 2). É justificável, pois o escore 1 (um) caracteriza uma articulação parcialmente prejudicada, compreendendo um amplo intervalo de 10% a 90% de perda de movimento. Transformando essa percepção em valores objetivos, considerando a ADM normal do cotovelo de 0 a 145 graus (extensão-flexão), um déficit de 25% corresponderá a uma ADM de 110 graus, enquanto um déficit de 69% corresponderá a uma ADM de 45 graus. O escore conferido para ambos os déficits da articulação será o mesmo, entretanto, é provável que com 25% de déficit o indivíduo seja capaz de realizar determinadas tarefas de maneira independente, que serão impossíveis ao indivíduo com déficit de 69%, como alimentar-se sozinho, por exemplo (Figura 20). Isso pode explicar escores iguais para desfechos diferentes em assistência nas AVD e locomoção.

Figura 21 – Ilustração da amplitude de movimento do cotovelo necessária para levar um alimento à boca e sua correspondência com o déficit de movimento em porcentagem.



Fonte: Adaptado de Duffour; Pillu (2016).

Dessa forma, pequenas perdas e/ou ganhos (ainda que raros) de movimento, bem como seu impacto no bem-estar do paciente, poderão ser negligenciados, mesmo que a avaliação seja periódica. Por exemplo, dois participantes do sexo masculino, com quatro e 12 anos de idade, respectivamente, apresentaram mudanças na funcionalidade que não puderam ser valorizadas na escala CAJIS. Embora não tenham sido registrados pela goniometria, houve melhora na amplitude de movimento dos ombros do primeiro, e aumento na deformidade de coluna e quadril do segundo, com impacto na amplitude de movimento dessa articulação (Figura 22). No entanto, as condições da primeira e da última avaliação foram qualificadas no mesmo escore.

Figura 22 – Evolução clínica de dois participantes da pesquisa no período do estudo.

Fonte: Dados da pesquisa (2021; 2022). Reprodução proibida.

Nesse sentido, a goniometria parece ser um método prático, de baixo custo e relevante no registro de movimentos perdidos, preservados, ou até mesmo recuperados, dentro de um plano terapêutico. Por outro lado, admitimos que a goniometria pode ser um método com pouca utilidade em casos demasiadamente avançados. Reservado aos casos menos graves, há ainda a necessidade de algum grau de experiência e habilidade técnica do avaliador, para garantir fidelidade na coleta dos dados, de modo que as articulações sejam avaliadas no plano correto, sem interferência das deformidades já instaladas.

A escala CAJIS também se mostrou um método de avaliação prático e rápido, embora frequentemente não seja um teste sensível a curto prazo (Kaplan; Al Mukaddam; Pignolo, 2017a). Nosso ponto de vista é de que a subjetividade em avaliar a ADM como percepção da porcentagem de movimento pode induzir à atribuição de escores equivocados, sobretudo na interpretação de perdas menores que 10% ou maiores que 90%. A exemplo disso, divergências entre os escores atribuídos na primeira e na última avaliação não foram mostradas aqui por não

serem o escopo principal deste trabalho, mas, em sua maioria, foram interpretadas como necessidade de treinamento da equipe avaliadora.

Desse modo, sugerimos considerar a avaliação da escala CAJIS a cada 6-12 meses, conjunta com a goniometria, sempre que aplicável, para o acompanhamento da evolução clínica e/ou de resultados terapêuticos. Ambos os métodos exigem treinamento prévio dos avaliadores. Inclusive, são necessários estudos adicionais que assegurem a viabilidade da auto-avaliação de mobilidade – PMRA (Kaplan; Al Mukaddam; Pignolo, 2018), bem como a avaliação goniométrica à distância por meio de softwares específicos, diante da comum impossibilidade de consulta presencial.

Em outra perspectiva clínica, não foram observados efeitos adversos durante o uso contínuo de AA+PP, inclusive os que poderiam ser relacionados à ação do betabloqueador (Ji et al., 2018; Cloridrato de propranolol, 2008). Não obstante a análise estatística comprometida, notamos uma queda nas variáveis de frequência cardíaca e pressão arterial medidas entre a primeira coleta e os meses subsequentes de tratamento. Não excluímos a possibilidade de que fatores emocionais tenham interferido nos valores aferidos na primeira coleta, principalmente na pressão arterial – síndrome do avental branco (Franklin et al., 2013). Mas, importa considerar que ao longo do tratamento, os dados observados sugerem a normalização e manutenção dos sinais vitais, não caracterizando efeitos adversos tais como bradicardia ou hipotensão arterial.

6.2 Aspectos biomoleculares

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) tem sido ultimamente considerada uma doença de ordem inflamatória, configurada por um sistema imune pré-disposto à hiperativação capaz de manter um estado pró-inflamatório constante, crucial para a formação do osso heterotópico (Barruet et al., 2018; Del Zotto et al., 2018; Haviv et al., 2019; Hsieh et al., 2017; Maekawa et al., 2020; Nikishina et al., 2023; Pignolo et al., 2022a).

Em sua essência, este trabalho dá continuidade aos estudos que buscam esclarecer os mecanismos moleculares subjacentes aos efeitos benéficos de FOPCON, uma composição farmacêutica que propõe unir os efeitos do propranolol (PP) sobre os sistemas adrenérgico e vascular, aos efeitos antioxidante e anti-inflamatório do ácido ascórbico (AA), com resultados positivos no controle da inflamação e na prevenção de surtos decorrentes de traumas acidentais (Nascimento et al., 2017, 2021; Palhares et al., 2019).

Tendo em vista o consolidado papel de mediadores imunoinflamatórios na fisiopatologia da FOP, não se pode ignorar o potencial terapêutico do AA e do PP sobre esses

componentes, relatado em variados contextos patológicos. O AA, além de atuar como cofator na síntese de colágeno (Palhares, 1997; Nusgens et al., 2001), é um regulador redox em vários processos fisiológicos, que a depender de sua concentração, pode ter efeito anti- ou pró-oxidante (Ferrazzo et al., 2019). Por meio de mecanismos epigenéticos, o AA facilita a diferenciação de células T, modulando a diferenciação de células plasmáticas e promovendo a diferenciação precoce de células-tronco hematopoiéticas em células NK, participando, desse modo, da regulação de células imunes inatas e adaptativas (Maity et al., 2023). O PP, por sua vez, inibe a ativação de células B, células T, mastócitos e macrófagos desencadeada por níveis elevados de catecolaminas (Zhang et al., 2018; Al-Kuraishy et al., 2021).

Nascimento et al. (2017, 2021) enriqueceram o perfil fenotípico inflamatório da FOP ao mostrarem o desbalanço na expressão *in vitro* de transcritos de genes envolvidos em vias de sinalização dependentes de cAMP (*ADRB1*, *ADRB2*, *ADCY1*, *ADCY2* e *ADCY9*), em vias de fibrose e ossificação (*RUNX2*, *COL1* e *COL3*) e em vias inflamatórias (*TNF-α, ADRB1, ADRB2*), quando pesquisados em modelo de cultivo celular PBMC. No prosseguimento do estudo, o tratamento *in vitro* com ácido ascórbico e propranolol provocou a modulação de transcritos componentes do Sistema Renina Angiotensina (SRA), incentivando a continuidade da investigação desse sistema como potencial coadjuvante terapêutico na fisiopatologia da FOP (Nascimento et al., 2021).

Assim, mantendo caráter inovador na pesquisa, mostramos o comportamento de genes codificadores dos principais receptores do SRA no contexto fisiopatológico da FOP, e sua relação com a expressão de genes envolvidos em processos obrigatórios na OH, como inflamação, angiogênese e osteogênese. Previamente pesquisados sob tratamento *in vitro* (Nascimento et al., 2021), aqui, os transcritos foram verificados em células epiteliais da boca (CEB) e em células de sangue venoso periférico – isto é, em leucócitos totais (LT) –, após tratamento com AA+PP (FOPCON) por via oral.

Além de mostrarmos originalmente a expressão *in vivo* de genes alvos putativos ainda não estudados na FOP, os resultados aqui apresentados confirmaram a viabilidade de células vivas epiteliais de mucosa da boca para a obtenção de quantidades suficientes de RNA total, para estudos de expressão gênica. Propomos, dessa forma, minimizar, aos portadores da FOP, a dor e o risco de *flare-up* inerentes às coletas invasivas de amostras (Hsieh et al., 2017; Pignolo; Shore; Kaplan, 2011), e incentivamos o uso desse método para o acompanhamento de condutas terapêuticas em portadores de FOP (Messias et al., 2024), preconizando o treinamento continuado da equipe de coleta, e o mínimo período entre armazenamento e processamento das amostras.

Ressalta-se que, embora sejam encontrados na literatura relatos de extração bem-sucedida de RNA total em amostras de citologia esfoliativa oral (Alves et al., 2016; Reboiras-López et al., 2012), e relatos de expressão de genes do SRA em células escamosas da mucosa oral e língua, em condições patológicas (Liu; Liu, 2025; Featherston et al., 2016; Itinteang et al., 2016), até onde sabemos, inexistem trabalhos que compartilhem desses objetivos na FOP.

Assim como demonstrado em PBMC (Nascimento et al., 2021), aqui não houve diferença na expressão basal dos genes alvos do SRA entre os grupos controle e FOP sem tratamento, tanto em CEB quanto em LT, de modo que estes não caracterizaram um perfil fenotípico marcador da FOP, o que parece ser favorável ao propormos a modulação terapêutica de vias de sinalização não comprometidas, a fim de minimizar os efeitos exacerbados de vias relacionadas, patologicamente desreguladas. Representando vias correlatas ao SRA, mostramos a superexpressão de *TNF-α* em CEB e em LT, no estado basal do grupo FOP sem tratamento, comparado ao grupo controle.

Em resposta ao tratamento *in vivo* com AA + PP (FOPCON) por 90 dias ininterruptos, os genes codificadores para os receptores de Ang II (*AGTR1, AGTR2*), de Ang(1-7) (*MAS1*), e da alamandina (*MRGD*), foram modulados em algum momento, na mesma direção: de sub-regulação em CEB, e de suprarregulação no tecido leucocitário (*AGTR1* e *MAS1*), no qual mostramos, ainda, a suprarregulação de *ECA* e *ECA2* em relação ao grupo FOP sem tratamento.

Separadamente, tanto o AA como o PP têm sido amplamente reportados na modulação gênica em diversas condições patológicas. Entretanto, são raros os relatos da combinação terapêutica de AA com PP (Eslami et al., 2007; Gonzalez et al., 1995), e esses não abrangem seus efeitos sobre o SRA. Acreditamos que efeitos do FOPCON sobre a regulação de expressão gênica do SRA podem tanto ser resultado de mecanismos epigenéticos mediados por ação do ácido ascórbico (Cantero-Navarro et al., 2021; Liu et al., 2022), quanto da inter-relação funcional positiva entre antagonistas beta-adrenérgicos e: receptores de AngII (De Araújo et al., 2018; Poole; Holder; Gipson, 1994); precursores renina e angiotensina I (Vilas-Boas et al., 2008); e inibidores do SRA (Lezama-Martínez et al., 2017).

No sistema cardiovascular, os efeitos protetores de ECA2 (enzima conversora de angiotensina 2) são compreendidos como resultado da limitação de substrato para ECA pela degradação de Ang I em Ang(1-9), e da degradação de Ang II em Ang(1-7) (Santos et al., 2019). Sendo assim, a diminuição na expressão gênica dos receptores AT1 e AT2 observada aqui em CEB poderia supostamente estar relacionada à redução nos níveis de seus precursores ECA e AngII. É uma hipótese, entretanto, enfraquecida pelo comportamento observado para o receptor

da Ang(1-7), também sub-regulado em relação ao grupo controle, e sem diferenças quando comparado com estado basal do grupo FOP.

Diversas evidências revelam o papel da heterodimerização de receptores do SRA nos contextos fisiológicos e patológicos (Mikusic et al., 2024). Interdependência física e funcional entre os receptores de AngII, e entre esses e o receptor MAS, pode explicar parcial e simplificadamente a regulação simultânea de seus respectivos mRNA codificadores. Embora ativados por agonistas distintos, AT2R e MasR são capazes de se dimerizar e assim compartilhar vias de sinalização (Santos et al., 2019; Villela et al., 2015). Ademais, Patel e Hussain (2018), revisando o controle da pressão arterial mediada por AT2R e MasR, citam evidências de interação física e *cross talk* funcional entre AT1R e AT2R, independente do ligante Ang II, na qual a heterodimerização do segundo com o primeiro mostra-se capaz de inibir a função de AT1R, mesmo sem ativação/sinalização de AT2R. Expõem, ainda, que a ativação intrácrina de AT1R é associada com o aumento na expressão de AT2R que pode induzir um *loop* de *feedback* positivo por aumento nos heterômeros AT2R-AT1R. Além disso, a sinalização AngII/AT1R pode ser inibida pela heterodimerização constitutiva de MasR-AT1R, e, por fim, sugerem a existência nativa de um complexo oligomérico de MasR-AT1R-AT2R cujas implicações funcionais ainda precisam ser esclarecidas (Patel; Hussain, 2018). Há, ainda, evidências da heterodimerização entre os receptores MRGD e MAS, necessária na elicitação de alguns dos efeitos protetores mediados pela alamandina (Mikusic et al., 2024).

Interessante, que, *in vitro*, em células HEK-293, o AA modificou de maneira concentração-dependente (1 a 100µmol/l) as propriedades de ligação do receptor AT1, reduzindo sua afinidade de ligação, sem alterar seus níveis de expressão na superfície celular, e sem afetar as propriedades de ligação de AT2R, por um meio não relacionado ao acoplamento da proteína G (Leclerc et al., 2008). Em nossos estudos prévios, AA isolado (2 mM) também não foi capaz de modular a expressão de *AGTR1* em modelo PBMC. Por outro lado, a sua associação ao PP *in vitro* (Nascimento et al., 2021), e *in vivo* (CEB), provocou a sub-regulação de ambos *AGTR1* e *AGTR2*, sugerindo que, em curto prazo, esse efeito seja obtido principalmente por ação do PP.

A investigação do uso do PP no tratamento de doenças cardiovasculares e doenças dependentes de angiogênese e proliferação celular, tem evidenciado a existência de uma relação direta e indireta entre o sistema beta-adrenérgico e o SRA (Fernandez-Pineda, 2016; Hiller et al., 2020; Maccari et al., 2017; Shibuya et al., 2022).

Uma ampla análise experimental *in vitro* e *in vivo* mostrou que receptores AT1 podem interagir diretamente com ambos os subtipos de receptores beta-adrenérgicos (βAR),

desencadeando um fenômeno pelo qual o bloqueio seletivo de βAR inibe a sinalização de AT1R e vice-versa. Os autores acreditam que a transinibição dupla de dois receptores independentes por um único antagonista ocorre pelo desacoplamento funcional do receptor recíproco ao sinalizado, à sua proteína G cognata. Também ressalvam que o efeito dos beta-bloqueadores na sinalização mediada por Ang II é específico ao subtipo de receptores expressos no tecido estudado (Barki-Harrington; Luttrell; Rockman, 2003). Mais adiante, Araújo et al. (2018), analisando os efeitos metabólicos e hemodinâmicos induzidos por Ang II e adrenalina sobre a pressão sanguínea portal em ratos, mostraram prejuízo nos efeitos de Ang II sobre a liberação de glicose hepática com o uso de propranolol e sugerem que ambos os receptores adrenérgicos (alfa 1 e beta) podem interagir direta ou indiretamente prejudicando a sinalização de AT1R. Ao encontro desses princípios, aqui, em CEB a sub-regulação de *AGTR1* é acompanhada pela normalização da expressão do receptor β-adrenérgico tipo 2 (*ADRB2*) em resposta ao tratamento contínuo com AA+PP, ou seja, sem diferenças entre o grupo tratado e grupo controle, esse efeito sugere o bloqueio βAR simultâneo à redução na atividade dos receptores de AngII. Por motivos ainda não esclarecidos para nós, no tecido leucocitário o bloqueio βAR é sugerido pela sub-regulação do receptor tipo 1 (*ADRB1*), sem alteração na expressão do receptor tipo 2 (*ADRB2*), e, diferente do tecido epitelial, esse efeito foi acompanhado por modulação positiva de *AGTR1*. Receptores beta-adrenérgicos são expressos em macrófagos e monócitos humanos; existem evidências de que, dependendo das condições em que são ativados ou bloqueados, podem ser gerados efeitos e respostas tanto anti-inflamatórias, como pró-inflamatórias. É possível, inclusive, que a responsividade desses receptores sofra modificações durante a diferenciação celular (Scanzano; Consentino, 2015), pelo que se faz necessária a caracterização das células expressas nos modelos aqui estudados, para melhor interpretação dos resultados obtidos.

Retomando a farmacodinâmica do AA, experimentos *in vitro* e *in vivo* de modelo animal mostraram que a vitamina C reduziu os níveis da proteína ECA2, sem afetar significativamente os respectivos níveis de mRNA, no combate à infecção viral por SARS-CoV-2-S (Zuo et al., 2023). No sistema cardiovascular, o AA levou à subexpressão (normalização) de mRNA e proteína ECA1 no córtex renal de modelo animal de hipertensão induzida pela inflamação. Um efeito protetor resultante da desacetilação da histona de ECA1, confirmando a capacidade de modulação epigenética do AA (Wang et al., 2016b).

Já o propranolol tem mostrado efeitos antiangiogênicos associados à regulação de ECA e demais componentes do SRA. Sulzberger et al. (2016) mostraram a involução de hemangioma infantil (HI) acompanhada por redução dos níveis séricos de renina, ECA e Ang II, em pacientes

tratados com doses diárias de PP inicial de 0,5 mg/kg/dia, e final de 2,0 mg/kg/dia, por até 14,2 meses. Dornhoffer et al. (2017) relataram a expressão significativamente aumentada de *AGTR1*, *ECA* e *AGT* (angiotensinogênio) em tecido de HI em proliferação, quando comparado ao tecido normal e ao tecido extraído de crianças previamente tratadas com PP. O tratamento também levou à redução do nível de proteína de ECA e AGTR1, mas não interferiu nos níveis séricos de ECA.

Aqui, precursores da angiotensina não puderam ser pesquisados em CEB. Ainda assim, supondo que a subexpressão de *AGTR1* e *AGTR2* observada nesse tecido tenha sido associada à subexpressão de seu precursor *ECA*, e da atividade de Ang II, sugerimos que o composto FOPCON, em nível tecidual, poderia contribuir com a inibição da angiogênese, fator necessário e precedente à OH. Contraponto, a modulação contrária de *ECA* e *AGTR1* em LT desperta questionamentos em relação a esse efeito. Conjecturamos que a suprarregulação de *ECA* e *AGTR1* no sangue possa ser uma resposta leucocitária ao efeito local inibidor de PP, e não propriamente ao seu efeito sistêmico. Ainda assim, investigamos o fator de crescimento endotelial vascular (*VEGF-A*) em células do sangue, dadas as evidências de relação direta entre a atividade de VEGF e a ativação de receptores da AngII (Khakoo et al., 2008).

Itinteang et al. (2011) consideram que células tronco mesenquimais presentes no HI secretam VEGF quando estimuladas com Ang II, e que o tratamento com propranolol resultaria na diminuição de ambos os fatores. Em outro contexto patológico, confirmando dados precedentes de que o bloqueio beta-adrenérgico reduz a expressão de VEGF em diferentes tumores locais, Shibuya et al. (2022) mostraram em experimento *in vitro* a simultânea redução na expressão das proteínas VEGF e NF-κB em linhagem celular de carcinoma de células escamosas da boca, em resposta ao tratamento com PP, na qual também encontraram significativos valores de expressão de ADRB2 no estado basal, fato que pareceu estar associado a piores prognósticos da doença.

Aqui, analisados apenas nas amostras de sangue venoso periférico, mostramos grande variabilidade na expressão gênica relativa de *ECA, ECA2* e *VEGF-A* no estado basal dos grupos controle e FOP sem tratamento, sem diferença significativa entre eles (Apêndice F). Posteriormente, mostramos a superexpressão de *VEGF-A* nas amostras de pacientes tratados com AA+PP. Considerando que esses genes não se mostraram alterados no estado basal, estudos adicionais tornam-se necessários para esclarecer, em resposta ao tratamento, a correlação entre os níveis elevados de VEGF-A, ECA e AGTR1, como demonstrado por Wu et al. (2020) em tecido e líquido sinovial de pacientes com osteoartrite e artrite reumatóide; ou,

ainda, entre VEGF-A, ECA2 e MAS, como mostrado *in vitro* por Joshi et al. (2019) como efeito facilitador do reparo vascular em áreas de isquemia.

Importa considerar que a variabilidade de expressão observada para *ECA* e *ECA2* no estado basal do grupo controle pode interferir na análise estatística, de modo que repetir essa análise com grupo amostral maior torna-se importante para melhor esclarecimento desses dados. Não obstante o número pequeno de amostras, as observações obtidas podem refletir a realidade de uma população maior, por isso foram trazidas em discussão. Por exemplo, o gene ECA2 é localizado no cromossomo X, e parece razoável que haja diferenças na atividade do eixo ECA2-Ang(1-7)-MAS ou nos níveis circulantes de ECA2 entre os gêneros masculino e feminino, conforme citado e demonstrado por Zhou et al. (2020). Em contrapartida, outro ponto a ser esclarecido, é o quanto essa variabilidade se deve ao polimorfismo genético de *ECA* e *ECA2*.

Ainda nesse sentido, considerando a complexidade e multiplicidade de elementos e mecanismos regulatórios na expressão de VEGF-A (Arcondeguy et al., 2013), bem como especificidades referentes a coleta, armazenamento e processamento de amostras para pesquisa desse fator (Azimi-Nezhad et al., 2012), entendemos que análises adicionais de *VEGF-A* na FOP e em resposta ao uso contínuo de AA+PP são necessárias, incluindo análises pré-clínicas *in vitro*. Por enquanto, nossos resultados, parcialmente coerentes com a literatura, não são suficientes para suportar ou refutar a hipótese de que PP adicionado ao tratamento contínuo com AA (FOPCON) interfira significativamente na angiogênese. Além disso, VEGFA é um fator crucial para osteogênese fisiológica e homeostase do organismo (Li et al., 2024), de modo que, em contextos patológicos, a suprarregulação de seu mRNA no sangue como resposta terapêutica deve ser cautelosamente estudada e interpretada.

Prosseguindo a discussão, o eixo ECA2-Ang(1-7)-MAS é conhecido por seus efeitos anti-inflamatório, antifibrogênico e antiproliferativo, modulando negativamente a expressão de citocinas inflamatórias. Jiang et al. (2019) mostraram que Ang(1-7)/MAS inibiu a produção e secreção de TNF-α e IL-6 em macrófagos, e a superexpressão de TLR4 mediada pela via de sinalização JNK/FoxO1. Adicionalmente, revisões de literatura relatam que Ang(1-7)/MAS reduz a sinalização TGF-β/NF-κB e a expressão de moléculas pró-inflamatórias como TNF-α, MCP-1, IL-8, IL-1β e COX-2, *in vitro* e *in vivo* (Santos et al., 2018). Esse eixo também é capaz de reduzir a migração e a função pró-inflamatória de leucócitos em estados patológicos (Balogh et al., 2021; Hassani; Attar; Firouzabadi, 2023). Chama a atenção em nosso estudo o suposto favorecimento deste eixo no tecido leucocitário, sugerido pela suprarregulação de *ECA2* e *MAS1* em resposta ao tratamento, que, outrossim, contrarregula a modulação também positiva

do eixo ECA-AngII-AT1R. Curiosamente, no sangue, não houve modulação de *AGTR2*, embora no tecido epitelial da boca ele tenha acompanhado a regulação de seu cognato *AGTR1*.

Potencial citocina pró-inflamatória, TNF-α (fator de necrose tumoral alfa) é expresso principalmente por macrófagos ativados, um mensageiro imunológico que, quando excessivo, desempenha papéis críticos em várias doenças inflamatórias. Também é secretado por outros tipos de células como: células T, células B, células dendríticas e mastócitos (Sethi; Hotamisligil, 2021). Provável marcador inflamatório na FOP, níveis séricos de TNF-α mostraram-se elevados em modelo animal similar a FOP, no qual histologicamente também foi superexpresso em áreas de formação cartilaginosa (Agarwal et al., 2015). Em indivíduos com FOP, há relatos de níveis plasmáticos de TNF-α acima da média durante o *flare-up*, e tendência de suprarregulação em período de quiescência (Barruet et al., 2018; Hildebrand et al., 2017). Entre os marcadores plasmáticos, vias TNF parecem estar estreitamente relacionadas ao genótipo da FOP (Pignolo et al., 2022a).

Uma vez demonstrada a sua superexpressão no estado basal de células FOP em nossos estudos anteriores – *in vitro* em PBMC, e *in vivo* em CEB (Nascimento et al., 2021; Messias et al., 2024) –, TNF-α segue como um importante gene alvo no entendimento da fisiopatologia e do tratamento clínico da FOP, desempenhando um complexo, e por vezes controverso papel, como potencial reguladora tanto da inflamação como do metabolismo ósseo (Barruet et al., 2018; Boyce et al., 2023). Concordando com nossa perspectiva, o AA mostrou-se ativo em todos os estágios do processo de reparação de feridas, especialmente no estágio inflamatório inicial, pela sub-regulação de vários genes pró-inflamatórios, inclusive *TNF-α* (Kalonia et al., 2023). Por outro lado, o uso de beta-bloqueadores como o PP tem efeitos anti-inflamatórios ao interromper a interação do sistema simpático com a produção intensa de citocinas pró-inflamatórias, no que se pode conhecer como tempestade de citocinas (Al-Kuraishy et al., 2021).

Nossos dados sugerem, em nível tecidual (CEB), efeito anti-inflamatório do composto AA+PP pela consequente subexpressão (ou normalização) de *TNF-α*, que poderia ser decorrente do bloqueio βAR não seletivo e/ou da inibição do eixo pró-inflamatório AngII/AT1R, mas não da ativação de seu eixo contrarregulatório ECA2/Ang(1-7)/MAS, como preconizado na literatura. De outro lado, em LT, nem o favorecimento do eixo Ang(1-7)/MAS, nem o aumento na expressão de *AGTR1* surtiram efeito sobre *TNF-α*, o que especulamos ser uma resposta de equilíbrio entre os dois eixos funcionalmente opostos. Resta esclarecer qual seria a resposta primária ao tratamento.

Considerando a dor crônica como outro importante aspecto clínico a ser tratado na FOP, citamos Balogh et al. (2021) que, em uma abrangente revisão, afirmam que o conjunto dos ligantes Ang II e Ang(1-7) e seus respectivos receptores, têm, por meio de suas funções fisiológicas, importantes implicações na dor neuropática, operando nos sistemas nervoso central e periférico, e em células não neuronais envolvidas em mecanismo da dor, como por exemplo, nos leucócitos. Em uma intrigante discussão os autores consideram que efeitos neuroprotetivos decorrentes da ativação de AT2R por Ang II contrapõem-se às propriedades analgésicas decorrentes de sua inibição no tratamento da dor neuropática. Isto é, enquanto a ativação de AT2R seria capaz de facilitar a proteção e regeneração neuronal em condições que tais processos estão patologicamente prejudicados, seu antagonismo (EMA401) mostrou efeito antinociceptivo pela inibição do influxo de cálcio (Balogh et al., 2021; Rice et al., 2014). Chamam a atenção evidências pré-clínicas que sugerem que a Ang II via AT1R é capaz de incrementar a sensação nociceptiva atuando sobre componentes neuromedulares controladores da dor. Por outro lado, aumentar a sinalização MasR – pela ativação de ECA2 e/ou aumento na disponibilidade de Ang(1-7) – pode oferecer uma abordagem adicional no alcance de analgesia, ao contraregular o comportamento nociceptivo induzido por Ang II/AT1R (Balogh et al., 2021).

Nesse sentido, mostramos previamente a modulação positiva de *AGTR2* e *MAS* em resposta ao tratamento *in vitro* com AA+PP (Nascimento et al., 2021), que junto com os dados *in vivo* mostram o eixo ECA2/Ang(1-7)/MAS como um potencial alvo terapêutico para a adição de peptídeos com efeitos anti-inflamatórios ao tratamento, a fim de potencializar os efeitos de AA+PP no subsídio do controle da inflamação e da dor.

De forma pertinente, várias evidências implicam a atividade de receptores beta-adrenérgicos na transmissão da dor, a saber β2 (ADRB2) e β3, por meio da ativação de células imunorregulatórias. Por exemplo, níveis de catecolaminas aumentadas após estresse ou manipulação farmacológica levam à ativação de células T, mastócitos e macrófagos, mediada por ADRB2. Dados em modelo experimental mostraram o aumento dos níveis plasmáticos de TNF-α, IL-1β e IL-6 mediado por ADRB2, em resposta ao aumento de catecolaminas, suficiente para o desenvolvimento de dor funcional (Zhang et al. 2018). Mais do que isso, Zhang et al. (2018) mostraram que a estimulação sustentada de ADRB2 e ADRB3 geram dor funcional e neuroinflamação, que podem persistir mesmo após remoção do estímulo causador dessa condição. Sugerem, ainda, que a dor funcional iniciada perifericamente é regulada centralmente por TNF-α e p38MAPK.

Peng et al. (2019), em um estudo longitudinal com 99 portadores de FOP, observaram que 30% a 55% dos participantes sofriam, na ausência de crises, níveis de dor tão elevados

quanto os sofridos durante as crises. Mostraram, ainda, entre os pacientes que relataram dor maior ou igual a 4 (em uma escala de 0 a 10, crescente conforme a intensidade da dor), quadros de ansiedade, depressão ou irritabilidade, com impacto emocional em alguns casos. Dados nossos aguardando publicação, sugerem abrandamento da dor, em que 47,4% de 19 pacientes (9/19) tratados continuamente com AA+PP afirmaram sentir dor na ausência de crises, e destes, apenas 5% (1/9) relataram dor severa, enquanto os demais experimentam dor leve ou moderada. Nesse mesmo grupo, 42,1% (8/19) não apresentavam surtos há mais de um ano da data da entrevista. Dez pacientes haviam experimentado um ou mais *flare-ups* nos 6 meses antecedentes à entrevista, nos quais edema e dor local apareceram em 80% dos casos, enquanto rubor e calor local em 20%. Dificuldades para dormir foram relatadas por três pacientes (15,8%) (Apêndice A).

Neste estudo, mostramos a superexpressão de *ADRB2* em CEB de portadores de FOP, que se mostra normalizada em resposta ao tratamento, simultânea à sub-regulação dos receptores de AngII e normalização de *TNF-α*. Isto, associado às inferências clínicas, sugere um papel adicional do bloqueio beta-adrenérgico no controle da dor e inflamação, bem como nos quadros de ansiedade que possam impactar negativamente o sono e a qualidade de vida.

Efeitos protetores semelhantes aos do eixo Ang(1-7)/MAS são atribuídos à interação do receptor MRGD com seu ligante alamandina, sobretudo nos sistemas cardiovascular e respiratório (Nehme et al., 2019). Interessante, evidências recentes mostram que a alamandina induz efeitos anti-inflamatórios – pela redução na liberação de IL-6 – e antiproliferativos em macrófagos humanos, mas, para isso, depende da heterodimerização de seu receptor MRGD com o receptor MAS (Mikusic et al., 2024).

Não obstante, há expressão predominante de MRGD em neurônios sensoriais de pequeno diâmetro que inervam as camadas externas da pele dos mamíferos e respondem à alteração de temperatura e a estímulos mecânicos (Lan et al., 2020), pelo que intensificar sua atividade pode estar associado a hiperalgesia. Lan et al. (2020) mostraram MRGD como regulador positivo da ativação canônica de NF-κB por meio da interação com TAK1 e o complexo IKK, em gânglios da raiz dorsal de camundongos, facilitando o desenvolvimento da hiperalgesia inflamatória desencadeada por LPS, e da dor inflamatória persistente. Nesse mesmo sítio, Yu et al. (2023) identificaram a expressão de ACVR1 e mostraram que o ACVR1 mutado (R206H) é necessário e suficiente para promover hiperexcitabilidade de neurônios sensoriais nociceptivos *in vitro*, contribuindo para a dor neuropática.

Corroborando nossos dados *in vitro* (Nascimento et al., 2021), o tratamento *in vivo* induziu a subexpressão de *MRGD* em CEB, que, associada à normalização de TNF-α, sugere,

em primeira instância, que efeitos benéficos sobre a dor crônica e evolução da OH (Palhares et al., 2019) possam decorrer da inibição *dowstream* de vias de sensação ou transdução da dor, de inflamação, e de proliferação celular, sinalizadas via MRGD (Lan et al., 2020; Nishimura et al., 2012). Contraponto, tendência à suprarregulação de *MRGD* foi observada no tecido leucocitário (sangue periférico), em relação ao grupo FOP sem tratamento. É um efeito que merece aprofundamento, no que poderia, supostamente, estar associado a efeitos protetores do eixo ECA2-Ang(1-7)-MAS (Mikusic et al., 2024).

Para elucidar o efeito do tratamento sobre a via MRGD, adicionamos às análises do sangue periférico, a investigação dos transcritos *NFKB1 (p50)* e *RELA (p65)*, visto que a inflamação crônica na FOP tem sido fortemente associada à ativação aumentada de NF-κB. Barruet et al. (2018) mostraram atividade prolongada de NF-κB em monócitos FOP estimulados por LPS, suficiente para mediar um estado de inflamação crônica. Em outro aspecto, a detecção de adiponectina e tenascina-C no plasma humano foram altamente correlacionadas com o genótipo da FOP. A saber, a expressão de tenascina-C é induzida pela sinalização BMP e Wnt e promove a síntese de citocinas pró-inflamatórias via NF-κB, ativada por TLR4 (Pignolo et al., 2022a). Entre outros achados, a suprarregulação de TCF4 e MMP12 no estado basal de linhagem imortalizada derivada de monócitos FOP sugeriu, mais uma vez, o envolvimento das vias Wnt/β-catenina e NF-κB/β-catenina, respectivamente (Maekawa et al., 2022).

Diferente do esperado, nossos resultados não incluem os transcritos para sinalização canônica de NF-κB no perfil fenotípico da FOP, quando analisados no sangue periférico. Mas, curiosamente, o tratamento com AA+PP não surtiu efeito sobre *RELA*, e induziu a suprarregulação de *NFKB1* em relação ao grupo FOP sem tratamento, sem diferença em relação ao grupo controle. Esses efeitos levantam questionamentos controversos. Por exemplo, Hiller et al. (2020) mostraram redução da atividade da via inflamatória NF-κB e via CREB em tecido biopsiado de tumor extraído de mama humana, mediante o tratamento com 80 mg/dia de propranolol, por sete dias antes da cirurgia.

Adicionalmente, a via NF-κB é também regulada e ativada pela AngII, via seus receptores. AT1R mostrou-se capaz de ativá-la pela fosforilação da subunidade p65 de NF-κB, induzindo a suprarregulação de MCP-1, IL-8, IL-6, TNF-α e IL-17, em cultivo de células mesangiais (Alique et al., 2015). Ademais, em condições específicas, a via NF-κB pode ser ativada por ambos os receptores AT1 e AT2, como demonstrado em diferentes linhagens celulares, de modelos experimentais (Ruiz-Ortega et al., 2000; Wolf et al., 2002).

Portanto, hipoteticamente, aqui, a modulação de *NFKB1(p65)* em relação ao grupo FOP sem tratamento poderia fracamente ser explicada pela sinalização dos receptores de AngII,

refletida na superexpressão de *AGTR1* (Alique et al., 2015; Ruiz-Ortega et al., 2000; Wolf et al., 2002), mas não por ativação da via MRGD (Lan et al., 2020). Mas reconhecemos ser uma relação de causa e efeito ainda incerta, uma vez que o efeito sobre *NFKB1* não é valorizado quando os três grupos são analisados entre si. Assim, sugerimos que AA+PP, nas doses preconizadas (FOPCON), não tenha efeito sobre a via MRGD/NF-κB, o que não diminui a importância dessa via no estudo da FOP.

É relevante, ainda, considerar o papel do SRA e das vias inflamatórias (TNF-α e NF-κB) no processo de osteogênese, mais especificamente, na ossificação heterotópica.

As várias evidências da expressão e atividade local do SRA no tecido ósseo, em geral, são associadas a contextos patológicos, em que redução da densidade mineral óssea (DMO), calcificação vascular, processos pró-fibróticos e pró-inflamatórios articulares são decorrentes do desequilíbrio entre os eixos clássico e alternativo. Experimentos *in vitro* e *in vivo* mostram potenciais efeitos deletérios da AngII sobre o metabolismo ósseo, de modo que a inibição do eixo ECA/AngII/AT1R evita ou reduz a perda óssea, enquanto a ativação de seu eixo contrarregulatório favorece, nesse contexto, a deposição óssea, contribuindo para o aumento da DMO no tratamento da osteoporose associada a doenças metabólicas/hormonais com hipertensão, diabetes e menopausa (Tamargo; Caballero; Delpón, 2015; Sha et al., 2021). Em outro aspecto, são demonstrados níveis aumentados de E*CA2, MAS, ECA, AT1R, AT2R e AGT* em aortas calcificadas. Em modelo animal, inibidores de AT1R ou tratamento com Ang(1-7) atenuaram a calcificação vascular (Li et al., 2016; Sui et al., 2013). Bloqueadores de receptores de AngII e inibidores de ECA mostraram-se eficazes na prevenção de artrofibrose após artroplastia total de joelho (Anzillotti et al., 2024).

O estudo do SRA na FOP e na OH ainda é incipiente. Até então, nossos resultados não atribuem ao SRA participação na fisiopatologia da FOP e/ou da OH, mas é possível que sua modulação terapêutica produza efeitos protetores, reguladores dos processos desordenados de inflamação e osteogênese.

Controladora da proliferação e morte celular na homeostase, TNF-α participa ativamente do metabolismo ósseo, sobretudo em condições patológicas. A saber, TNF-α reprime a função dos osteoblastos durante a diferenciação celular, ao mesmo tempo em que desencadeia a proliferação e diferenciação dos osteoclastos (Diolintzi; Pervin; Hsiao, 2024). Ademais, TNF-α inibe a expressão de RUNX2 em precursores de osteoblastos e bloqueia a expressão de marcadores osteoblastogênicos induzidos pela ativação de RUNX2. Entre outras vias, pode também inibir a formação de osteoblastos induzida por BMP, suprimindo a sinalização BMP/Smad pela ativação de JNK (Amarasekara; Kim; Rho, 2021).

Potencial reguladora inflamatória, a via de sinalização NF-κB, quando ativada por citocinas tais como TNF-α e RANKL, atua também na regulação das células ósseas (osteoblastos e osteoclastos), influenciando o remodelamento ósseo fisiológico e/ou patológico, com efeitos positivos ou negativos, a depender da via estimulada e do estágio de diferenciação celular (Boyce et al., 2023; Liu et al., 2024). Estudos experimentais sugerem que a ativação canônica de NF-κB em osteoprogenitores prejudica a maturação de osteoblastos e condrócitos, enquanto a inibição da via em osteoblastos maduros, otimiza suas funções. Há também evidências de que essa via está diretamente envolvida na regulação da expressão de proteínas da matriz óssea, mediando a transcrição de osteocalcina ou de sialoproteína óssea, via estimulação de RUNX2 e β-catenina (Boyce et al., 2023).

Na OH endocondral, essa via, sinalizada nos macrófagos, dirige o estágio inflamatório inicial da ossificação, associado à expressão de outros genes pró-inflamatórios, como SIRT1, AMPK e NLRP3. Na sequência, a via NF-κB interage com outras vias e fatores de crescimento, na mediação da diferenciação de CPM em condrócitos, e destes em células ósseas. Também presentes na osteogênese fisiológica, são eventos altamente complexos e coordenados, que quando temporal e espacialmente desorganizados, culminam na formação de tecido ósseo ectópico. Contraponto, evidências de que a ativação de NF-κB/p65 pode inibir o desenvolvimento de condrócitos pela regulação de SOX9 e Rspo2, exigem discussão posterior e mais aprofundada (Liu et al., 2024).

Neste trabalho, confirmamos a superexpressão de *TNF-α* em CEB de indivíduos com FOP, que foi normalizada (ou subregulada) pelo uso contínuo de FOPCON. Simultaneamente, mostramos a normalização da tendência à suprarregulação de *RUNX2*, interpretada como favorável à inibição da OH, por tratar-se de um dos principais marcadores de osteogênese. Entretanto, não foi possível relacionar causa e efeito entre TNF-α e RUNX2 como referido por alguns pesquisadores (Amarasekara; Kim; Rho, 2021), provavelmente pelas diferenças metodológicas, inclusive por não considerarmos as condições individuais de estado inflamatório (*flare-up,* ossificação ou quiescência) dos participantes. Embora não significativa, é notável a redução na variabilidade (ou no erro padrão da média) de expressão de *RUNX2* no grupo tratado com FOPCON, comparado ao grupo FOP sem tratamento.

Em outro aspecto, Fernandes et al. (2017) mostrou por PCR em experimento *in vitro* a alteração nos níveis de *RUNX2* em resposta ao AA, de maneira concentração-dependente. Baixas doses de AA (62,5-125 μM) elevaram o nível de *RUNX2* em células G292, enquanto doses elevadas (1000 μM) surtiram o efeito contrário, sugerindo que altas doses de AA podem inibir a maturação terminal de osteoblastos. Semelhantemente, Ferrazo et al. (2019)

demonstraram redução na diferenciação osteogênica induzida por BMP-2 em células precursoras musculares, pela redução na atividade de fosfatase alcalina (ALP) mediante altas doses de AA (100μM). Os autores atribuem esse efeito ao aumento na produção de superóxido, pressupondo que efeitos antioxidantes do AA obtidos mediante doses fisiológicas favorecem a diferenciação osteogênica, enquanto efeitos pró-oxidantes decorrentes de doses elevadas/farmacológicas bloqueiam esse processo.

Resultados interessantes são apresentados por Nascimento et al. (2021), quando o tratamento *in vitro* com 2,0 mM de AA isolado, ou combinado com 15 μM de PP, induziu a suprarregulação de *TNF-α* e normalizou a expressão de *RUNX2* em PBMC de amostras FOP, apesar da superexpressão de *ALP* (em resposta ao tratamento com AA). Aqui, surpreendentemente, no sangue (LT) o tratamento induziu a suprarregulação de *RUNX2*, acompanhado de tendência a suprarregulação de *TNF-α*, comparado com grupo controle, sem alteração na expressão de *NFKB1*, mas com tendência a sub-regulação de *RELA*. Em relação ao estado basal da FOP, a suprarregulação tendenciosa de *RUNX2* é independente de modulação de *TNF- α*, mas é acompanhada por sutil suprarregulação de *NFKB1*. Os dados divergem da expectativa baseada na literatura, conquanto a discussão, conforme conhecido, seja baseada em contextos experimentais diferentes em vários aspectos. De outro modo, os efeitos do tratamento sobre os genes alvos *TNF-α*, *RUNX2*, *NFKB1* e *RELA* não são valorizados quando os três grupos são analisados entre si (ANOVA 1 via ou Kruskal-Wallis).

Sendo assim, não dispomos, ainda, de dados suficientes para esclarecer, no nível circulatório, a relação entre TNF-α e RUNX2, bem como a modulação da via canônica NF-κB, seja como moduladores da inflamação, ou da osteogênese, em resposta ao AA+PP. E ressaltamos que, embora sejam protagonistas em variadas doenças de ordem inflamatória, TNF-α, RUNX2 e NF-κB são essenciais para diversas funções celulares fisiológicas, pelo que a inibição de suas atividades deve ser preconizada com cautela.

Importa considerar em discussões futuras o papel do sistema nervoso autônomo simpático no metabolismo ósseo, para entender se o bloqueio beta-adrenérgico não-seletivo nas doses preconizadas no composto pesquisado, é suficiente para impactar a osteogênese no processo de OH, ainda que independente de sua ação sobre o SRA (Eimar et al., 2013; Mito et al., 2017).

Em último caso, recomendamos estudos adicionais para esclarecer o benefício da ativação do receptor MRGD, por seus efeitos inibitórios sobre vias não exploradas neste trabalho, por exemplo, PI3K/AKT/mTOR, conhecida por regular processos de proliferação, migração e invasão celular, e, ultimamente, associada à ossificação heterotópica na FOP

(Hassani; Attar; Firouzabadi, 2023; Hino et al., 2017; Hu; Wang, 2021). Nesse sentido, tendo em vista que a alamandina é um endógeno circulante que pode ser gerado diretamente de Ang(1-7), a partir da descarboxilação do resíduo amino-terminal (N-terminal) aspartato em alanina, mais uma vez sugerimos a investigação quanto à adição de peptídeos anti-inflamatórios ao tratamento, pelo seu possível efeito na ativação subsequente do receptor MRGD, por aumento na disponibilidade de seu ligante (Hassani; Attar; Firouzabadi, 2023).

Não menos importante, o grupo tratado com AA+PP foi composto por indivíduos que participaram de estudos anteriores (Palhares et al., 2018), e, por isso, mantinham-se beneficiados pela continuidade do tratamento, em caráter *off label* (Brasil, 2013). Metodologicamente, para o trabalho atual, foi-lhes solicitada a interrupção de qualquer medicação prévia utilizada para o controle da FOP, por cinco dias, a fim de caracterizar *wash-out* medicamentoso. Considerando o princípio ético da não-maleficência, ressaltamos que apesar da previsibilidade de não se alcançar o efeito *wash-out* em tão curto período, entendemos que propor a suspensão da medicação por tempo maior poderia expor os pacientes à exacerbação da doença.

De fato, mesmo que seja possível assumir a regulação gênica do SRA pelo uso contínuo de AA+PP, no presente trabalho, o retorno à superexpressão do receptor β-adrenérgico (ADRB2) observada em CEB, em resposta à interrupção da medicação, não foi acompanhado pelo mesmo efeito nos genes do SRA. Isto é, com exceção do gene *AGTR2*, não houve diferença na expressão gênica relativa dos genes alvos do SRA entre grupo tratado e "*wash-out*". Assim também ocorreu para o *TNF-α*, que se manteve subregulado em relação ao grupo FOP, embora com tendência a suprarregulação em relação ao grupo controle. Possivelmente, o período da descontinuação não foi suficiente para exaurir as concentrações plasmáticas ou teciduais de FOPCON, o que, apesar de em verdade não caracterizar o fenômeno *wash-out*, sugere seu efeito protetor mesmo durante interrupções não prolongadas do composto. Sabe-se que a vitamina C é distribuída de maneira bastante variável no corpo, sendo possível que suas concentrações teciduais sejam muito mais elevadas que a plasmática (Zuo et al., 2023). Conjecturamos que a vida média do AA de aproximadamente seis horas – além da ingestão diária alimentar variável –, mais a vida média de aproximadamente três a seis horas do PP (Lee, 2019; Srinivasan, 2019), quando administrados em três doses diárias, provoquem um efeito residual, que favorece a demora de readaptação molecular tecidual verificada, aqui, nas células epiteliais da mucosa oral.

Os dados obtidos, portanto, demonstram o controle de curto prazo das respostas β-adrenérgicas típicas do sistema reflexo simpático, diante de alterações nas concentrações

plasmáticas de PP, contrapondo a regulação endócrina de médio e longo prazo característica ao SRA, e supostamente decorrente de efeitos epigenéticos do AA, favorecendo a perpetuação dos efeitos intracelulares obtidos durante o tratamento, mesmo mediante sua breve interrupção.

É ainda relevante observar que, independentemente da regulação provocada ou da significância estatística, o uso contínuo do composto AA+PP reduziu, para a maioria dos genes alvos estudados, a variabilidade da expressão gênica identificada nos grupos não tratados (controle e FOP). Tal variabilidade pode ser explicada, em parte, por hábitos alimentares e cotidianos (dificilmente controlados pelo pesquisador) capazes de desequilibrar os processos dependentes de radicais livres, mesmo nos indivíduos "não-doentes", de modo que a produção excessiva de ERO pode determinar modificações estruturais de proteínas celulares, levando a disfunção celular e enzimática, favorecendo aberrações na expressão gênica (Sharifi-Rad et al., 2020). Assim, sugerimos, com base nos resultados, uma estabilidade de expressão gênica conferida pelo ácido ascórbico associado ao propranolol, cuja relevância terapêutica merece seguimento na investigação.

Por fim, é imperativo realizar análises adicionais incluindo a dosagem das angiotensinas, a fim de melhor compreender os efeitos de modulação gênica na expressão de seus receptores, no que diz respeito à real inibição e/ou ativação destes e das vias de sinalização correspondentes. Ainda assim, reiteramos que as modulações gênicas de componentes do SRA aqui demonstradas não decorrem do contexto patológico, mas de efeitos moleculares em resposta a um tratamento contínuo, que, associados às inferências clínicas dos pesquisadores, induzem a interpretá-los como potencializadores dos benefícios terapêuticos de FOPCON (AA+PP). Se esses efeitos funcionam como um "tampão bioquímico", pelas propriedades de oligomerização inerentes aos GPCRs, em que a modulação de um gene implica na modulação de outro(s) da mesma família, na busca de um mesmo objetivo, devem ser mais bem explorados (Mikusic et al., 2024).

Esse achado, associado à estabilidade de sinais vitais (frequência cardíaca e pressão arterial), e ausência de efeitos colaterais, permite seguir no entendimento de que AA+pp (FOPCON) é um composto farmacêutico seguro para uso contínuo no controle da dor e inflamação, pelo que incentivamos a continuidade dos estudos laboratoriais, associado a criterioso acompanhamento clínico por meio de estudo longitudinal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Mostramos pela primeira vez na FOP a expressão e a modulação de genes pró e anti fibróticos/inflamatórios, componentes do SRA em células epiteliais da boca e leucócitos totais do sangue periférico. Confirmamos, ainda, a viabilidade de coleta de espécime tecidual representativo de condições *in vivo*, de forma minimamente invasiva e indolor, para fins de pesquisa e acompanhamento no nível molecular, de qualquer tratamento ou ensaio clínico.

Corroboramos dados anteriores de que os genes do SRA avaliados não configuram perfil fenotípico da doença. Outrossim, mostramos a modulação branda desses genes pelo uso contínuo de AA+PP. Mostramos a existência de inter-relação funcional entre receptores beta-adrenérgicos e receptores de AngII, o que não exclui a possibilidade de potencial modulação gênica epigenética do ácido ascórbico sobre esses e demais componentes do SRA, visto que a breve interrupção da medicação explicita o desbloqueio simpático, sem alterar os níveis de expressão de genes do SRA.

Não pudemos, aqui, relacionar os benefícios clinicamente inferidos do uso contínuo de AA+PP com a modulação de vias angiogênicas (VEGF) ou potencialmente inflamatórias (NFκ-B). São vias, sem dúvida, fundamentais na fisiopatologia da doença, cujas modulações merecem investigação adicional e interpretação criteriosa no que podem estar associadas ao necessário equilíbrio entre inibir o remodelamento ósseo e vascular patológicos na FOP, sem prejudicá-los nos processos fisiológicos. Recomendamos que essas e outras vias de sinalização de dor e osteogênese ainda sejam estudadas no tecido epitelial (CEB), a fim de esclarecer o potencial terapêutico da adição de peptídeos anti-inflamatórios ao tratamento, pela ativação dos receptores MAS e MRGD. Além disso, parece razoável investir no aprimoramento da estrutura molecular do composto AA+PP, a fim de otimizar seus efeitos sem alterar as doses ingeridas.

Limitações a serem pontuadas referem-se à ultra raridade da doença e à escassez de estudos semelhantes ao nosso disponíveis na literatura. O estudo abrangeu uma população amostral pequena, heterogênea em idade e gênero, fatores que podem ter introduzido alguma variabilidade nas análises, conquanto não tenha sido identificada diferença estatisticamente significativa entre os grupos FOP e controle em relação a essas variáveis. O pequeno tamanho amostral também pode ter implicado na ausência de significância estatística para alguns resultados notavelmente tendenciosos.

Ademais, baseamos a discussão em estudos metodologicamente diferentes, especialmente em relação aos espécimes analisados. Também apresentamos aqui dois modelos de estudo com importantes diferenças fisiológicas. Vilas-Boas et al. (2008) afirmam: “amostras

de sangue periférico geralmente representam a expressão cumulativa do SRA em múltiplos tecidos e pode não refletir de forma confiável a atividade molecular na circulação visceral" (tradução nossa). Nesse sentido, recomendamos fortemente a continuidade dos estudos biomoleculares, acrescidos pela caracterização celular (citometria de fluxo) dos espécimes aqui utilizados. Leucócitos totais do sangue periférico são compostos por uma população celular heterogênea, cuja proporção de células que estariam relacionadas ao fenótipo pesquisado permanece desconhecida. Enquanto isso, células epiteliais ou escamosas da boca refletem um tecido homogêneo, cujos resultados podem ser mais conclusivos, a depender do fenômeno investigado. São aspectos que devem ser ainda aprofundados em discussão, considerando, inclusive, as diferenças de sinalização e conversão dos precursores do SRA sofridos na circulação arteriovenosa pulmonar, antes de alcançarem a circulação e tecidos periféricos, para melhor interpretação dos resultados aqui apresentados.

Por fim, não obstante as lacunas existentes, nossos resultados, somados às inferências clínicas dos pesquisadores e à discussão apresentada, sustentam o sinergismo farmacológico e viabilidade terapêutica de AA+PP (FOPCON). Incentivamos a continuidade dos estudos (pré-clínicos e clínicos), visando ao esclarecimento de como a equalização genômica funcional do SRA poderá amenizar os efeitos deletérios da sinalização desregulada de vias pró-inflamatórias e pró-osteogênicas, por meio de "ajustes finos", dentro de uma ampla e complexa rede de mecanismos biomoleculares.

REFERÊNCIAS

AGARWAL, S. et al. BMP signaling mediated by constitutively active Activin type 1 receptor (ACVR1) results in ectopic bone formation localized to distal extremity joints. **Developmental Biology**, v. 400, n. 2, p. 202–209, Apr. 2015. doi: 10.1016/j.ydbio.2015.02.011.

AGARWAL, S. et al. Inhibition of Hif1α prevents both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 113, n. 3, p. E338–E347, Jan. 2016. doi: 10.1073/pnas.1515397113

ALESSI WOLKEN, D. M. et al. The obligatory role of Activin A in the formation of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Bone**, v. 109, p. 210–217, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.06.011

AL-KURAISHY, H. M. et al. Effects of β-blockers on the sympathetic and cytokines storms in Covid-19. **Frontier in Immunology,** v. 12, Nov. 2021. doi: 10.3389/fimmu.2021.749291

ALIQUE, M. et al. Angiotensin II, via angiotensin receptor type 1/nuclear factor-κB activation, causes a synergistic effect on interleukin-1-β-induced inflammatory responses in cultured mesangial cells. **Journal of the Renin-Angiotensin-Aldosterone System**, v. 16, n. 1, p. 23–32, Mar. 2015. doi: 10.1177/1470320314551564

ALVES M. G. et al. Comparison of RNA extraction methods for molecular analysis of oral cytology. **Acta Stomatologica Croatica**, v. 50, n. 2, p. 108–115, June 2016. doi: 10.15644/asc50/2/2

AMARASEKARA, D. S.; KIM, S.; RHO, J. Regulation of osteoblast differentiation by cytokine networks. **International Journal of Molecular Sciences,** v. 22, n. 6, p. 2851, Mar. 2021. doi: 10.3390/ijms22062851

ANZILLOTTI, G. et al. Limited evidence for the usage of renin-angiotensin-aldosterone pathway blockers to prevent arthrofibrosis after total knee arthroplasty. A systematic review of clinical evidence. **Journal of Experimental Orthopaedics,** v. 11, n. 4, p. e70089, Dec. 2024. doi: 10.1002/jeo2.70089

ARCONDEGUY, T. et al. VEGF-A mRNA processing, stability and translation: a paradigm for intricate regulation of gene expression at the post-transcriptional level. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 17, p. 7997–8010, Sept. 2013. doi: 10.1093/nar/gkt539

AZIMI-NEZHAD, M. et al. Influence of pre-analytical variables on vegf gene expression and circulating protein concentrations. **Biopreservation and Biobanking**, v. 10, n. 5, p. 454–461, Oct. 2012. doi: 10.1089/bio.2012.0016

BADER, M. ACE2, angiotensin-(1-7), and Mas: The other side of the coin. **Pflügers Archiv: European Journal of Physiology**, v. 465, n. 1, p. 79–85, Jan. 2013. doi: 10.1007/s00424-012-1120-0

BALOGH, M. et al. Angiotensin receptors and neuropathic pain. **Pain Reports**, v. 6, n. 1, p. E869, Mar. 2021. doi: 10.1097/PR9.0000000000000869

BARKI-HARRINGTON, L.; LUTTRELL, L. M.; ROCKMAN, H. A. Dual inhibition of β-adrenergic and angiotensin ii receptors by a single antagonist. **Circulation**, v. 108, n. 13, p. 1611–1618, Sept. 2003. doi: 10.1161/01.CIR.0000092166.30360.78

BARRUET, E. et al. NF-κB/MAPK activation underlies ACVR1-mediated inflammation in human heterotopic ossification. **JCI insight**, v. 3, n. 22, Nov. 2018. doi: 10.1172/jci.insight.122958

BAUER, A. H. et al. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: a current review of imaging findings. **Skeletal Radiology**, v. 47, n. 8, p. 1043–1050, Aug. 2018. doi: 10.1007/s00256-018-2889-5

BAYAR, A. et al. The effects of the angiotensin converting enzyme inhibitor Enalapril and the angiotensin II type 1 receptor blocker losartan on fracture healing in rats. **Clinical and Investigative Medicine**, v. 38, n. 4, p. E164–E172, Aug 2015. doi: 10.25011/cim.v38i4.24261

BEN SHOHAM, A. et al. Deposition of collagen type I onto skeletal endothelium reveals a new role for blood vessels in regulating bone morphology. **Development**, v. 143, n. 21, p. 3933–3943, Nov. 2016. doi: 10.1242/dev.139253

BOYCE, B. F. et al. Nuclear Factor-Kappa B Regulation of Osteoclastogenesis and Osteoblastogenesis. **Endocrinology and Metabolism**, v. 38, n. 5, p. 504–521, Oct. 2023. doi: 10.3803/EnM.2023.501

BRASIL. Conselho Federal de Medicina. **Despacho SEJUR nº 482/2013.** O uso de material/medicamento OFF LABEL não pode ser tratado de forma ampla e geral, devendo ser analisado casuisticamente. 19 de novembro de 2013. Disponível em: https://sistemas.cfm.org.br/normas/arquivos/despachos/BR/2013/482_2013.pdf. Acesso em: jan. 2025.

BURCU, M. et al. A framework for extension studies using real-world data to examine long-term safety and effectiveness. **Therapeutic Innovation & Regulatory Science,** v. 56, n. 1, p. 15-22, Jan. 2022. doi: 10.1007/s43441-021-00322-8

CANTERO-NAVARRO, E. et al. Renin-angiotensin system and inflammation update. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 529, June 2021. doi: 10.1016/j.mce.2021.111254

CAVANAUGH, D. J. et al. Distinct subsets of unmyelinated primary sensory fibers mediate behavioral responses to noxious thermal and mechanical stimuli. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 22, p. 9075–9080, June 2009. doi: 10.1073/pnas.0901507106

CHAKKALAKAL, S. A. et al. Palovarotene inhibits heterotopic ossification and the human ACVR1R206H Fibrodysplasia Ossificans maintains limb mobility and growth in mice with progressiva (FOP) mutation. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 9, p. 1666–1675, Sept. 2016. doi: 10.1002/jbmr.2820

CHAURASIA, A.; MISHRA, V.; KATHERIYA, G. Munchmeyer's disease - a case report. **Journal of Oral Medicine, Oral Surgery, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 2, n. 3, p. 141, 2016. doi:10.5958/2395-6194.2016.00034.5

CHOLOK, D. et al. Heterotopic ossification and the elucidation of pathologic differentiation. **Bone**, v. 109, p. 12–21, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.09.019

CLORIDRATO DE PROPRANOLOL [bula]: comprimidos. Responsável técnico Clarice Mitie Sano Yui. Campinas: Medley, 2008. Bula de remédio (2 p.). Disponível em: https://www.saudedireta.com.br/catinc/drugs/bulas/cloridratodepropranololmedley.pdf. Acesso em: jan. 2025.

COCKS, M. et al. Vascular patterning in human heterotopic ossification. **Human Pathology**, v. 63, p. 165–170, May 2017. doi: 10.1016/j.humpath.2017.03.005

COHEN, R. B. et al. The natural history of heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. A study of forty-four patients. **The Journal of Bone & Joint Surgery**, v. 75, n. 2, p. 215–219, Feb. 1993. doi: 10.2106/00004623-199302000-00008

COLMENARES-BONILLA, D.; GONZALEZ-SEGOVIANO, A. Bone resection osteotomy in fibrodysplasia ossificans progressiva. **Journal of Orthopaedic Case Reports**, v. 8, n. 1, p. 39–43, Jan.-Feb. 2018. doi: 10.13107/jocr.2250-0685.990
CONVENTE, M. R. et al. The immunological contribution to heterotopic ossification disorders. **Current Osteoporosis Reports**, v. 13, n. 2, p. 116–124, 17 Apr. 2015. doi: 10.1007/s11914-015-0258-z

CRASTO J. A. et al. Comparative analysis of photograph-based clinical goniometry to standard techniques. **Hand (NY)**. v. 10, n. 2, p. 248-253, June 2015. doi: 10.1007/s11552-014-9702-2

DE ARAÚJO, L. J. T. et al. Participation of hepatic α/β-adrenoceptors and AT1 receptors in glucose release and portal hypertensive response induced by adrenaline or angiotensin II. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 51, n. 12, p. 10–13, Nov. 2018. doi: 10.1590/1414-431X20187526

DE BRASI, D. et al. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: a challenging diagnosis. **Genes**, v. 12, n. 8, Aug. 2021. doi: 10.3390/genes12081187

DE GORTER, D. J.; JANKIPERSADSING, V.; TEN DIJKE, P. Deregulated bone morphogenetic protein receptor signaling underlies Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Current Pharmaceutical Design**, v. 18, n. 27, p. 4087–4092, 2012. doi: 10.2174/138161212802430495

DE RUITER, R. D. et al. TGF-beta induces Activin A production in dermal fibroblasts derived from patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 3, p. 2299, Jan. 2023. doi: 10.3390/ijms24032299

DEL ZOTTO, G. et al. Peripheral blood mononuclear cell immunophenotyping in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva patients: evidence for monocyte DNAM1 up-regulation. **Cytometry. Part B, Clinical Cytometry,** v. 94, n. 4, p. 613-622, July 2018. doi: 10.1002/cyto.b.21594

DIAO, T. Y. et al. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor, captopril, on bone of mice with streptozotocin-induced type 1 diabetes. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 32, n. 3, p. 261–270, May 2014. doi: 10.1007/s00774-013-0500-7

DIOLINTZI, A.; PERVIN, M. S.; HSIAO, E. C. Immunologic Aspects in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Biomolecules**, v. 14, n. 3, Mar. 2024. doi: 10.3390/biom14030357

DORNHOFFER, J. R. et al. The expression of renin-angiotensin-aldosterone axis components in infantile hemangioma tissue and the impact of propranolol treatment. **Pediatric Research**, v. 82, n. 1, p. 155–163, July 2017. doi: 10.1038/pr.2017.93

DUFOUR, M.; PILLU, M. **Biomecânica funcional: cabeça, tronco, membros.** 1. ed. Barueri: Manole, 2016. 568 p.

EIMAR, H. et al. Cholinergic regulation of bone. **Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions**, v. 13, n. 2, p. 124-132, June 2013. Disponível em: https://www.ismni.org/jmni/pdf/52/01EIMAR.pdf. Acesso em: fev. 2025.

ESLAMI, M. et al. Oral ascorbic acid in combination with beta-blockers is more effective than beta-blockers alone in the prevention of atrial fibrillation after coronary artery bypass grafting. **Texas Heart Institute Journal**, v. 34, n. 3, p. 268–74, 2007. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC1995047/. Acesso em julho de 2023.

FEATHERSTON, T. et al. Cancer stem cells in moderately differentiated buccal mucosal squamous cell carcinoma express components of the Renin–Angiotensin System. **Frontiers in Surgery**, v. 3, Sept. 2016. doi: 10.3389/fsurg.2016.00052

FERNANDES, G.; BARONE, A. W.; DZIAK, R. The effect of ascorbic acid on bone cancer cells in vitro. **Cogent Biology**, v. 3, n. 1, Feb. 2017. doi: 10.1080/23312025.2017.1288335

FERNANDEZ-PINEDA, I. et al. Cardiovascular drugs in the treatment of infantile hemangioma. **World Journal of Cardiology**, v. 8, n. 1, p. 74, Jan. 2016. doi: 10.4330/wjc.v8.i1.74

FERRAZZO, P. C. et al. Acid ascorbic diminishes bone morphogenetic protein 2-induced osteogenic differentiation of muscle precursors cells. **Muscle & Nerve,** v. 5, n. 4, p. 501-508, Apr. 2019. doi: 10.1002/mus.26415

FIORI, J. L. et al. Dysregulation of the BMP-p38 MAPK signaling pathway in cells from patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP). **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 21, n. 6, p. 902–909, June 2006. doi: 10.1359/jbmr.060215

FRANKLIN, S. S. et al. White-coat hypertension new insights from recent studies. **Hypertension**, v. 62, n. 6, p. 982–987, Dec. 2013. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.113.01275

FREKE J. A letter from Mr. John Freke, F. R. S. Surgeon to St. Bartholomew's Hospital to the Royal Society, relating a case of extraordinary exostoses on the back of boy. **Philosophical Transactions of the Royal Society of London**, v. 41, n. 456, p. 369–370, Dec. 1740. doi: 10.1098/rstl.1739.0066

FUJIMOTO, M.; SUDA, N.; KATAGIRI, T. Molecular mechanisms for activation of mutant activin receptor-like kinase 2 in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Journal of Oral Biosciences**, v. 59, n. 3, p. 121–126, Aug. 2017. doi: 10.1016/j.job.2017.03.004

FUKUDA, T. et al. Constitutively activated ALK2 and increased SMAD1/5 cooperatively induce bone morphogenetic protein signaling in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 11, p. 7149–7156, Mar. 2009. doi: 10.1074/jbc.M801681200

GANNON, F. H. et al. Bone morphogenetic protein 2/4 in early fibromatous lesions of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Human Pathology**, v. 28, n. 3, p. 339–343, Mar. 1997. doi: 10.1016/s0046-8177(97)90133-7

GANNON, F. H. et al. Mast cell involvement in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Human Pathology**, v. 32, n. 8, p. 842–848, Aug. 2001. doi: 10.1053/hupa.2001.26464

GARCIA, P. et al. Inhibition of angiotensin-converting enzyme stimulates fracture healing and periosteal callus formation - role of a local Renin-Angiotensin System. **British Journal of Pharmacology**, v. 159, n. 8, p. 1672–1680, Apr. 2010. doi: 10.1111/j.1476-5381.2010.00651.x

GONZALEZ, J. P. et al. Influence of vitamin C on the absorption and first pass metabolism of propranolol. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 48, n. 3–4, p. 295–297, 1995. doi: 10.1007/BF00198315

HAN, H. J.; JAIN, P.; RESNICK, A. C. Shared ACVR1 mutations in FOP and DIPG: opportunities and challenges in extending biological and clinical implications across rare diseases. **Bone**, v. 109, p. 91–100, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.08.001

HASSANI, B.; ATTAR, Z.; FIROUZABADI, N. The renin-angiotensin-aldosterone system (RAAS) signaling pathways and cancer: foes versus allies. **Cancer Cell International**, v. 23, n. 1, p. 254, 27 Oct. 2023. doi: 10.1186/s12935-023-03080-9

HATSELL, S. J. et al. ACVR1R206H receptor mutation causes Fibrodysplasia Ossificans Progressiva by imparting responsiveness to Activin A. **Science Translational Medicine**, v. 7, n. 303, p. 1–11, Sept. 2015. doi: 10.1126/scitranslmed.aac4358
HAUPT, J.; XU, M.; SHORE, E. M. Variable signaling activity by FOP ACVR1 mutations. **Bone**, v. 109, p. 232–240, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.10.027

HAVIV, R. et al. Is Fibrodysplasia Ossificans Progressiva an interleukin-1 driven auto-inflammatory syndrome? **Pediatric Rheumatology**, v. 17, n. S1, p. 18, May 2019. doi: 10.1186/s12969-019-0386-6

HILDEBRAND, L. et al. Trace element and cytokine concentrations in patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): a case control study. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 39, p. 186–192, Jan. 2017. doi: 10.1016/j.jtemb.2016.10.001

HILLER, J. G. et al. Preoperative β-blockade with propranolol reduces biomarkers of metastasis in breast cancer: a phase II randomized trial. **Clinical Cancer Research**, v. 26, n. 8, p. 1803–1811, 15 Apr. 2020. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-19-2641

HINO, K. et al. Neofunction of ACVR1 in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 50, p. 15438–15443, Dec. 2015. doi: 10.1073/pnas.1510540112

HINO, K. et al. Activin-A enhances mTOR signaling to promote aberrant chondrogenesis in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Journal of Clinical Investigation**, v. 127, n. 9, p. 3339–3352, Sept. 2017. doi: 10.1172/JCI93521

HOLAPPA, M.; VAPAATALO, H.; VAAJANEN, A. Many faces of Renin-angiotensin System - focus on eye. **The Open Ophthalmology Journal**, v. 11, n. 1, p. 122–142, June 2017. doi: 10.2174/1874364101711010122

HSIEH, H. H. S. et al. Evaluation of salivary cytokines for diagnosis of both trauma-induced and genetic heterotopic ossification. **Frontiers in Endocrinology**, v. 8, n. 74, Apr. 2017. doi: 10.3389/fendo.2017.00074

HU, Y.; WANG, Z. Rapamycin prevents heterotopic ossification by inhibiting the mTOR pathway and oxidative stress. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 573, p. 171–178, Oct. 2021. doi: 10.1016/j.bbrc.2021.07.060

HUANG, J. et al. Palovarotene can attenuate heterotopic ossification induced by tendon stem cells by downregulating the synergistic effects of SMAD and NF-κB signaling pathway following stimulation of the inflammatory microenvironment. **Stem Cells International**, v. 2022, Apr. 2022. doi: 10.1155/2022/1560943

ITINTEANG, T. et al. Expression of components of the renin-angiotensin system in proliferating infantile haemangioma may account for the propranolol-induced accelerated involution. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 64, n. 6, p. 759–765, June 2011. doi: 10.1016/j.bjps.2010.08.039

ITINTEANG, T. et al. Cancer stem cells in moderately differentiated oral tongue squamous cell carcinoma express components of the renin–angiotensin system. **Journal of Clinical Pathology**, v. 69, n. 10, p. 942, Oct. 2016. doi: 10.1136/jclinpath-2016-203736

JI, Y. et al. Intolerable side effects during propranolol therapy for infantile hemangioma: frequency, risk factors and management. **Scientific Reports,** v. 8, p. 4264, Mar. 2018. doi: 10.1038/s41598-018-22787-8

JIANG, M. et al. Anti-inflammatory effects of Ang-(1–7) via TLR4-mediated inhibition of the JNK/FoxO1 pathway in lipopolysaccharide-stimulated RAW264.7 cells. **Developmental and Comparative Immunology**, v. 92, n. November 2018, p. 291–298, Mar. 2019. doi: 10.1016/j.dci.2018.11.009

JOSHI, S. et al. Hypoxic regulation of angiotensin-converting enzyme 2 and Mas receptor in human CD34 $^{+}$ cells. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 11, p. 20420–20431, Nov. 2019. doi: 10.1002/jcp.28643

KALONIA, A. et al. Ascorbate formulation improves healing efficacy in excisional wound mice model through interplay between pro and anti-inflammatory cytokines and angiogenic markers. **Cytokine,** v. 164, p. 156158, Apr. 2023. doi: 10.1016/j.cyto.2023.156158

KAN, L. et al. CNS demyelination in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 12, p. 2644–2655, Dec. 2012. doi: 10.1007/s00415-012-6563-x

KAPLAN, F. S. et al. Dysregulation of the BMP-4 signaling pathway in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1068, n. 1, p. 54–65, Apr. 2006. doi: 10.1196/annals.1346.008

KAPLAN, F. S. et al. Acute and chronic rapamycin use in patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: a report of two cases. **Bone**, v. 109, p. 281–284, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.12.011

KAPLAN F.S. et al. The medical management of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: current treatment considerations. **Proceedings International Clinical Council on FOP**, v. 1, p. 1-111, June 2019. Disponível em: https://fopaustralia.org/wp-content/uploads/2019/06/FOP_TREATMENT_GUIDELINES_June_2019.pdf. Acesso em: agosto de 2022.

KAPLAN, F. S. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP): A disorder of osteochondrogenesis. **Bone,** v. 140, Nov. 2020. doi: 10.1016/j.bone.2020.115539

KAPLAN, F. S.; AL MUKADDAM, M.; PIGNOLO, R. J. A cumulative analogue joint involvement scale (CAJIS) for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Bone**, v. 101, p. 123–128, Aug. 2017. doi: 10.1016/j.bone.2017.04.015

KAPLAN, F. S.; AL MUKADDAM, M.; PIGNOLO, R. J. Longitudinal patient-reported mobility assessment in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Bone,** v. 109, p. 158-161, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.06.005

KAPLAN, F. S.; CHAKKALAKAL, S. A.; SHORE, E. M. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: mechanisms and models of skeletal metamorphosis. **Disease Models & Mechanisms**, v. 5, n. 6, p. 756–762, Nov. 2012. doi: 10.1242/dmm.010280

KAPLAN, F. S.; GROPPE, J.; SHORE, E. M. When one skeleton is enough: approaches and strategies for the treatment of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP). **Drug Discovery Today: Therapeutic Strategies**, v. 5, n. 4, p. 255–262, 2008. doi: 10.1016/j.ddstr.2008.11.004

KAPLAN, F. S.; PIGNOLO, R. J.; SHORE, E. M. The FOP metamorphogene encodes a novel type I receptor that dysregulates BMP signaling. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 20, n. 5–6, p. 399–407, Oct.-Dec. 2009. doi: 10.1016/j.cytogfr.2009.10.006

KAPLAN, J.; KAPLAN, F. S.; SHORE, E. M. Restoration of normal BMP signaling levels and osteogenic differentiation in FOP mesenchymal progenitor cells by mutant allele-specific targeting. **Gene Therapy**, v. 19, n. 7, p. 786–790, July 2012. doi: 10.1038/gt.2011.152

KATAGIRI, T.; TSUKAMOTO, S.; KURATANI, M. Heterotopic bone induction via BMP signaling: Potential therapeutic targets for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Bone**, v. 109, p. 241–250, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.07.024

KATAGIRI, T.; WATABE, T. Bone Morphogenetic Proteins. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 8, n. 6, p. a021899, June 2016. doi: 10.1101/cshperspect.a021899

KAWAO, N. et al. Role of osteoclasts in heterotopic ossification enhanced by Fibrodysplasia Ossificans Progressiva-related activin-like kinase 2 mutation in mice. **Journal of Bone and Mineral Metabolism**, v. 34, n. 5, p. 517–525, Sept. 2016. doi: 10.1007/s00774-015-0701-3

KHAKOO, A. Y. et al. Does the renin-angiotensin system participate in regulation of human vasculogenesis and angiogenesis? **Cancer Research**, v. 68, n. 22, p. 9112–9115, Nov. 2008. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-08-0851

KITTERMAN, J. A. et al. Neurological symptoms in individuals with fibrodysplasia ossificans progressiva. **Journal of Neurology**, v. 259, n. 12, p. 2636–2643, Dec. 2012. doi: 10.1007/s00415-012-6562-y

LAN, L. et al. Mas-related G protein-coupled receptor D participates in inflammatory pain by promoting NF-κB activation through interaction with TAK1 and IKK complex. **Cellular Signalling**, v. 76, p. 109813, Dec. 2020. doi: 10.1016/j.cellsig.2020.109813

LAUTNER, R. Q. et al. Discovery and characterization of alamandine: A novel component of the renin-angiotensin system. **Circulation Research**, v. 112, n. 8, p. 1104–1111, Apr. 2013. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.113.301077

LECLERC, P. C. et al. Ascorbic acid decreases the binding affinity of the AT1 receptor for angiotensin II. **American Journal of Hypertension**, v. 21, n. 1, p. 67–71, Jan. 2008. doi: 10.1038/ajh.2007.1

LEES-SHEPARD, J. B. et al. Activin-dependent signaling in fibro/adipogenic progenitors causes Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, Feb. 2018. doi: 10.1038/s41467-018-02872-2

LEZAMA-MARTÍNEZ, D. et al. Combination of β adrenergic receptor block and renin–angiotensin system inhibition diminished the angiotensin II-induced vasoconstriction and increased bradykinin-induced vasodilation in hypertension. **Dose-Response**, v. 15, n. 4, p. 1–7, Nov. 2017. doi: 10.1177/1559325817737932

LI, M. et al. Losartan inhibits vascular calcification by suppressing the BMP2 and Runx2 expression in rats in vivo. **Cardiovascular toxicology,** v. 16, n. 2, p. 172-181, Apr. 2016. doi: 10.1007/s12012-015-9326-y

LI, S. N. et al. Angiogenesis in heterotopic ossification: from mechanisms to clinical significance. **Life Sciences**, v. 351, p. 122779, Aug. 2024. doi: 10.1016/j.lfs.2024.122779

LIU, F. et al. Role of the NF-kB signalling pathway in heterotopic ossification: biological and therapeutic significance. **Cell Communication and Signaling**, v. 22, n. 1, p. 159, Mar. 2024. doi: 10.1186/s12964-024-01533-w

LIU, X. et al. Ascorbic acid in epigenetic reprogramming. **Current Stem Cell Research & Therapy**, v. 17, n. 1, p. 13–25, Jan. 2022. doi: 10.2174/1574888X16666210714152730

LIU, Y.; LIU, Z. Emerging roles of the renin-angiotensin system in select oral diseases. **Oral Diseases,** v. 31, n. 1, p. 39-49, Jan. 2025. doi: 10.1111/odi.15134

MACCARI, S. et al. Biphasic effects of propranolol on tumour growth in B16F10 melanoma-bearing mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 174, n. 2, p. 139–149, Jan. 2017. doi: 10.1111/bph.13662

MAEKAWA, H. et al. Prophylactic treatment of rapamycin ameliorates naturally developing and episode -induced heterotopic ossification in mice expressing human mutant ACVR1. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 15, n. 1, May 2020. doi: 10.1186/s13023-020-01406-8

MAEKAWA, H. et al. Recapitulation of pro-inflammatory signature of monocytes with ACVR1A mutation using FOP patient-derived iPSCs. **Orphanet journal of rare diseases**, v. 17, n. 1, Dec. 2022. doi: 10.1186/s13023-022-02506-3

MAITY, J. et al. Ascorbic acid modulates immune responses through Jumonji-C domain containing histone demethylases and Ten eleven translocation (TET) methylcytosine dioxygenase. **Bioessays**, v. 45, n. 11, p. e2300035. Nov. 2023. doi: 10.1002/bies.202300035

MARKOWITZ, J. T. et al. “I can’t take off my shirt or do my own hair”—a qualitative investigation of the symptoms and impact experience of children and adolescents with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP). **Advances in Therapy**, v. 39, n. 6, p. 2796, June 2022. doi: 10.1007/s12325-022-02096-3

MARQUES, A. P. **Manual de goniometria.** 3. ed. Barueri: Manole, 2014. *E-book*. 122 p.

MARTINS, A. S. et al. **Composições farmacêuticas de propranolol e ácido ascórbico e usos.** Depositante: Universidade Federal de Minas Gerais e Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. BR 102015032492-8. Depósito: 23 dez. 2015. Concessão: 14 nov. 2023.

MEJIAS RIVERA, L.; SHORE, E. M.; MOURKIOTI, F. Cellular and molecular mechanisms of heterotopic ossification in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Biomedicines**, v. 12, n. 4, p. 779, Apr. 2024. doi: 10.3390/biomedicines12040779

MENG, X.; WANG, H.; HAO, J. Recent progress in drug development for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 477, n. 10, p. 2327, Oct. 2022. doi: 10.1007/s11010-022-04446-9

MESSIAS, A. L. B. et al. Buccal epithelial cells as non-invasive biological material for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva gene expression studies. **Journal of Pre-Clinical and Clinical Research**, June 2024. doi: 10.26444/jpccr/188214

MIOT, H. A. Valores anômalos e dados faltantes em estudos clínicos e experimentais. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 18, p. e20190004, maio 2019. doi: 10.1590/1677-5449.190004

MITO, K. et al. The nicotinic acetylcholine receptor α7 subunit is an essential negative regulator of bone mass. **Scientific Reports,** v. 7, p. 45597, Mar. 2017. doi: 10.1038/srep45597

MORALES, M. G. et al. Angiotensin II-induced pro-fibrotic effects require p38MAPK activity and transforming growth factor beta 1 expression in skeletal muscle cells. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 44, n. 11, p. 1993–2002, Nov. 2012. doi: 10.1016/j.biocel.2012.07.028

NASCIMENTO, D. R. et al. Ascorbic acid modulates the expression of genes involved in heterotopic ossification. **NBC-Periódico Científico do Núcleo de Biociências**, v. 7, n. 14, p. 81–97, Nov. 2017.

NASCIMENTO, D. R. et al. Rare and intractable Fibrodysplasia Ossificans Progressiva shows different PBMC phenotype possibly modulated by ascorbic acid and propranolol treatment. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 10, n. 3, p. 2021.01012, Aug. 2021. doi: 10.5582/irdr.2021.01012

NEHME, A. et al. An update on the tissue renin angiotensin system and its role in physiology and pathology. **Journal of Cardiovascular Development and Disease**, v. 6, n. 2, June 2019. doi: 10.3390/jcdd6020014

NIKISHINA, I. P. et al. Successful experience of tofacitinib treatment in patients with Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Pediatric rheumatology online journal**, v. 21, n. 1, Dec. 2023. doi: 10.1186/s12969-023-00856-1

NISHIMURA, S. et al. MRGD, a MAS-related G-protein coupled receptor, promotes tumorigenisis and is highly expressed in lung cancer. **PLoS ONE**, v. 7, n. 6, p. e38618, June 2012. doi: 10.1371/journal.pone.0038618

NUSGENS, B. V. et al. Topically applied vitamin C enhances the mRNA level of collagens I and III, their processing enzymes and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase 1 in the human dermis. **Journal of Investigative Dermatology,** v. 116, n. 16, p. 853-859, June 2001. doi: 10.1046/j.0022-202x.2001.01362.x

OLMSTED-DAVIS, E. et al. Hypoxic adipocytes pattern early heterotopic bone formation. **American Journal of Pathology**, v. 170, n. 2, p. 620–632, Feb. 2007. doi: 10.2353/ajpath.2007.060692

PALHARES, D. B. Myositis Ossificans Progressive. **Calcified Tissue International**, v. 60, n. 4, p. 394, Apr. 1997. doi: 10.1007/s002239900250

PALHARES, D. B. et al. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: oral ascorbate and intravenous bisphosphonate during flare-ups. **Journal of Musculoskeletal Pain**, v. 18, n. 3, p. 270–276, Sept. 2010. doi: 10.3109/10582452.2010.501300

PALHARES, D. B. et al. Propranolol and ascorbic acid in control of fibrodysplasia ossificans progressiva flare-ups due to accidental falls. **Intractable & Rare Diseases Research**, v. 8, n. 1, p. 24–28, Feb. 2019. doi: 10.5582/irdr.2018.01095

PALHARES, D. B.; LEME, L. M. Miosite ossificante progressiva: uma perspectiva no controle da doença. **Jornal de Pediatria**, v. 77, n. 5, p. 431–434, Sept.-Oct. 2001. doi: 10.2223/jped.287

PALHARES, M. G. et al. Clinical reports of 31 Brazilian case presentations with fibrodysplasia ossificans progressive. **International Journal of Development Research**, v. 8, n. 1, p. 18315-18320, 2018. Disponível em: <https://www.journalijdr.com/sites/default/files/issue-pdf/11727.pdf>. Acesso em: ago. 2022.

PATEL, S.; HUSSAIN, T. Dimerization of AT 2 and Mas receptors in control of blood pressure. **Current Hypertension Reports**, v. 20, n. 5, May 2018. doi: 10.1007/s11906-018-0845-3

PENG, K. et al. Longitudinal evaluation of pain, flare-up, and emotional health in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: analyses of the international FOP registry. **JBMR Plus**, v. 3, n. 8, Mar. 2019. doi: 10.1002/jbm4.10181

PETRIE, K. A. et al. Novel mutations in ACVR1 result in atypical features in two Fibrodysplasia Ossificans Progressiva patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 3, p. e5005, Mar. 2009. doi: 10.1371/journal.pone.0005005

PIGNOLO, R. J. et al. Plasma-soluble biomarkers for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) reflect acute and chronic inflammatory states. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 37, n. 3, p. 475–483, Mar. 2022a. doi: 10.1002/jbmr.4492

PIGNOLO, R. J. et al. Palovarotene for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): results of a randomized, placebo-controlled, double-blind phase 2 trial. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 37, n. 10, p. 1891–1902, Oct. 2022b. doi: 10.1002/jbmr.4655

PIGNOLO, R. J. et al. The natural history of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: a prospective, global 36-month study. **Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics**, v. 24, n. 12, Dec. 2022c. doi: 10.1016/j.gim.2022.08.013

PIGNOLO, R. J.; KAPLAN, F. S. Clinical staging of Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP). **Bone**, v. 109, p. 111–114, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.09.014

PIGNOLO, R. J.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: clinical and genetic aspects. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 6, n. 1, p. 1–6, Dec. 2011. doi: 10.1186/1750-1172-6-80

PIGNOLO, R. J.; SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: diagnosis, management, and therapeutic horizons. **Pediatric Endocrinology Reviews**, v. 10 Suppl 2, n. 1, p. 437–48, June 2013. Disponível em: https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC3995352/. Acesso em: julho de 2022.

PIGNOLO, R. J.; WANG, H.; KAPLAN, F. S. Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A Segmental Progeroid Syndrome. **Frontiers in Endocrinology**, v. 10, p. 908, Jan. 2020. doi: 10.3389/fendo.2019.00908

POOLE, T. D. D.; HOLDER, M. S. S.; GIPSON, D. Cardiac angiotensin II receptor populations during aortacaval fistulae, AII and β adrenergic receptor blockade. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 203, n. 3, p. 1865–1874, Sept. 1994. doi: 10.1006/bbrc.1994.2405

RANJBAR, R. et al. The potential therapeutic use of renin–angiotensin system inhibitors in the treatment of inflammatory diseases. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 3, p. 2277–2295, Mar. 2019. doi: 10.1002/jcp.27205

REBOIRAS-LÓPEZ, M. D. et al. Comparison of the Cytobrush®, dermatological curette and oral CDx® brush test as methods for obtaining samples of RNA for molecular analysis of oral cytology. **Cytopathology**, v. 23, n. 3, p. 192–197, June 2012. doi: 10.1111/j.1365-2303.2011.00860.x

RICE, A. S. C. et al. EMA401, an orally administered highly selective angiotensin II type 2 receptor antagonist, as a novel treatment for postherpetic neuralgia: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 clinical trial. **Lancet**, v. 383, May 2014. doi: 10.1016/S0140-6736(13)62337-5

ROCKE, D. M. et al. Age- and joint-specific risk of initial heterotopic ossification in patients who have Fibrodysplasia Ossificans Progressive. **Clinical Orthopaedics and Related Research**, n. 301, p. 243–8, Apr. 1994.

ROSAS-BALLINA, M.; TRACEY, K. J. Cholinergic control of inflammation. **Journal of Internal Medicine**, v. 265, n. 6, p. 663–679, June 2009. doi: 10.1111/j.1365-2796.2009.02098.x

ROSENSTIRN, J. A contribution to the study of Myosites Ossificians Progressiva. **Annals of Surgery**, v. 68, n. 5, p. 485–520, Nov. 1918a. doi: 10.1097/00000658-191811000-00006

ROSENSTIRN, J. A contribution to the study of Myositis Ossificans Progressiva. **Annals of Surgery**, v. 68, n. 6, p. 591–637, Dec. 1918b. doi: 10.1097/00000658-191812000-00005

RUIZ-ORTEGA, M. et al. Angiotensin II activates nuclear transcription factor kappaB through AT(1) and AT(2) in vascular smooth muscle cells: molecular mechanisms. **Circulation Research**, v. 86, n. 12, p. 1266–1272, June 2000. doi: 10.1161/01.res.86.12.1266

SALAZAR, V. S.; GAMER, L. W.; ROSEN, V. BMP signalling in skeletal development, disease and repair. **Nature Reviews Endocrinology**, v. 12, n. 4, p. 203–221, Apr. 2016. doi: 10.1038/nrendo.2016.12

SALDANHA DA SILVA, A. A. et al. Renin angiotensin system and cytokines in chronic kidney disease: clinical and experimental evidence. **Protein & Peptide Letters**, v. 24, n. 9, p. 799–808, Nov. 2017. doi: 10.2174/0929866524666170818160809

SALISBURY, E. et al. Heterotopic ossification has some nerve. **Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression**, v. 20, n. 4, p. 313–324, 2010. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v20.i4.30

SANTOS, R. A. S. et al. The ACE2/angiotensin-(1–7)/MAS axis of the renin-angiotensin system: focus on angiotensin-(1–7). **Physiological Reviews**, v. 98, n. 1, p. 505–553, Jan. 2018. doi: 10.1152/physrev.00023.2016

SANTOS, R. A. S. et al. The renin-angiotensin system: going beyond the classical paradigms. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 316, n. 5, p. H958–H970, 1 May 2019. doi: 10.1152/ajpheart.00723.2018

SCHOENMAKER, T. et al. Activin-a induces early differential gene expression exclusively in periodontal ligament fibroblasts from Fibrodysplasia Ossificans Progressiva patients. **Biomedicines**, v. 9, n. 6, p. 629, June 2021. doi: 10.3390/biomedicines9060629

SCHOENMAKER, T. et al. Transcriptomic differences underlying the Activin-a induced large osteoclast formation in both healthy control and Fibrodysplasia Ossificans Progressiva osteoclasts. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 7, p. 6822, Apr. 2023. doi: 10.3390/ijms24076822

SHA, N. et al. Differential responses of bone to angiotensin II and angiotensin (1-7): beneficial effects of ANG(1-7) on bone with exposure to high glucose. **American Journal of Physiology – Endocrinology and Metabolism,** v. 320, n. 1, p. E55-E70, Jan. 2021. doi:10.1152/ajpendo.00158.2020

SHAIKH, U. et al. Novel therapeutic targets for Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: emerging strategies and future directions. **Cureus,** v. 15, n.7, p. e42614, July 2023. doi: 10.7759/cureus.42614

SHAFRITZ, A. B. et al. Overexpression of an Osteogenic Morphogen in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **New England Journal of Medicine**, v. 335, n. 8, p. 555–561, Aug. 1996. doi: 10.1056/NEJM199608223350804

SHARIFI-RAD, M. et al. Lifestyle, oxidative stress, and antioxidants: back and forth in the pathophysiology of chronic diseases. **Frontiers in Physiology**, v. 11, July 2020. doi: 10.3389/fphys.2020.00694

SHIBUYA, C. M. et al. Propranolol inhibits cell viability and expression of the pro-tumorigenic proteins Akt, NF-κB, and VEGF in oral squamous cell carcinoma. **Archives of Oral Biology**, v. 136, p. 105383, Apr. 2022. doi: 10.1016/j.archoralbio.2022.105383

SHIMONO, K. et al. Potent inhibition of heterotopic ossification by nuclear retinoic acid receptor-γ agonists. **Nature Medicine**, v. 17, n. 4, p. 454–460, Apr. 2011. doi: 10.1038/nm.2334

SHORE, E. M. et al. A recurrent mutation in the BMP type I receptor ACVR1 causes inherited and sporadic Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **Nature Genetics**, v. 38, n. 5, p. 525–527, May 2006. doi: 10.1038/ng1783

SHORE, E. M.; KAPLAN, F. S. Inherited human diseases of heterotopic bone formation. **Nature Reviews Rheumatology**, v. 6, n. 9, p. 518–527, Sept. 2010. doi: 10.1038/nrrheum.2010.122

SHUAI, B. et al. Local renin-angiotensin system is associated with bone mineral density of glucocorticoid-induced osteoporosis patients. **Osteoporosis International**, v. 26, n. 3, p. 1063–1071, Mar. 2015. doi: 10.1007/s00198-014-2992-y

STILHANO, R. S. et al. Reduction in skeletal muscle fibrosis of spontaneously hypertensive rats after laceration by microRNA targeting angiotensin II receptor. **PLoS ONE**, v. 12, n. 10, p. 1–18, Oct. 2017. doi: 10.1371/journal.pone.0186719

SULZBERGER, L. et al. Serum levels of renin, angiotensin-converting enzyme and angiotensin II in patients treated by surgical excision, propranolol and captopril for problematic proliferating infantile haemangioma. **Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery**, v. 69, n. 3, p. 381–386, Mar. 2016. doi: 10.1016/j.bjps.2015.10.020

SUI, Y. et al. Angiotensin (1-7) inhibits vascular calcification in rats. **Peptides,** v. 42, p. 25-34, Apr. 2013. doi: 10.1016/j.peptides.2012.12.023

TAMARGO J.; CABALLERO, R.; DELPÓN, E. The renin–angiotensin system and bone. **Clinical Reviews in Bone and Mineral Metabolism**, v. 13, p. 125–148, July 2015. doi: 10.1007/s12018-015-9189-6

UPADHYAY, J. et al. The expansion of heterotopic bone in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva is Activin A-dependent. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 32, n. 12, p. 2489–2499, Dec. 2017. doi: 10.1002/jbmr.3235

VILAS-BOAS, W. W. et al. Effect of propranolol on the splanchnic and peripheral renin angiotensin system in cirrhotic patients. **World Journal of Gastroenterology**, v. 14, n. 44, p. 6824–6830, Nov. 2008. doi: 10.3748/wjg.14.6824

VILLELA, D. et al. Angiotensin type 2 receptor (AT2R) and receptor Mas: a complex liaison. **Clinical Science**, v. 128, n. 4, p. 227–234, Feb. 2015. doi: 10.1042/CS20130515

VITAMINA C [bula]: comprimidos. Responsável técnico Jadir Vieira Junior. Juiz de Fora: Medquímica Indústria Farmacêutica Ltda., 2019. Bula de remédio. Disponível em https://drconsulta.com/conteudo/vitamina-c-comprimido-medquimica-bula/. Acesso em: jan. 2025

WANG, H. et al. Cellular hypoxia promotes heterotopic ossification by amplifying BMP signaling. **Journal of Bone and Mineral Research**, v. 31, n. 9, p. 1652–1665, Sept. 2016a. doi: 10.1002/jbmr.2848

WANG, H. et al. Activin A amplifies dysregulated BMP signaling and induces chondro-osseous differentiation of primary connective tissue progenitor cells in patients with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). **Bone**, v. 109, p. 218–224, Apr. 2018. doi: 10.1016/j.bone.2017.11.014

WANG, J. et al. Ascorbic acid protects against hypertension through downregulation of ACE1 gene expression mediated by histone deacetylation in prenatal inflammation-induced offspring. **Scientific Reports**, v. 6, p. 39469, Dec. 2016b. doi: 10.1038/srep39469

WANG, Y. et al. Garetosmab in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva: clinical pharmacology results from the phase 2 LUMINA-1 trial. **The Journal of Clinical Pharmacology**, v. 64, n. 2, p. 264-274, Feb. 2024. doi: 10.1002/jcph.2344

WENTWORTH, K. L.; MASHARANI, U.; HSIAO, E. C. Therapeutic advances for blocking heterotopic ossification in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva. **British Journal of Clinical Pharmacology,** v. 85, n. 6, p. 1180-1187, June 2019. doi: 10.1111/bcp.13823

WESTERMEIER, F. et al. Novel players in cardioprotection: insulin like growth factor-1, angiotensin-(1-7) and angiotensin-(1-9). **Pharmacological Research**, v. 101, p. 41–55, Nov. 2015. doi: 10.1016/j.phrs.2015.06.018

WOLF, G. et al. Angiotensin II activates nuclear transcription factor-κB through AT1 and AT2 receptors. **Kidney International**, v. 61, n. 6, p. 1986–1995, June 2002. doi: 10.1046/j.1523-1755.2002.00365.x

WU, Y. et al. Differential expression of renin-angiotensin system-related components in patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis. **The American Journal of the Medical Sciences**, v. 359, n. 1, p. 17–26, Jan. 2020. doi: 10.1016/j.amjms.2019.10.014

YU, X. et al. ACVR1-activating mutation causes neuropathic pain and sensory neuron hyperexcitability in humans. **Pain**, v. 164, n. 1, p. 43-58, Jan. 2023. doi: 10.1097/j.pain.0000000000002656

ZHANG, X. et al. Sustained stimulation of β2- and β3-adrenergic receptors leads to persistent functional pain and neuroinflammation. **Brain, Behavior, and Immunity,** v. 73, p. 520-532, Oct. 2018. doi: 10.1016/j.bbi.2018.06.017

ZHOU, X. et al. Relationship between circulating levels of angiotensin-converting enzyme 2-angiotensin-(1-7)-MAS axis and coronary heart disease. **Heart Vessels,** v. 35, n. 2, p. 153-161, Feb. 2020. doi: 10.1007/s00380-019-01478-y

ZORZI, A. R. et al. Fibrodysplasia ossificans progressiva in Brazil: challenges and strategies to create assistance and educational networks. **Orphanet Journal of Rare Diseases**, v. 17, n. 1, p. 348, Sept. 2022. doi: 10.1186/s13023-022-02503-6

ZUO, Y. et al. Vitamin C promotes ACE2 degradation and protects against SARS-CoV-2 infection. **EMBO Reports**, v. 24, n. 4, Apr. 2023. doi: 10.15252/embr.202256374

APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo vencedor do 4º lugar no Concurso de Trabalhos Raros e Queridos do V Fórum de Doenças Raras do CFM, em abril de 2023 (aguardando publicação).

Fibrodisplasia ossificante progressiva: como amenizar a evolução clínica da doença?

Autoria

Suzana Lopes Bomfim Balaniuc[1], Ana Lígia Barbosa Messias[1], Lorena Falcão Lima[1], Marilene Garcia Palhares[1], Robson Augusto Souza Santos[2], Almir de Sousa Martins[1,2], Durval Batista Palhares[1]

[1]Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Mato Grosso do Sul, Brasil.

[2]Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Minas Gerais, Brasil.

Resumo

A fibrodisplasia ossificante progressiva (FOP) é uma doença genética ultrarrara intratável. Surtos inflamatórios, provocados ou espontâneos, frequentemente culminam em ossificações heterotópicas (OH). A história natural da doença é de um desfecho trágico de incapacitação física cumulativa. No atual cenário de tentativas terapêuticas, visando primeiramente o controle ou estagnação da doença, uma avaliação clínica periódica sistemática e pragmática é imprescindível. Nesse contexto, caracterizamos clinicamente 19 portadores de FOP (n=19), no qual utilizou-se um questionário semiestruturado com escalas previamente validadas, num estudo transversal piloto, que avalia a eficácia da terapêutica proposta, bem como seu impacto na qualidade e expectativa de vida dos portadores de FOP.

Palavras-chave

Fibrodisplasia ossificante progressiva. Eficácia clínica. estudos transversais.

Fibrodisplasia osificante progressiva: ¿cómo mitigar la evolución clínica de la enfermedad?

Resumen

La fibrodisplasia osificante progresiva (FOP) es una enfermedad genética ultrarrara intratable. Los brotes inflamatorios, provocados o espontáneos, culminan con frecuencia en osificaciones heterotópicas. La historia natural de la enfermedad es de desenlace trágico de incapacidad física acumulativa. En el escenario actual de intentos terapéuticos, dirigidos fundamentalmente al control o mitigación de la enfermedad, es fundamental una evaluación clínica periódica, sistemática y pragmática. En este contexto, caracterizamos clínicamente a 19 pacientes con FOP (n=19), mediante un cuestionario semiestructurado con escalas previamente validadas, en un estudio transversal piloto, que evalúa la eficacia terapéutica propuesta, así como su impacto en la calidad y esperanza de vida de los pacientes con FOP.

Palabras claves

Fibrodisplasia osificante progressiva. Eficacia del tratamento. Estudios transversales.

Fibrodysplasia ossificans progressiva: how to mitigate the clinical evolution of the disease?

Abstract

Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP) is an intractable ultra-rare genetic disease. Inflammatory outbreaks, provoked or spontaneous, frequently culminate in heterotopic ossifications. The natural history of the disease is one of tragic outcome of cumulative physical disability. In the current scenario of therapeutic attempts, primarily aimed at controlling or stagnating the disease, a systematic and pragmatic periodic clinical evaluation is essential. In this context, we clinically characterized 19 patients with FOP (n=19), by using a semi-structured questionnaire with previously validated scales, in a pilot cross-sectional study, which evaluates the proposed therapeutic efficacy, as well as its impact on the quality and life expectancy of FOP carriers.

Keywords

Fibrodysplasia ossificans progressiva. Clinical effectiveness. Cross-sectional studies.

Introdução

A Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP) é uma doença ultrarrara, genética autossômica dominante. De fisiopatologia complexa, é caracterizada por surtos inflamatórios provocados ou espontâneos (*flare-ups*), marcados por atividade imunoinflamatória intensa e desordenada, que, frequentemente, culmina na formação de ossificações heterotópicas (OH) e incapacidade cumulativa[1]. Sem tratamento curativo, a prevenção de *flare-ups* é fundamental, enquanto a terapêutica disponível baseia-se no controle e alívio dos sinais e sintomas inflamatórios, com pouco ou nenhum impacto sobre a ossificação ectópica e limitação articular subsequente[2].

Padrões cronológicos e anatômicos da OH na FOP têm sido estabelecidos desde os primeiros relatos da doença[3–5], e confirmados ao longo do tempo[6–10]. Ainda assim, fatores ambientais parecem interferir na evolução/progressão da doença, conferindo alguma variabilidade aos fenótipos e prognósticos, tornando a avaliação clínica da FOP um desafio para clínicos e pesquisadores.

Nesse contexto, Pignolo e Kaplan[11] propuseram o estadiamento clínico da FOP em cinco estágios – inicial/leve; moderado; severo; profundo e tardio/final – a partir de uma avaliação que abrange características da FOP e suas consequências em sete áreas. A princípio, o estágio é definido pela característica mais severa, pois provavelmente é a que mais influencia a morbimortalidade, somada a outras características clínicas consistentes com tal estágio. Esse método inclui a aplicação da *Cumulative Analogue Joint Involvement Scale* (CAJIS) para FOP, uma avaliação rápida e abrangente da mobilidade funcional grosseira, englobando 12 articulações, além da mandíbula, pescoço e coluna tóraco-lombar[12]. Pensando no acompanhamento clínico longitudinal, o mesmo grupo de pesquisadores desenvolveu a

Patient-Reported Mobility Assessment (PRMA), uma autoavaliação baseada nos critérios da CAJIS, com a qual mostrou correlação positiva quando comparada com a avaliação aplicada por especialistas[13].

Em outro aspecto, investigações recentes visam avaliar o impacto da doença na qualidade de vida física e mental de portadores de FOP e seus familiares e/ou cuidadores. Estudos observacionais têm mostrado associação da dor, imobilidade e incapacidade com relevantes prejuízos sociais e emocionais. Dentre os métodos utilizados nesses estudos citam-se a CAJIS, o *FOP-Physical Function Questionnaire* (PFQ), escalas PROMIS, e questionários semiestruturados (*Patient-Reported Outcomes Measurement Information System*) [13–16].

Esses e outros relatos registram a trágica história natural da FOP, enquanto um novo cenário é construído por perspectivas terapêuticas que almejam, ao menos, o controle ou a estagnação da doença [17–19]. Assim, mais do que registros evolutivos, é preciso avaliar periódica e criteriosamente a eficácia das terapias experimentais, utilizando instrumentos confiáveis, objetivos, de fácil aplicabilidade e de baixo custo.

Métodos

No Brasil, caracterizamos um grupo de 19 indivíduos portadores de FOP em tratamento com FOPCON (CAAE: 40606820.5.0000.0021 - UFMS), residentes nos estados de São Paulo, Rio Grande do Sul e Mato Grosso do Sul. FOPCON trata-se de um composto farmacêutico patenteado (Patente BR102150324928), formulado com ácido ascórbico e propranolol, cuja composição e posologia são prescritas de forma individualizada, de acordo com peso e idade do participante[18,19]. Em um estudo piloto transversal, foram aplicados um questionário semiestruturado, a escala CAJIS e a goniometria de algumas articulações. O questionário composto por 26 perguntas abrange dados sociodemográficos, quantidade e características das crises nos últimos seis meses, tratamento sintomático e experimental, avaliação da dor e qualidade do sono.

A escala CAJIS avalia o déficit funcional, interpretado como porcentagem de perda do movimento. Escores de 0 (zero) a 2 (dois) para cada articulação ou região avaliada, totalizam de 0 a 30 pontos, de modo que quanto mais alto o escore final, maior a incapacidade. Considerando articulações que se movem em mais de um plano, a pontuação deve considerar a maior limitação presente. Acompanha a escala de anotação referente à locomoção (que pode ser relacionada à pontuação obtida em MMII, de 0-12) e dependência para atividades de vida diária (que pode ser relacionada à pontuação obtida em MMSS, de 0-12)[12].

A goniometria avalia a amplitude de movimento (ADM) pela mensuração dos ângulos dos movimentos passivos ou ativos de uma articulação, em seus respectivos planos. Dentre as possíveis aplicações, é útil no diagnóstico e na avaliação de resultados terapêuticos[20].

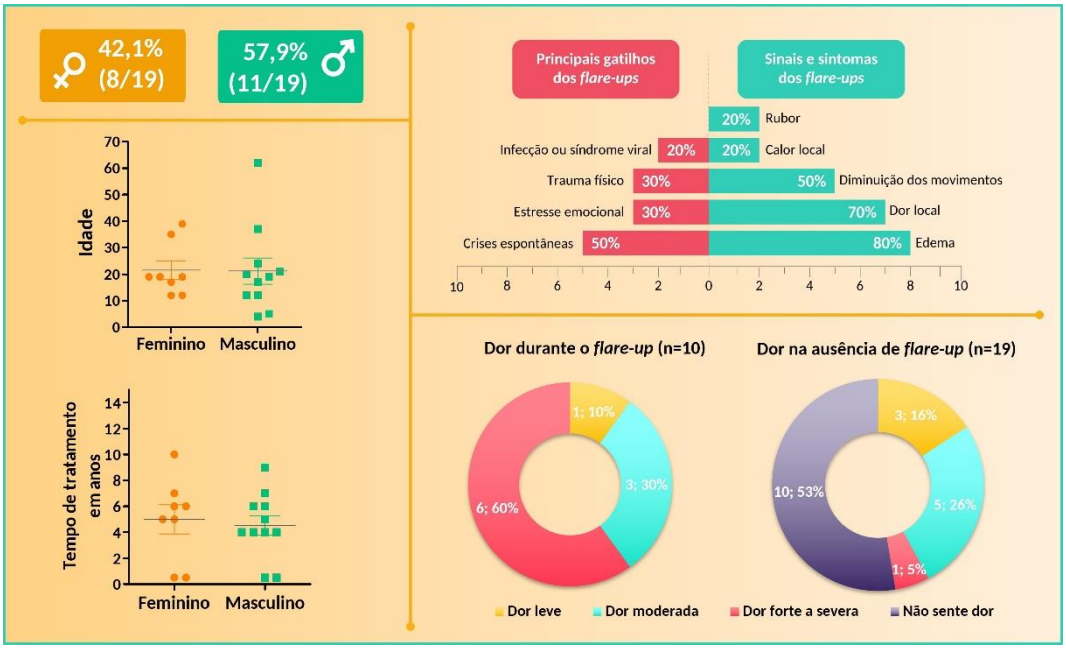
Resultados

A idade dos participantes variou de 4 a 62 anos (média=21,31); 57,9% (11/19) eram do sexo masculino e 42,1% (8/19) do sexo feminino. Todos os participantes recebiam tratamento com FOPCON (estudos em andamento), com períodos de tratamento entre seis meses e 10 anos (Figura 1).

Quanto à ocorrência de *flare*-ups, 42,1% (8/19) dos participantes não apresentavam surtos há mais de um ano da data da entrevista; 5,3% (1/19) apresentaram uma crise entre 6 e 12 meses antes da entrevista; 26,3% (5/19) sofreram uma ou mais crises dentro dos seis meses anteriores à entrevista; e 26,3% (5/19) passavam por uma crise na data da entrevista. Principais gatilhos e sintomas dos *flare-ups* sofridos nos seis meses anteriores à entrevista (n=10) são descritos na Figura 1. Nesse período, crises espontâneas foram relatadas por 50% dos participantes (5/10); edema (80%; 8/10) e dor local (70%, 7/10) foram os sintomas mais presentes. Desse grupo, 60% (6/10) relataram formação de osso ectópico e/ou diminuição de movimentos após resolução do *flare-up*. Os demais (4; 40%) não apresentaram sequelas.

Qualificada por meio de escala visual analógica da dor[21], 60% (6/10) dos pacientes que apresentaram *flare-ups* referiram dor forte a severa durante a crise. Dos 19 participantes, 47,4% (9/19) afirmaram sentir dor na ausência do *flare-up*, sendo que 55,6% destes (5/9) relataram dor moderada (Figura 1). Questionados sobre a qualidade do sono, apenas 15,8% dos participantes (3/19) relataram dificuldades para dormir, dois deles devido ao quadro álgico.

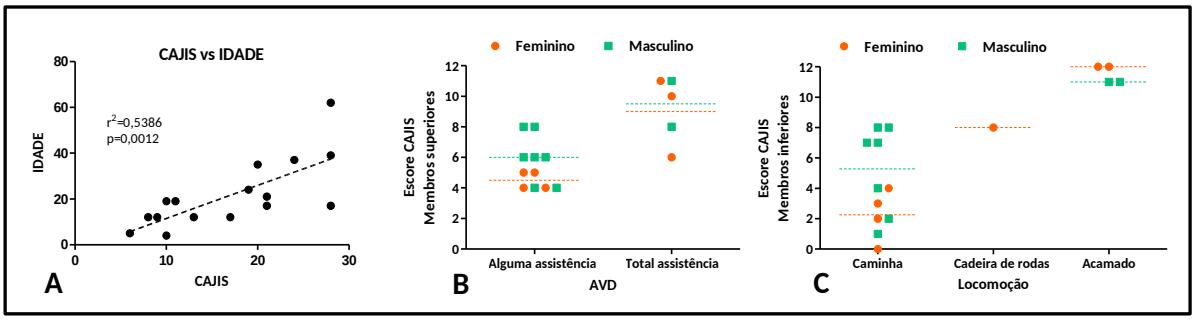
Figura 1. Infográfico com dados demográficos, características dos *flare-ups* e avaliação da dor



Para avaliar a funcionalidade dos participantes, foi aplicada presencialmente em 16 pacientes, a escala CAJIS. Os escores totais obtidos, variando de 6 a 28, mostraram correlação positiva com a idade dos

participantes (p=0,0012; r^2=0,5386) (Figura 2A). No que tange à assistência nas atividades de vida diária, 68,8% (11/16) dos participantes que necessitam de alguma assistência pontuaram escores entre 4 e 8 para MMSS; enquanto 31,2% (5/16) dos que necessitam de total assistência pontuaram escores de 6 a 11. Nenhum participante relatou total independência (Figura 2B). No que se refere à locomoção, 25% (4/16) dos participantes eram restritos ao leito, com escores de MMII entre 11 e 12 (Figura 2C).

Figura 2. Escores CAJIS e suas relações com idade, atividades de vida diária e locomoção



A) Correlação dos escores obtidos na escala CAJIS com a idade dos participantes. B) Assistência nas atividades de vida diária (AVD) em relação ao escore CAJIS de membros superiores (MMSS). C) Capacidade de locomoção em relação ao escore CAJIS de membros inferiores (MMII).

Complementando a CAJIS, foi aplicada a goniometria em grandes e/ou médias articulações que fossem acessíveis e não anquilosadas. Graus mensurados para flexão de cotovelo, flexão de joelho e respectivos escores CAJIS são descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Relação dos 16 participantes do estudo piloto que foram submetidos à CAJIS e goniometria presencial

ID	SEXO	IDADE	CAJIS COTOVELO		FLEXÃO COTOVELO		AVD	CAJIS JOELHO		FLEXÃO DE JOELHO		LOCOMOÇÃO
			D	E	D	E		D	E	D	E	
1	F	17	2	2	ANQ	ANQ	TOTAL	1	2	120°-130°	ANQ	ACAMADO
2	M	37	1	1	100°-130°	120-145°	TOTAL	1	2	20-110°	FIXO	ACAMADO
3	M	62	2	2	ANQ	ANQ	TOTAL	1	2	0-55°	ANQ	ACAMADO
4	F	19	0	2	0-135°	ANQ	ALGUMA	0	1	0-140°	10-80°	CAMINHA
5	F	39	2	2	ANQ	ANQ	TOTAL	2	2	ANQ	ANQ	ACAMADO
6	F	12	1	1	50°-130°	70°-136°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA
7	F	19	1	0	0-41°	0-135°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA
8	F	35	1	1	100°-120°	0-80°	TOTAL	1	1	0-35°	MISSED	CADEIRANTE
9	M	21	1	1	0-90°	0-108°	ALGUMA	1	1	0-110°	0-55°	CAMINHA
10	M	17	1	2	0-86°	78-90°	ALGUMA	1	1	0-110°	0-55°	CAMINHA
11	M	4	1	1	10°-115°	0-130°	ALGUMA	1	1	0-152°	0-150°	CAMINHA

12	M	12	1	1	50°-125°	20-100°	ALGUMA	1	1	10-118°	0-118°	CAMINHA
13	M	12	1	1	0-118°	0-120°	ALGUMA	1	2	0-110°	ANQ	CAMINHA
14	M	5	1	1	10°-110°	20°-130°	ALGUMA	0	1	0-145°	0-115°	CAMINHA
15	M	24	2	2	ANQ	ANQ	ALGUMA	2	1	ANQ	MISSED	CAMINHA
16	F	12	1	1	10°-110°	0-118°	ALGUMA	0	0	0-140°	0-140°	CAMINHA

ANQ = anquilosado; MISSED = não acessível para mensuração.

Discussão

A FOP é uma doença órfã, ainda intratável e incurável. Surtos repentinos (*flare-ups*), mas frequentes e duradouros, costumam ser extremamente dolorosos e resultam em inúmeras e extensas OH com alto grau de incapacidade, ainda na adolescência. À espera por terapias modificadoras da doença, importa melhorar a qualidade e expectativa de vida dos portadores de FOP. Para isso, propõe-se, além do tratamento sintomático, o controle do estado inflamatório persistente da FOP, a fim de reduzir a frequência e intensidade das crises e aliviar a dor inflamatória.

Peng e colaboradores[16] identificaram entre 99 pacientes, estados de dor moderada a severa (escore $\geq$4) frequentemente associados à ocorrência de um *flare-up*. Entretanto, ressaltam que até 55% dos pacientes que não experimentaram crises relataram dor de nível moderado a severo durante o estudo. Semelhantemente, identificamos quadros de dor forte a severa em 60% (6/10) dos participantes durante um *flare-up*. Em contrapartida, na ausência de surtos, 53% (10/19) dos participantes não apresentaram queixa álgica e apenas um participante (5%) relatou dor forte a severa nesse período. É possível que a modulação de genes pró e anti-inflamatórios esteja associada ao alívio da dor no período quiescente da doença[19].

Outro aspecto impactante da FOP refere-se à precoce limitação de movimentos, comprometendo a locomoção e a independência para autocuidado e atividades de vida diária. Ao avaliar e registrar mobilidade e locomoção, é interessante observar que em alguns casos a restrição ao leito não exclui a capacidade de ficar de pé ou de caminhar, mas representa a posição em que aquele indivíduo permanece por mais tempo, devido a posição de anquilose dos quadris não permitir a posição sentada. Obviamente, nessas condições, manter-se de pé por algum tempo ou caminhar curtas distâncias pode ser uma atividade exaustiva e pouco funcional. De outro modo, ainda que sejam capazes de caminhar com certa liberdade, não é incomum observar movimentos compensatórios na marcha, e dificuldade em adotar a posição sentada com o quadril flexionado a 90 graus, o que compromete a acessibilidade e viabilidade de transporte dessas pessoas.

Ainda considerando a funcionalidade, apesar de descrita em literatura uma correlação confiável entre os escores totais da CAJIS e a incapacidade de maneira generalizada[12,13], a goniometria nos permitiu observar que, em algum momento, escores iguais serão aplicados para níveis de comprometimento muito diferentes (Quadro 1). Isso, provavelmente devido ao amplo intervalo de 10% a 90% de perda de movimento a ser

considerado no escore 1 (articulação parcialmente prejudicada). Na prática, considerando a ADM normal do cotovelo de 0 a 145° (extensão-flexão), um déficit de 20% corresponderá a uma ADM de 116 graus. Um déficit de 85%, por sua vez, corresponderá a uma ADM de apenas 21,75 graus. O escore conferido para ambos os déficits da articulação será o mesmo, entretanto, é provável que com 20% de déficit o indivíduo seja capaz de realizar determinadas tarefas da vida diária impossíveis ao indivíduo com déficit de 85%, o que pode explicar escores iguais para desfechos diferentes em assistência para AVDs e locomoção. Por fim, é possível que a larga faixa de avaliação compreendida no escore 1 neutralize pequenas perdas e/ou ganhos (ainda que raros) de movimento, quando avaliados periodicamente, e que olhos pouco treinados induzam a atribuição de escores equivocados.

A princípio, a goniometria parece ser um método prático, de baixo custo e relevante no registro de movimentos preservados, para futuras comparações e compreensão da evolução da doença. Entretanto, admite-se a necessidade de algum grau de experiência e habilidade técnica do avaliador, para garantir fidelidade na coleta dos dados. Sem dúvida, são necessários estudos adicionais que assegurem a viabilidade de avaliação goniométrica à distância por meio de softwares específicos, na impossibilidade de consulta presencial.

Conclusão

Apoiamos a relevância de estudos longitudinais dos portadores de FOP, sobretudo os arrolados em estudos clínicos, a fim de registrar a evolução clínica e os efeitos da terapia proposta. Aqui, por meio de um estudo piloto, mostramos uma breve caracterização de 19 pacientes residentes no Brasil, em tratamento com FOPCON. A fim de registrar a evolução clínica e avaliar a eficácia do tratamento com ácido ascórbico e propranolol, incentivamos um estudo longitudinal de pelo menos 24 meses, contemplando o registro semestral da ocorrência das crises e suas características por meio do questionário semiestruturado aqui aplicado, acrescido de avaliação da dor, da qualidade de vida, e da assistência em AVDs, utilizando escalas previamente validadas. Finalmente, sugerimos a avaliação clínica a cada dois anos, na qual seja aplicada a escala CAJIS, agregada sempre que possível à goniometria, para a interpretação mais refinada dos desfechos clínicos de pacientes nos estágios leve e moderado.

Agradecimentos

Este estudo é parte da tese de doutorado de Balaniuc SLB, Messias ALB e Lima LF, no Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste (PPGSD), da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS). Este trabalho é apoiado financeiramente pelo Instituto de Assistência em Pesquisa em Educação e Saúde – IAPES, Campo Grande, MS, Brasil.

Referências

1. Qi Z, Luan J, Zhou X, Cui Y, Han J. Fibrodysplasia ossificans progressiva: basic understanding and experimental models. Intractable Rare Dis Res [Internet]. 2017 [acesso 30 jan 2023];6(4):242-8. DOI: 10.5582/irdr.2017.01055

2. Rocco M, Baujat G, Bertamino M, Brown M, Cunto CL, Delai PLR *et al*. International physician survey on management of FOP: a modified Delphi study. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2017 [acesso 5 nov 2022];12(1):1-5. DOI: 10.1186/s13023-017-0659-4

3. Rosenstirn J. A contribution to the study of myositis ossificans progressiva. Ann Surg [Internet]. 1918 [acesso 13 mai 2020];68(6):591-637. DOI: 10.1097/00000658-191812000-00005

4. Lutwak L. Myositis ossificans progressiva. Mineral, metabolic and radioactive calcium studies of the effects of hormones. Am J Med [Internet]. 1964 [acesso 13 mai 2020];37(2):269-93. DOI: 10.1016/0002-9343(64)90011-7

5. McKusick VA. Heritable disorders of connective tissue. J Chronic Dis [Internet]. 1956 [acesso 13 mai 2020];3(5):521-56. DOI: 10.1016/0021-9681(56)90149-7

6. Connor JM, Evans DAP. Fibrodysplasia ossificans progressiva. The clinical features and natural history of 34 patients. J Bone Joint Surg [Internet]. 1982 [acesso 20 jun 2020];64(1):76-83. DOI: 10.1302/0301-620X.64B1.7068725

7. Cohen RB, Hahn GV, Tabas JA, Peeper J, Levitz CL, Sando A *et al*. The natural history of heterotopic ossification in patients who have fibrodysplasia ossificans progressiva. A study of forty-four patients. J Bone Joint Surg [Internet]. 1993 [acesso 20 jun 2020];75(2):215-9. DOI: 10.2106/00004623-199302000-00008

8. Pignolo RJ, Bedford-Gay C, Liljesthröm M, Durbin-Johnson BP, Shore EM, Rocke DM *et al*. The Natural History of Flare-Ups in Fibrodysplasia Ossificans Progressiva (FOP): A Comprehensive Global Assessment. J Bone Min Res [Internet]. 2016 [acesso 20 jun 2020];31(3):650-6. DOI: 10.1002/jbmr.2728

9. Pignolo RJ, Baujat G, Brown MA, Cunto C, Rocco M, Hsiao EC *et al*. Natural history of fibrodysplasia ossificans progressiva: cross-sectional analysis of annotated baseline phenotypes. Orphanet J Rare Dis [Internet]. 2019 [acesso 18 set 2021];14(1):98. DOI: 10.1186/s13023-019-1068-7

10. Palhares MG, Nascimento DR, Giuliani LR, Xavier PCN, Nascimento VA, Martins AS *et al*. Clinical reports of 31 Brazilian case presentations with fibrodysplasia ossificans progressiva. Intern Jour Dev Res [Internet]. 2018 [acesso 3 ago 2020];8(1):18315-20. Disponível: https://www.journalijdr.com/sites/default/files/issue-pdf/11727.pdf

11. Pignolo RJ, Kaplan FS. Clinical staging of fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Bone [Internet]. 2018 [acesso 7 dez 2021];109:111-4. DOI: 10.1016/j.bone.2017.09.014

12. Kaplan FS, Mukaddam M, Pignolo RJ. A cumulative analogue joint involvement scale (CAJIS) for fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Bone [Internet]. 2017 [acesso 7 dez 2021];101:123-8. DOI: 10.1016/j.bone.2017.04.015

13. Kaplan FS, Mukaddam M, Pignolo RJ. Longitudinal patient-reported mobility assessment in fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Bone [Internet]. 2017 [acesso 6 set 2022];109:158-61. DOI: 10.1016/j.bone.2017.06.005

14. Markowitz JT, Rofail D, Vandenberg G, Baldasaro J, Sanchez RJ, Pignolo RJ *et al*. “I Can’t Take off My Shirt or Do My Own Hair”— a qualitative Investigation of the symptoms and impact experience of children and adolescents with fibrodysplasia ossificans progressiva (FOP). Adv Ther [Internet]. 2022 [acesso 25 dez 2022];39(6):2796. DOI: 10.1007/s12325-022-02096-3

15. Pignolo RJ, Baujat G, Brown MA, Cunto C, Hsiao EC, Keen R *et al*. The natural history of fibrodysplasia ossificans progressiva: A prospective, global 36-month study. Genet Med [Internet]. 2022 [acesso 18 dez 2022];24(12):2422-33. DOI: 10.1016/j.gim.2022.08.013

16. Peng K, Cheung K, Lee A, Sieberg C, Borsook D, Upadhyay J. Longitudinal evaluation of pain, flare-up, and emotional health in fibrodysplasia ossificans progressiva: analyses of the international FOP registry. JBMR Plus [Internet]. 2019 [acesso 18 dez 2022];3(8):1-7. DOI: 10.1002/jbm4.10181

17. Wentworth KL, Masharani U, Hsiao EC. Therapeutic advances for blocking heterotopic ossification in fibrodysplasia ossificans progressiva. Br J Clin Pharmacol [Internet]. 2019 [acesso 20 set 2020];85(6):1180-7. DOI: 10.1111/bcp.13823

18. Palhares DB, Nascimento DR, Palhares MG, Balaniuc SLB, Giuliani LR, Xavier PCN *et al*. Propranolol and ascorbic acid in control of fibrodysplasia ossificans progressiva flare-ups due to accidental falls. Intractable Rare Dis Res [Internet]. 2019 [acesso 3 ago 2020];8(1):24-8. DOI: 10.5582/irdr.2018.01095

19. Nascimento DR, Balaniuc SLB, Palhares DB, Underwood A, Palhares MG, Alves F *et al*. Rare and intractable fibrodysplasia ossificans progressiva shows different PBMC phenotype possibly modulated by ascorbic acid and propranolol treatment. Intractable Rare Dis Res [Internet]. 2021 [acesso 28 nov 2021];10(3):179-89. DOI: 10.5582/irdr.2021.01012

20. Crasto JA, Sayari AJ, Gray RR-L, Askari M. Comparative analysis of photograph-based clinical goniometry to standard techniques. Hand (NY) [Internet]. 2015 [acesso 20 mar 2023];10(2):248-53. DOI: 10.1007/s11552-014-9702-2

21. Hawker GA, Mian S, Kendzerska T, French M. Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). Arthritis Care Res [Internet]. 2011 [acesso 15 mar 2023];63(suppl. 11):240-52. DOI: 10.1002/acr.20543

APÊNDICE B – Termos de consentimento/assentimento livre e esclarecido

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome do voluntário:_____

Data de nascimento:_____Idade:_____anos R.G _____

O(A) senhor(a) está sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa "ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM FOPCON, FOPCON Plus e FOPCON Epi".

A pesquisa é coordenada por Durval Batista Palhares, pesquisador da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que pode ser contatado pelo telefone (67) 99982- 1927, e-mail: dbpalhares@hotmail.com, ou no endereço profissional: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Av. Senador Filinto Muller, 355, Vila Ipiranga, Campo Grande/MS. Esta pesquisa foi previamente avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS que em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, pode ser contatada pelo telefone (67) 3345-7187, pelo e-mail: cepconep.propp@ufms.br, ou diretamente no campus da UFMS, localizado na Av. Costa e Silva, s/n – Prédio das Pró- Reitorias, 1º andar.

O objetivo desta pesquisa é investigar os efeitos do tratamento da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), com um medicamento composto (patenteado como FOPCON). Nossa hipótese é de que o uso contínuo de FOPCON pode reduzir a ocorrência dos surtos inflamatórios e a formação de osso heterotópico. Queremos, também, saber se esse efeito pode ser melhorado com o uso adicional de FOPCON Plus ou FOPCON Epi. Assim, estudaremos três grupos de tratamento: (1) FOPCON; (2) FOPCON Plus; e (3) FOPCON Epi.

Ao concordar em participar da pesquisa, após avaliação clínica pelo pesquisador e sua equipe, você será alocado em um grupo e será prescrita pelo médico a dose da medicação conforme a sua idade e o seu peso. A medicação será disponibilizada gratuitamente e ajustada sempre que necessário. Caso você já receba FOPCON, o mesmo será mantido e poderá ser oferecido, adicionalmente, FOPCON Plus ou FOPCON Epi, que poderá ser identificado como "FOPCON Tarde".

A participação nesta pesquisa conta com sua doação de pequenas amostras de sangue e de raspado da parte interna da bochecha (mucosa oral), antes e durante o tratamento. Essas amostras serão estocadas no Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS, conforme a Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017, que rege as Normas Regulamentadoras para o armazenamento e uso de material biológico humano da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os materiais coletados serão utilizados exclusivamente nos estudos desenvolvidos dentro deste projeto.

Rubrica do pesquisador: Rubrica do participante:

A coleta de sangue pode trazer desconforto momentâneo com dor leve e possível surgimento de hematoma no local da coleta. Para acompanhamento da evolução clínica, poderá ser necessário o registro de imagens fotográficas e/ou de vídeo.

Normalmente, a associação contida no FOPCON não apresenta efeitos colaterais quando administrada em doses adequadas. Entretanto, ao surgimento de sintomas como: bradicardia (frequência cardíaca baixa), hipotensão (pressão baixa), irritação gástrica ou outro sintoma indesejado, o pesquisador responsável deverá ser contatado imediatamente, para que sejam tomadas as devidas providências. As substâncias experimentais, no FOPCON Plus ou FOPCON Epi, são compostos de origem natural, e habitualmente não apresentam efeitos colaterais. Mas ao surgimento de qualquer desconforto, tais como falta de apetite, emagrecimento, diarreia, dor de cabeça, dor no estômago ou abdominal, o pesquisador responsável deve ser imediatamente comunicado. Ressaltamos que o uso de FOPCON Plus é contraindicado no período de gestação e lactação.

Havendo necessidade de despesas financeiras por sua parte, em relação à medicação oferecida ou coleta das amostras, elas serão ressarcidas pelo pesquisador, mediante comprovação da despesa. Da mesma forma, eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa serão devidamente indenizados. Para sua segurança e fidelidade dos resultados, é importante que você não inicie outros medicamentos para tratamento da FOP sem o conhecimento do pesquisador responsável.

A fim de beneficiar o tratamento de outros pacientes, pretendemos publicar em revistas científicas os resultados e novos conhecimentos obtidos ao longo da pesquisa, mas garantimos total sigilo de suas informações pessoais, bem como do seu rosto, caso a divulgação de imagens seja necessária.

Você tem total liberdade para recusar participar deste projeto de pesquisa, agora ou em qualquer momento durante seu desenvolvimento. Este termo será preenchido e assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador principal e outra com você.

Eu,_____,
RG nº_____, declaro ter sido informado(a) e esclarecido(a), e concordo voluntariamente com a participaçãono projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande,MS,_____de_____de_____.

_____

Assinatura do participante

_____

Assinatura do pesquisador responsável

_____

Assinatura da testemunha

Rubrica do pesquisador: Rubrica do participante:

Termo de Assentimento Informado Livre e Esclarecido (TALE)

Nome:_____ Idade:_____anos.
Data de nascimento:_____Documento:_____

Você está sendo convidado para participar da pesquisa "ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA, ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM FOPCON, FOPCON Plus, E FOPCON Epi ". Isso quer dizer que nós queremos saber se as dores e o osso formado por causa da FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA (FOP), podem diminuir se você tomar um remédio específico todos os dias.

Para estudarmos os efeitos do remédio, vamos precisar coletar um pouco do seu sangue e um raspado do lado de dentro da sua bochecha, algumas vezes durante a pesquisa. Essas amostras de sangue ficarão guardadas no nosso laboratório (Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS), obedecendo as regras de nossa universidade (Resolução Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017).

A coleta do sangue pode doer um pouco, por isso será feita com bastante cuidado. Nós também vamos precisar de fotos e filmagem, para podermos identificar se houve alguma melhora ou piora dos movimentos que você consegue fazer hoje, e depois do uso do remédio.

Você não precisa participar da pesquisa se não quiser, mas se você quiser participar, seus pais (ou responsáveis) também precisam concordar com isso. Além disso, vocês podem desistir de participar da pesquisa em qualquer momento, sem problema nenhum.

Se você e seus pais (ou responsáveis) aceitarem participar da pesquisa, você será avaliado por um médico e vai receber de graça um remédio para tomar todos os dias. Nós vamos estudar três grupos. Dependendo do grupo que você participar, você vai receber o FOPCON, FOPCON Plus ou FOPCON Epi.

Normalmente, quando indicado por um médico, esses remédios não apresentam efeitos colaterais. Isso quer dizer que eles não vão fazer mal para você. Mas, se tomando FOPCON você sentir dores na barriga, enjôo, ou alguma sensação ruim e diferente depois de começar a usar o remédio, você precisa avisar seus pais e eles poderão procurar o

pesquisador Durval Batista Palhares, pelo telefone (67) 99982-1927, para que ele e sua equipe cuidem de você.

O FOPCON Epi é composto de uma substância natural, tirada de uma planta. As doses que vamos estudar são baixas, mas alguns estudos mostram que tomar grandes quantidades de FOPCON Epi pode diminuir sua vontade de comer e você poderá emagrecer. O FOPCON Plus também contem uma substância natural, tirada da casca de algumas frutas. Pode dar diarreia, dor de cabeça e dor na barriga. Se isso acontecer, você também precisa avisar os seus pais.

Se você e seus pais (ou responsáveis) tiverem alguma dúvida sobre seus direitos como um paciente de pesquisa, você também pode contatar o Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul pelo telefone (67) 3345-7187. Esse comitê já conhece o nosso projeto de pesquisa e autorizou a sua realização.

Os resultados da pesquisa vão ser publicados em revistas científicas, mas não vamos colocar seu nome e, se usarmos uma foto sua, não vamos mostrar o seu rosto. Assim, ninguém saberá que você participou da pesquisa, se você não quiser.

Eu,_____aceito participar da pesquisa. Entendi as coisas ruins e as coisas boas que podem acontecer. Entendi que posso dizer "sim" e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer "não" e desistir.

Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento, li junto com o pesquisador e com meus pais (ou responsáveis) e concordo em participar da pesquisa.

Campo Grande,MS,_____de_____de_____

_____

Assinatura do participante

_____

Assinatura do pesquisador responsável

_____

Assinatura da testemunha

Rubrica do pesquisador: Rubrica do participante:

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

Nome do voluntário:_____

Data de nascimento:_____Idade: _____ anos R.G. _____

Seu (sua) filho(a) está sendo convidado(a) para participar do projeto de pesquisa "ASPECTOS CLÍNICOS, BIOQUÍMICOS E MOLECULARES EM PORTADORES DE FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA ANTES E DEPOIS DO TRATAMENTO COM FOPCON, FOPCON Plus E FOPCON Epi".

A pesquisa é coordenada por Durval Batista Palhares, pesquisador da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), que pode ser contatado pelo telefone (67) 99982- 1927, e-mail: dbpalhares@hotmail.com, ou no endereço profissional: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian, Av. Senador Filinto Muller, 355, Vila Ipiranga, Campo Grande/MS. Esta pesquisa foi previamente avaliada e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS que em caso de recurso, dúvidas ou reclamações, pode ser contatada pelo telefone (67) 3345-7187, pelo e-mail: cepconep.propp@ufms.br, ou diretamente no campus da UFMS, localizado na Av. Costa e Silva, s/n – Prédio das Pró- Reitorias, 1º andar.

O objetivo desta pesquisa é investigar os efeitos do tratamento da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva (FOP), com um medicamento composto (patenteado como FOPCON). Nossa hipótese é de que o uso contínuo de FOPCON pode reduzir a ocorrência dos surtos inflamatórios e a formação de osso heterotópico. Queremos, também, saber se esse efeito pode ser melhorado com o uso adicional de FOPCON Plus ou FOPCON Epi. Assim, estudaremos três grupos de tratamento: (1) FOPCON; (2) FOPCON Plus; e (3) FOPCON Epi.

Ao concordar em participar da pesquisa, após avaliação clínica pelo pesquisador e sua equipe, dependendo do grupo que seu(sua) filho(a) participar, será prescrita pelo médico a dose da medicação conforme a idade e o peso do(a) seu(sua) filho(a), que será disponibilizada gratuitamente e ajustada sempre que necessário. Caso ele(a) já receba FOPCON, o mesmo será mantido e poderá ser oferecido, adicionalmente, FOPCON Plus ou FOPCON Epi, que poderá ser identificado como "FOPCON Tarde".

A participação nesta pesquisa conta com a doação de pequenas amostras de sangue e de raspado da parte interna da bochecha (mucosa oral), antes e durante o tratamento. Essas amostras serão estocadas no Laboratório de Biologia Molecular/Pediatria/UFMS, conforme a Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017, que rege as Normas Regulamentadoras para o armazenamento e uso de material biológico humano da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. Os materiais coletados serão utilizados exclusivamente nos estudos desenvolvidos dentro deste projeto.

Rubrica do pesquisador: Rubrica do participante:

A coleta de sangue pode trazer desconforto momentâneo com dor leve e possível surgimento de hematoma no local da coleta. Para acompanhamento da evolução clínica, poderá ser necessário o registro de imagens fotográficas e/ou de vídeo.

Normalmente, a associação contida no FOPCON não apresenta efeitos colaterais quando administrada em doses adequadas. Entretanto, ao surgimento de sintomas como: bradicardia (frequência cardíaca baixa), hipotensão (pressão baixa), irritação gástrica ou outro sintoma indesejado, o pesquisador responsável deverá ser contatado imediatamente, para que sejam tomadas as devidas providências. As substâncias experimentais, no FOPCON Plus ou FOPCON Epi, são compostos de origem natural, e habitualmente não apresentam efeitos colaterais. Mas ao surgimento de qualquer desconforto, tais como falta de apetite, emagrecimento, diarreia, dor de cabeça, dor no estômago ou abdominal, o pesquisador responsável deve ser imediatamente comunicado. Ressaltamos que o uso de FOPCON Plus é contraindicado no período de gestação e lactação.

Havendo necessidade de despesas financeiras por parte do participante em relação à medicação oferecida ou coleta das amostras, elas serão ressarcidas pelo pesquisador, mediante comprovação da despesa. Da mesma forma, eventuais danos comprovadamente decorrentes da pesquisa serão devidamente indenizados.

Para sua segurança e fidelidade dos resultados, é importante que seu(sua) filho(a) não inicie outrosmedicamentos para tratamento da FOP sem o conhecimento do pesquisador responsável.

A fim de beneficiar o tratamento de outros pacientes, pretendemos publicar em revistas científicas os resultados e novos conhecimentos obtidos ao longo da pesquisa, mas garantimos total sigilo das informações pessoais do participante, bem como do seu rosto, caso a divulgação de imagens seja necessária.

Você tem total liberdade para recusar a participação neste projeto de pesquisa, agora ou em qualquer momento durante seu desenvolvimento. Este termo será preenchido e assinado em duas vias, ficando uma com o pesquisador principal e outra com você, como responsável legal do participante.

Eu, _____, RG nº_____, declaro ter sido informado(a) e esclarecido(a), e concordo voluntariamente com a participação do menor: _____no projeto de pesquisa acima descrito.

Campo Grande,MS,_____de_____de_____

_____
Assinatura do responsável legal

_____
Assinatura do pesquisador responsável

_____
Assinatura da testemunha

Rubrica do pesquisador: Rubrica do participante:

APÊNDICE C – Folha de anamnese e avaliação física

PESQUISA EM FIBRODISPLASIA OSSIFICANTE PROGRESSIVA

Identificação

Nome: _____ Código: _____

Data de Nascimento: _____ Idade: _____

Endereço: _____

Telefone: _____

Responsável: _____

História Pregressa

Antecedentes gestacionais: ☐ Parto normal ☐ Parto cesárea ☐ Uso de fórceps
☐ A termo ☐ Prematuro ☐ Pós-termo

Idade do diagnóstico de FOP: _____ ☐ FOP Típica ☐ FOP Atípica (Plus ou Variante)

Meio de diagnóstico: ☐ Exame clínico ☐ Tomografia computadorizada
☐ Radiografia ☐ Ressonância Magnética
☐ Sequenciamento de DNA ☐ Outro:

Idade em que aconteceu a 1ª crise (*flare up*): _____

Local acometido na 1ª crise: ☐ Pescoço ☐ MMSS
☐ Costas ☐ MMII
☐ Bacia ☐ Outro:

Tratamentos anteriores: ☐ Corticosteroides ☐ Ibuprofeno ☐ Cox-2
☐ Naproxeno ☐ Dipirona ☐ Bifosfonatos
☐ Outros: _____

História da Doença Atual

Queixa principal: _____

Situação atual: ☐ Em crise (*flare-up*) Local: _____
☐ Febre ☐ Dor ☐ Dificuldade no sono ☐ Diarreia ☐ Vômitos
☐ Outro: _____

Exame Físico

Peso: _____ kg Altura: _____ cm FC: _____ bpm PA: _____ mmHg

Hálux: ☐ Valgo ☐ Curto ☐ Normal

Ossificações: ☐ Pescoço ☐ Cabeça ☐ Costas ☐ MMSS ☐ MMII ☐ Bacia

Movimentos: ☐ Normais ☐ MMSS limitados ☐ MMII limitados ☐ Pescoço limitado
☐ Não se senta ☐ Anda com dificuldade ☐ Cadeira de rodas ☐ Acamado

Coluna: ☐ Normal ☐ Hipercifose ☐ Hiperlordose ☐ Escoliose

Boca: ☐ Normal ☐ Abertura limitada ☐ Travada

Audição: ☐ Normal ☐ Diminuída ☐ Surdez ☐ Usa prótese

CAJIS e GONIOMETRIA

Incapacidade	**Sim**	**Não**
Caminha	☐	☐
Usa cadeira de rodas	☐	☐
Necessita de **alguma ajuda** nas Atividades de Vida Diária	☐	☐
Necessita de **total ajuda** nas Atividades de Vida Diária	☐	☐

	Afetado (1)*	**Funcionalmente anquilosado (2)***	**Goniometria**
Pescoço			FLX
Coluna torácica e lombar			
Mandíbula			
Ombro D			ABD
Ombro E			ABD
Cotovelo D			
Cotovelo E			
Punho D			
Punho E			
Quadril D			ABD
Quadril E			ABD
Joelho D			
Joelho E			
Tornozelo D			
Tornozelo E			
Subtotal			
Total			

*Considerar: 0 (zero) = mobilidade normal a déficit <10%; 1 (um) = déficit de 10%-90%; 2 (dois) = déficit ≥ 90%. **Examinador:**

Tratamento Proposto

☐ FOPCON (PP + AA)
☐ FOPCON (PP + AA) + FOPCON PLUS (AA + HSP)
☐ FOPCON (PP + AA) + FOPCON EPI (AA + EPI) – Ensaio duplo cego

Data: _____ Examinador: _____

Dados da Coleta de Material

Amostra: ☐ Sangue na heparina ☐ Sangue no RNAlater® ☐ Raspado de mucosa oral

Data: _____ Profissional: _____

Controle de Função Hepática (Pré-tratamento com Epi)
(ALT – alanina aminotransferase / AST – aspartato aminotransferase)

Data: _____ ALT: _____ AST: _____ ☐ Não se aplica

1ª AVALIAÇÃO APÓS INÍCIO DO TRATAMENTO

Data da avaliação: _____ Examinador: _____
Início do tratamento: _____ Tempo de tratamento: _____

História da Doença Atual

Queixa principal: _____

Situação atual: ☐ Em crise (*flare-up*) Local: _____
☐ Febre ☐ Dor ☐ Dificuldade no sono ☐ Diarreia ☐ Vômitos
☐ Outro: _____

Exame Físico

Peso: _____kg Altura: _____cm FC: _____bpm PA: _____mmHg

Ossificações: ☐ Pescoço ☐ Cabeça ☐ Costas ☐ MMSS ☐ MMII ☐ Bacia

Movimentos: ☐ Normais ☐ MMSS limitados ☐ MMII limitados ☐ Pescoço limitado
☐ Não se senta ☐ Anda com dificuldade ☐ Cadeira de rodas ☐ Acamado

Coluna: ☐ Normal ☐ Hipercifose ☐ Hiperlordose ☐ Escoliose

Boca: ☐ Normal ☐ Abertura limitada ☐ Travada

Audição: ☐ Normal ☐ Diminuída ☐ Surdez ☐ Usa prótese

Controle de Função Hepática (Tratamento com Epi)
(ALT – alanina aminotransferase / AST – aspartato aminotransferase)

Data: _____ ALT: _____ AST: _____ ☐ Não se aplica

Dados da Coleta de Material

Amostra: ☐ Sangue na heparina ☐ Sangue no RNAlater® ☐ Raspado de mucosa oral

Data: _____ Profissional: _____

2ª AVALIAÇÃO APÓS INÍCIO DO TRATAMENTO

Data da avaliação: _____ Examinador: _____
Início do tratamento: _____ Tempo de tratamento: _____

História da Doença Atual

Queixa principal: _____

Situação atual: ☐ Em crise (*flare-up*) Local: _____
☐ Febre ☐ Dor ☐ Dificuldade no sono ☐ Diarreia ☐ Vômitos
☐ Outro: _____

Exame Físico

Peso: _____kg Altura: _____cm FC: _____bpm PA: _____mmHg

Hálux: ☐ Valgo ☐ Curto ☐ Normal

Ossificações: ☐ Pescoço ☐ Cabeça ☐ Costas ☐ MMSS ☐ MMII ☐ Bacia

Movimentos: ☐ Normais ☐ MMSS limitados ☐ MMII limitados ☐ Pescoço limitado
☐ Não se senta ☐ Anda com dificuldade ☐ Cadeira de rodas ☐ Acamado

Coluna: ☐ Normal ☐ Hipercifose ☐ Hiperlordose ☐ Escoliose

Boca: ☐ Normal ☐ Abertura limitada ☐ Travada

Audição: ☐ Normal ☐ Diminuída ☐ Surdez ☐ Usa prótese

Controle de Função Hepática (Tratamento com Epi)
(ALT – alanina aminotransferase / AST – aspartato aminotransferase)

Data: _____ ALT: _____ AST: _____ ☐ Não se aplica

Dados da Coleta de Material

Amostra: ☐ Sangue na heparina ☐ Sangue no RNAlater® ☐ Raspado de mucosa oral

Data: _____ Profissional: _____

CAJIS e GONIOMETRIA (próxima página)

CAJIS e GONIOMETRIA

Incapacidade	**Sim**	**Não**
Caminha	☐	☐
Usa cadeira de rodas	☐	☐
Necessita de **alguma ajuda** nas Atividades de Vida Diária	☐	☐
Necessita de **total ajuda** nas Atividades de Vida Diária	☐	☐

	Afetado (1)*	**Funcionalmente anquilosado (2)***	**Goniometria**
Pescoço			FLX
Coluna torácica e lombar			
Mandíbula			
Ombro D			ABD
Ombro E			ABD
Cotovelo D			
Cotovelo E			
Punho D			
Punho E			
Quadril D			ABD
Quadril E			ABD
Joelho D			
Joelho E			
Tornozelo D			
Tornozelo E			
Subtotal			
Total			

*Considerar: 0 (zero) = mobilidade normal a déficit <10%; 1 (um) = déficit de 10%-90%; 2 (dois) = déficit ≥ 90%.

APÊNDICE D – Questionário semi-estruturado aplicado aos portadores de FOP participantes da pesquisa

QUESTIONÁRIO – PESQUISA FOP-UFMS

Data de preenchimento : Clique ou toque aqui para inserir uma data.

1. Nome: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
2. Documento (RG ou CPF): Clique ou toque aqui para inserir o texto.
3. Gênero: Escolher um item. 4. Data de Nascimento: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
5. Cidade/Estado: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
6. Telefone(s) para contato: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
7. E-mail: Clique ou toque aqui para inserir o texto.
8. Há quanto tempo você faz tratamento com FOPCON? Clique ou toque aqui para inserir o texto.
9. Qual FOPCON você tomou nos últimos 6 meses? Escolher um item.
   Outro: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

As crises de FOP ou *flare-ups* são episódios inflamatórios em que aparecem inchaços localizados e dolorosos em partes (tecidos) moles do corpo. As perguntas 10 a 18 são sobre essas crises.

10. Quando foi a sua última crise? Escolher um item.
11. Quantas crises de FOP você teve nos últimos 6 meses? Escolher um item.

Responda as perguntas 12 a 18 considerando as crises que você apresentou nos últimos 6 meses.

12. Qual o local acometido nessa(s) crise(s)? Clique ou toque aqui para inserir o texto.
13. Quais foram os principais sintomas de suas crises?

☐ Edema (inchaço) ☐ Dores localizadas
☐ Vermelhidão ☐ Calor local
☐ Rigidez da articulação ☐ Diminuição de movimentos

Outro: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

14. Considerando 10 (dez) para dor máxima ou insuportável, e 0 (zero) para nenhuma dor, que número representa melhor a dor que você sente durante uma crise?

Nota: Escolher um item.

15. A(s) crise(s) de FOP que você apresentou nos últimos 6 meses pode(m) estar associada(s) a alguma(s) das situações abaixo?

☐ Estresse emocional (ex.: mudança de rotina, perda de parentes, felicidade ou tristeza extrema...)
☐ Traumas físicos (ex.: quedas, contusões...)
☐ Vacinas ou injeções
☐ Infecção ou síndrome viral (ex.: gripe, resfriado, Covid-19, dengue...)
☐ Cirurgias
☐ Uso excessivo dos braços ou pernas (ex.: trabalho intenso ou prática de esporte)
☐ Interrupção do FOPCON.
☐ As crises foram espontâneas

16. Você teve alguma sequela após a(s) crise(s)? Escolher um item.

Para outra sequela, especifique: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

17. Você parou de tomar FOPCON durante a crise? Escolher um item.

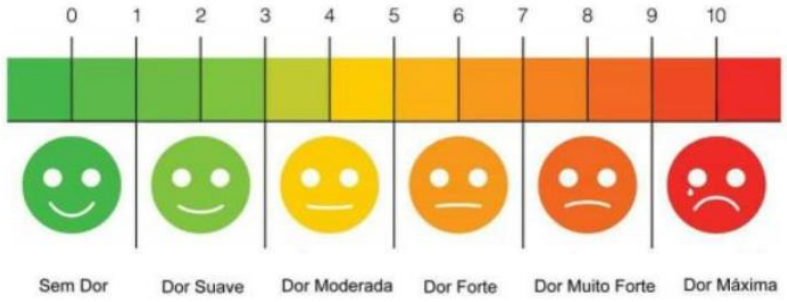
18. Você tomou outro remédio durante a crise? Escolher um item.

Se sim, qual remédio você tomou? Clique ou toque aqui para inserir o texto.

19. Nos últimos 6 meses, como você tomou FOPCON? Escolher um item.

20. Você sente dores no corpo mesmo sem estar em crise da FOP (*flare-up*)? Escolher um item.

21. Se sim, considerando 10 para dor máxima, insuportável e 0 (zero) para nenhuma dor, que número representa melhor a dor que você sente?



Nota: Escolher um item.

22. Você tem dificuldades para dormir? Escolher um item.

23. Se sim, o que você acha que atrapalha o seu sono? Escolher um item.

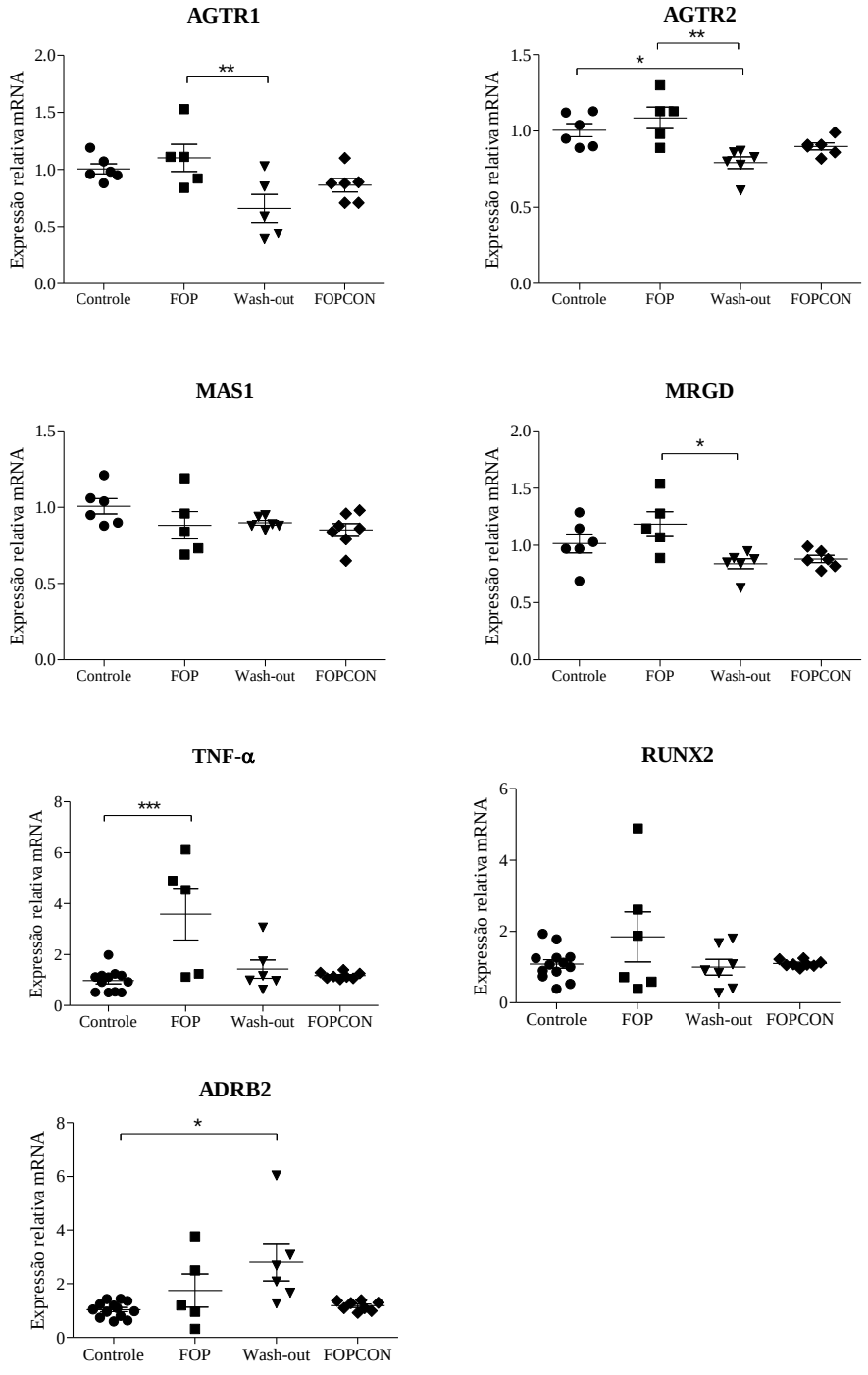
Se outro motivo, especifique: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

24. Como você considera a evolução da sua FOP nos últimos 6 meses? Escolher um item.

Explique: Clique ou toque aqui para inserir o texto.

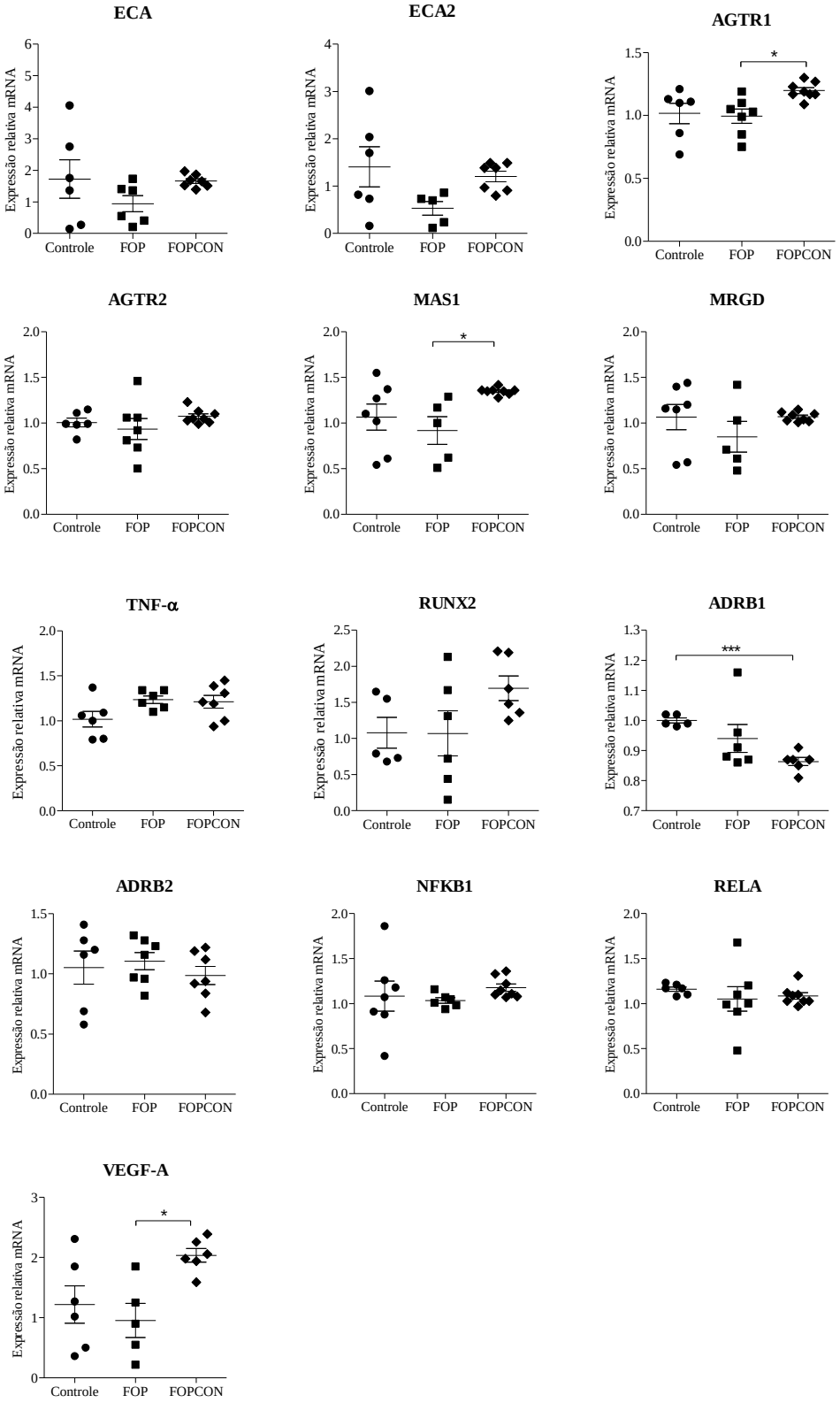
Muito obrigado por sua participação.
Equipe FOP - UFMS

APÊNDICE F – Gráficos *dot plot* da expressão gênica relativa de mRNA dos genes alvos em células epiteliais da boca. Asteriscos correspondem ao pós-teste.



Fonte: Dados da pesquisa (2023). Anova com pós-teste Bonferroni ou Kruskal-Wallis com pós-teste Dunn.*p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001.

APÊNDICE G – Gráficos *dot plot* da expressão gênica relativa de mRNA dos genes alvos em leucócitos totais. Asteriscos correspondem ao pós-teste.



Fonte: Dados da pesquisa (2023; 2024). ANOVA (pós-teste Bonferroni) e Kruskal-Wallis (pós-teste Dunn. *p<0,05; **p=0,001 a 0,01; ***p<0,001

ANEXOS

ANEXO A – Regulamento do Biorrepositório

REGULAMENTO PARA O BIORREPOSITÓRIO DO LABORATÓRIO DE DIAGNÓSTICO MOLECULAR EM PEDIATRIA

1. INFORMAÇÕES GERAIS

Este regulamento destina-se à constituição e adequado funcionamento de Biorrepositório para o armazenamento de amostras biológicas humanas referentes ao estudo da Fibrodisplasia Ossificante Progressiva. Seu detalhamento técnico segue as recomendações determinadas pela Resolução n° 441/2011, do Conselho Nacional de Saúde, bem como as determinadas pela Resolução n° 240, de 18 de setembro de 2017, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

2. DEFINIÇÕES

Para os efeitos deste regulamento, consideram-se:

- Biorrepositório: coleção de material biológico humano, coletado e armazenado durante a execução de um projeto de pesquisa específico, conforme regulamento ou normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sob responsabilidade institucional e gerenciamento do pesquisador, sem fins comerciais.
- Participante da pesquisa: aquele que, de forma esclarecida, livre e autônoma, consente em participar de pesquisas, atuais ou potenciais, envolvendo o armazenamento de seu material biológico em biobancos ou biorrepositórios.
- Material biológico humano: espécime, amostras e alíquotas do material original e seus componentes fracionados.

3. IDENTIFICAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

- Nome do Projeto: Aspectos clínicos, bioquímicos e moleculares em portadores de Fibrodisplasia Ossificante Progressiva antes e depois do tratamento com Ácido Ascórbico, Propranolol, Hesperidina e Epigalocatequina.
- Pesquisador Responsável: Durval Batista Palhares (e-mail: dbpalhares@hotmail.com)
- Equipe de Pesquisadores: Ana Lígia Barbosa Messias; Lorena Falcão Lima; Suzana Lopes Bomfim Balaniuc; Paula Cristhina Niz Xavier; Almir de Sousa Martins; Deborah Ribeiro Nascimento; Iandara Schettert Silva; Liane de Rosso Giuliani; Marilene Garcia Palhares;
- Localização física: Laboratório de Diagnóstico Molecular em Pediatria, localizado no prédio da FAMED – Faculdade de Medicina, Unidade 9 da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, sito à Av. Costa e Silva, s/n, Cidade Universitária, bairro Pioneiros, Campo Grande/MS, CEP 79070-900.

4. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Serão coletadas de todos os grupos:

- amostras de células mononucleares e plasma a partir de sangue periférico;
- e amostras de raspado de mucosa oral em *swab*.

5. PROCEDIMENTOS OPERACIONAIS

5.1. Coletas de sangue periférico

Serão obtidas por meio de punção venosa periférica no dorso de uma das mãos dos participantes. As amostras serão coletadas em tubos *vacuntainer* heparinizados e separadas em três partes:

- uma parte em microtubos de 1,5 mL previamente preenchidos com alíquotas de 800 µl de estabilizador de ácidos nucleicos (Ambion™, RNAlater®), e mantidas a 4°C por até 24 horas antes do seu processamento (experimento *in vitro*). Em seguida, serão armazenadas em freezer a -20°C até o momento da etapa seguinte.
- uma parte em tubos *ependorf* de 2,0 mL, preenchidos previamente com alíquotas de 800µl de estabilizador de ácidos nucleicos (Ambion™, RNAlater®), e armazenadas em freezer a -20°C até o seu processamento.
- uma parte será centrifugada (10 minutos a 10.000 rpm) para separação do plasma e armazenadas em freezer a -20°C até o seu processamento.

5.2. Amostra do raspado de mucosa oral

Será obtida por rolagem de *swab* seco estéril, de baixo para cima e vice-versa no lado interno de cada bochecha, sendo um *swab* para cada lado da bochecha, alcançando sulcos próximos da gengiva. A extremidade do *swab* com a amostra será cortada com bisturi ou tesoura esterilizada, diretamente para um microtubo previamente preenchido com 500 µL de estabilizador de ácidos nucleicos (Ambion™, RNAlater®). O microtubo com a amostra será agitado e congelado a -86°C até o seu processamento.

5.3. Todas as amostras serão armazenadas conforme critérios estabelecidos no protocolo de Biorrepositório da UFMS (Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017).

6. GERENCIAMENTO

6.1. O gerenciamento do Biorrepositório ficará a cargo do pesquisador responsável, coordenador dos projetos de pesquisa vinculados a este.

6.2. O monitoramento do Biorrepositório será de responsabilidade do pesquisador responsável e demais colaboradores.

6.3. O Biorrepositório será constituído por um freezer de -20°C e um freezer de -80°C, equipados com cilindros de CO_2.

6.4. As amostras ficarão sob custódia do pesquisador responsável, e demais colaboradores e orientados, conforme projeto de pesquisa. Os Termos de Consentimento e/ou Assentimento Livre e Esclarecido serão arquivados nas versões física e eletrônica (escaneados), em pastas de acesso restrito ao pesquisador responsável e demais pesquisadores arrolados aos respectivos projetos de pesquisa.

6.5. As amostras serão codificadas apenas por números e a chave de ligação entre números e nomes de pacientes será armazenada em programa de computador protegido por senha, restrita ao pesquisador responsável (orientador), aos pesquisadores arrolados aos projetos de pesquisa (orientados) e ao profissional técnico do laboratório designado para auxiliar o orientado em seu respectivo projeto. A identificação das alíquotas poderá ser acrescida de letras, com a exclusiva finalidade de permitir distinção entre grupo controle e grupos de tratamento.

6.6. O tempo de armazenamento das amostras respeitará o determinado no item 8 deste regulamento.

6.7. No caso de destruição das amostras, após a realização dos procedimentos, o material biológico será submetido a tratamento esterilizador com hipoclorito de sódio puro por 24 horas, e descartado em excipiente apropriado, seguindo o protocolo do Programa Nacional de Controle de Qualidade que atende ao DICQ (Departamento de Inspeção e Credenciamento da Qualidade) da Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC).

7. Direitos dos participantes de pesquisa

7.1. O material biológico humano armazenado no Biorrepositório é do participante da pesquisa, permanecendo sua guarda sob a responsabilidade institucional;
7.2. O participante da pesquisa, ou seu representante legal, a qualquer tempo e sem quaisquer ônus ou prejuízos, poderá retirar o consentimento de guarda e utilização do material biológico armazenado no Biorrepositório, valendo a desistência a partir da data de formalização desta;
7.3. A retirada do consentimento deverá será formalizada por manifestação, por escrito e assinada, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, cabendo-lhe a devolução das amostras existentes se este for seu desejo;
7.4. O participante da pesquisa deverá ser informado sobre a perda ou destruição de suas amostras biológicas, bem como sobre o encerramento do Biorrepositório, quando for o caso; e
7.5. O participante da pesquisa será informado sobre a impossibilidade de patenteamento ou a utilização comercial de material biológico humano armazenado no Biorrepositório.

8. Tempo de armazenamento

As amostras serão armazenadas pelo tempo estimado da pesquisa, de 4 (quatro) anos, a contar da data da aprovação deste regulamento pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/UFMS. Poderá haver renovação do período estabelecido no projeto por mais cinco anos mediante solicitação justificada do pesquisador responsável, acompanhada do relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material até esta etapa, e de acordo com um novo cronograma para o projeto de pesquisa submetido ao CEP Institucional (Resolução nº 240, de 18 de setembro de 2017, UFMS), não ultrapassando o prazo de 10 anos (Resolução CNS Nº 441, de 12 de maio de 2011).

9. Destinação das amostras ao final do período de realização da pesquisa

Ao final da pesquisa, o material biológico humano poderá permanecer armazenado, se em conformidade com as normas pertinentes do CNS; ser transferido formalmente para outro Biorrepositório, mediante aprovação do CEP Institucional; ou, será descartado, conforme normas vigentes de órgãos técnicos competentes, e de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), respeitando-se a confidencialidade e a autonomia do participante da pesquisa.

10. Considerações finais

Este regulamento entra em vigor a partir de sua data de aprovação pelo CEP Institucional.

Assinatura do Pesquisador Responsável: Durval Batista Palhares
Campo Grande, 08 de maio de 2021.

ANEXO B – Estadiamento clínico da FOP (Clinical staging of FOP), segundo Pignolo e Kaplan (2018)

Clinical stages of FOP.

		Clinical stages				
		Early/mild	Moderate	Late/severe	Profound	End-stage
Features*	Flare-ups	No history of flare-ups, or if present, limited to scalp, neck, or back	History of flare-ups mostly limited to axial regions and upper limbs	History of flare-ups in any location	History of flare-ups in any location	History of flare-ups in any location
	Body regions affected	Neck, back, upper limbs	Neck, back, chest, upper and lower limbs	Neck, back, chest, upper and lower limbs; jaw	Neck, back, chest, upper and lower limbs, jaw and distal limbs (wrists and ankles)	Ankyloses of most or all joints
	Thoracic insufficiency		Limited chest expansion	Rigid chest wall; no chest expansion; diaphragmatic breathing	Symptomatic thoracic insufficiency syndrome (pulmonary hypertension and right-sided heart failure)**	Symptomatic thoracic insufficiency syndrome (pulmonary hypertension and right-sided heart failure)**
	Other complications				Pneumonia; pressure ulcers	Recurrent respiratory infections
	ADLs	No or minimal assistance required due to mild joint limitations or physical delay in developmental milestones	Some assistance required	Assistance needed for most activities	Dependent for all ADLs	Dependent for all ADLs
	Ambulation	Unaffected or cannot evaluate due to very young age	Walks; May use wheelchair in extenuating circumstances (e.g., long distances)	Walks with assistive device and/or uses wheelchair	Wheelchair-bound	Mostly bed-bound
	CAJIS	≤4	5–18	19–24	≥24	≥28

* Features may appear at any stage, but are presented in a typical or common sequence. Features for any stage are assumed to also include those of the preceding stage(s).
** When symptomatic thoracic insufficiency syndrome is present in a younger individual (e.g., in the case of substantial scoliosis or poor chest expansion for any reason) criteria for ADLs, ambulation, and CAJIS score may not apply.

ANEXO C – Cumulativa Analogue Joint Scale (CAJIS), para avaliação de funcionalidade, segundo Kaplan, Al Mukaddam e Pignolo (2017).

CAJIS Recording Template

Name:_____

DOB:_____ **Age:** _____

Date: _____

Disability: Walks: _____
Uses wheelchair: _____
Needs **some** assistance with activities of daily living:_____
Needs **complete assistance** with activities of daily living:_____

	Affected (1)	**Functionally ankylosed (2)**	
Neck			
Thoracic & lumbar spine			
Jaw			
R shoulder			
L shoulder			
R elbow			
L elbow			
R wrist			
L wrist			
R hip			
L hip			
R knee			
L knee			
R ankle			
L ankle			
TOTAL			

SUMMATION