

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**FACULDADE DE MEDICINA**

Ygor Gabriel Fonseca

**EXPANSÃO DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
AMELOBLASTOMA ADENOIDE UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA  
GERAÇÃO DE UM PAINEL DE ONCOGENES E GENES SUPRESSORES DE  
TUMOR**

Belo Horizonte

2025

Ygor Gabriel Fonseca

**EXPANSÃO DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO  
AMELOBLASTOMA ADENOIDE UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA  
GERAÇÃO DE UM PAINEL DE ONCOGENES E GENES SUPRESSORES DE  
TUMOR**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Medicina Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Dra. Letícia Martins Guimarães

Belo Horizonte

2025

Fonseca, Ygor Gabriel.  
F676e Expansão da caracterização molecular do Ameloblastoma Adenoide utilizado sequenciamento de nova geração de um painel de Oncogenes e Genes supressores de tumor [recurso eletrônico]. / Ygor Gabriel Fonseca. -- Belo Horizonte: 2025.  
46f.: il.  
Formato: PDF.  
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.  
Coorientador (a): Leticia Martins Guimarães.  
Área de concentração: Medicina Molecular.  
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Ameloblastoma. 2. Tumor Odontogênico Escamoso. 3. beta Catenina. 4. Proteínas Proto-Oncogênicas B-raf. 5. Genes ras. 6. Via de Sinalização Wnt. 7. Dissertação Acadêmica. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Guimarães, Leticia Martins. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: WU 280

Bibliotecário responsável: Fabian Rodrigo dos Santos CRB-6/2697



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

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Às nove horas do dia doze de dezembro de dois mil e vinte e cinco na sala 311, CAD 1/ Campus Pampulha, Avenida Antônio Carlos, nº 6627, Pampulha, BH, MG, realizou-se a sessão pública para a defesa de Dissertação de **YGOR GABRIEL FONSECA**, inscrição 2024701889. A presidência da sessão coube a Profa. Carolina Cavalieri Gomes (UFMG), orientadora. Inicialmente, o presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Profa. Leticia Martins Guimarães (UFMG)-Coorientadora, Profa. Marina Gonçalves Diniz (ICB/UFMG) e Prof. Renato Santana de Aguiar (ICB/UFMG). Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua **Dissertação de Mestrado**, intitulada: **EXPANSÃO DA CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO AMELOBLASTOMA ADENOIDE UTILIZANDO SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO DE UM PAINEL DE ONCOGENES E GENES SUPRESSORES DE TUMOR**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar **aprovado a Dissertação de Mestrado**. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, o presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 12 de dezembro de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 16/12/2025, às 15:25, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavalieri Gomes, Professora do Magistério Superior**, em 16/12/2025, às 17:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 17/12/2025, às 11:40, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Leticia Martins Guimarães, Professora Magistério Superior-Substituta**, em 22/12/2025, às 16:56, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador 4790902 e o código CRC 924A3404.

---

Dedico este trabalho aos meus familiares e amigos, que caminham ao meu lado, e aos meus mestres, que iluminaram o caminho. Minha eterna gratidão.

## AGRADECIMENTOS

No limiar desta conquista, meu coração transborda gratidão. Este trabalho é o resultado da soma de todo apoio, amor e orientação que recebi de muitos.

Aos meus pais, Soledade e Geraldo, meus alicerces, meu porto seguro. Vocês são a origem de tudo. Obrigado por acreditarem em mim antes mesmo que eu acreditasse, por cada sacrifício silencioso e por me ensinarem que, com dedicação, qualquer sonho é alcançável. Esta vitória é, acima de tudo, de vocês.

À minha irmã, Bruna, minha eterna cúmplice e amiga. Obrigado pelo apoio em todos os meus dias, pelas palavras de incentivo e por ser a inspiração que sempre me motiva.

À toda minha família e aos meus amigos, família do coração, que compartilham a vida comigo e celebram cada vitória alcançada. Vocês são meu refúgio e minha força, lembrando-me de que a vida é muito melhor com vocês.

À minha orientadora, Profa. Carolina Gomes, agradeço pela confiança, pela paciência e pela condução magistral. Sua sabedoria, rigor científico e direcionamento foram a bússola que me guiou nesta jornada acadêmica.

À minha coorientadora, Dra. Leticia Guimarães, minha gratidão pela parceria, pelas contribuições cruciais e pelo olhar atento que tanto enriqueceu esta pesquisa.

Ao amigo e mestre Dr. Victor Bastos, por ser uma referência. Seus conselhos transcenderam a academia e sua amizade é um pilar fundamental nesta trajetória.

Ao Dr. Rennan Moreira, pelo apoio técnico crucial ao desenvolvimento deste trabalho. Ao Prof. Renato Santana, por ter possibilitado a realização do sequenciamento de nova geração no projeto. Às minhas amigas do Laboratório de Biologia Integrativa: Josiane, Flávia e Isadora. Vocês fizeram essa etapa mais leve e aprazível. Agradeço pela ajuda mútua, pelos cafés, pelas risadas e por transformarem o ambiente de trabalho em um lugar de verdadeira colaboração.

À agência de fomento CAPES, pela concessão da minha bolsa de mestrado.

Por fim, e fundamentalmente, a Deus, o Grande Arquiteto de tudo. Pela força nos momentos de fraqueza, pela clareza nos momentos de dúvida e por me permitir trilhar este caminho. Sem a Sua presença, nada disso seria possível.

A todos vocês, minha eterna gratidão.

"Quando uma criatura humana desperta para um grande sonho e sobre ele lança toda a força de sua alma, todo o Universo conspira a seu favor." (Johan Wolfgang von Goethe)

## RESUMO

O ameloblastoma adenoide (AA) é um tumor odontogênico epitelial raro, caracterizado microscopicamente por epitélio semelhante ao do ameloblastoma, estruturas ductiformes, estruturas moruliformes, arquitetura cribriforme, frequentemente apresentando deposição de matriz dentinoide, células claras e queratinização focal com presença de células fantasmas. O tumor apresenta genótipo selvagem para *BRAF* e *KRAS*. A ativação da via de sinalização Wnt/beta-catenina ocorre no AA, explicada principalmente por mutações no gene *CTNNB1* descritas em 25% dos casos investigados. O presente estudo teve como objetivo expandir a caracterização genética do AA por meio da investigação de variantes em 22 oncogenes e genes supressores de tumor comumente mutados em tumores sólidos. Seis amostras de AA foram sequenciadas por meio de sequenciamento de nova geração utilizando um painel de 22 genes, incluindo *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ESR1*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, *KIT*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RAF1*, *RET* e *TP53*. Mutações no *CTNNB1* foram identificadas em 4 dos 6 casos (67%), incluindo variantes já descritas (p.Ser33Cys e p.Gly34Arg), bem como novas variantes (p.Leu31Leu e p.Gln68\*), reforçando o envolvimento da via de sinalização Wnt/beta-catenina na patogênese do AA. Em dois casos, variantes em *CTNNB1* coocorreram com variantes em *TP53* ou em *ERBB2* e *PIK3CA*, sugerindo possíveis eventos oncogênicos secundários. Reforçando a identidade molecular distinta do AA em relação ao ameloblastoma e ao tumor odontogênico adenomatoide, observou-se ausência das mutações *BRAF* p.Val600Glu e *KRAS* p.Gly12Val/Arg, recorrentes nas entidades citadas. Notavelmente, em dois dos seis casos, nenhuma variante foi detectada. Nossos achados fornecem mais evidências para a classificação do AA como uma entidade tumoral distinta do ameloblastoma convencional. A identificação de variantes previamente descritas em *CTNNB1*, bem como de novas variantes genéticas, contribui para uma melhor caracterização do perfil molecular do AA. Estudos futuros são necessários para investigar variantes em outros genes nos casos com genótipo selvagem.

**Palavras-chave:** ameloblastoma adenoide; tumor odontogênico; *CTNNB1*; *BRAF*; *KRAS*; via Wnt/beta-catenina.

## ABSTRACT

### **Expanding the molecular characterization of adenoid ameloblastoma using next-generation sequencing of a panel of oncogenes and tumor suppressor genes.**

Adenoid ameloblastoma (AA) is a rare epithelial odontogenic tumor characterized microscopically by ameloblastoma-like epithelium, duct-like structures, moruliform structures, and cribriform architecture, frequently presenting with dentinoid matrix deposition, clear cells, and focal keratinization with the presence of ghost cells. The tumor harbors a wild-type genotype for *BRAF* and *KRAS*. Activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway occurs in AA, primarily attributed to *CTNNB1* gene mutations, which have been described in 25% of investigated cases. This study aimed to expand the genetic characterization of AA by investigating variants in 22 oncogenes and tumor suppressor genes commonly mutated in solid tumors. Six AA samples were sequenced via next-generation sequencing (NGS) using a 22-gene panel, including *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ESR1*, *FOXL2*, *GNAI1*, *GNAQ*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, *KIT*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RAF1*, *RET*, and *TP53*. *CTNNB1* mutations were identified in 4 of the 6 cases (67%), including previously described variants (p.Ser33Cys and p.Gly34Arg) as well as novel variants (p.Leu31Leu and p.Gln68\*), reinforcing the involvement of the Wnt/beta-catenin signaling pathway in AA pathogenesis. In two cases, *CTNNB1* variants co-occurred with variants in *TP53* or in *ERBB2* and *PIK3CA*, suggesting potential secondary oncogenic events. Reinforcing the distinct molecular identity of AA compared to ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor, the absence of *BRAF* p.Val600Glu and *KRAS* p.Gly12Val/Arg mutations - recurrent in the aforementioned entities - was observed. Notably, no variants were detected in two cases. Our findings provide further evidence for the classification of AA as a distinct tumor entity. The identification of previously described *CTNNB1* variants, as well as novel genetic variants, contributes to a better characterization of the molecular profile of AA. Future studies are needed to investigate variants in other genes in cases with a wild-type genotype.

**Keywords:** adenoid ameloblastoma; odontogenic tumor; *CTNNB1*; *BRAF*; *KRAS*; Wnt/beta-catenin pathway.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Critérios histopatológicos de diagnóstico do ameloblastoma adenoide de acordo com a 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde. ....	21
<b>Figura 2.</b> Via de sinalização canônica Wnt/beta-catenina em sua forma ativa e inativa.....	25
<b>Figura 3.</b> Características microscópicas do ameloblastoma adenoide.....	34
<b>Figura 4.</b> Variantes do gene <i>CTNNB1</i> detectadas em ameloblastoma adenoide.....	37

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Informações clínicas, histológicas e moleculares dos casos de ameloblastoma adenoide selecionados .....	32
<b>Tabela 2.</b> Dados moleculares dos casos de ameloblastoma adenoide para os quais foram detectadas variantes patogênicas e resultados das análises <i>in silico</i> .....	35
<b>Tabela 3.</b> Informações de sequenciamento e qualidade de mapeamento das amostras de ameloblastoma adenoide.....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

AA – Ameloblastoma Adenoide

*AKT1 – AKT Serine/Threonine Kinase 1*

*ALK – ALK Receptor Tyrosine Kinase*

*APC – Adenomatous Polyposis Coli*

*BRAF – B-Raf Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*

*CCND1 – Cyclin D1*

*CDKN1A – Cyclin Dependent Kinase Inhibitor 1A*

ChIP-Seq – *Chromatin Immunoprecipitation Sequencing*

*CK1 $\alpha$  – Casein Kinase 1 Alpha*

COSMIC – *Catalogue of Somatic Mutations in Cancer*

*CTNNB1 – Catenin Beta 1*

ctDNA – DNA Tumoral Circulante

*DKK1 – Dickkopf Wnt Signaling Pathway Inhibitor 1*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

*EGFR – Epidermal Growth Factor Receptor*

*ERBB2 – Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2*

*ERBB3 – Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 3*

*ESR1 – Estrogen Receptor 1*

FFPE – *Formalin-Fixed Paraffin-Embedded*

*FOXL2 – Forkhead Box L2*

FZD – *Frizzled*

gDNA – DNA Genômico

*GNAI1 – G Protein Subunit Alpha 11*

*GNAQ – G Protein Subunit Alpha Q*

*GSK-3 $\beta$  – Glycogen Synthase Kinase 3 Beta*

*IDH1 – Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 1, Cytosolic*

*IDH2 – Isocitrate Dehydrogenase (NADP(+)) 2, Mitochondrial*

*IGV – Integrative Genomics Viewer*

*IHQ – Imuno-histoquímica*

*KIT – KIT Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*

*KRAS – KRAS proto-oncogene, GTPase*

*LRP5/6 – Low-density lipoprotein receptor-related protein 5/6*

*MAPK – Mitogen-Activated Protein Kinase*

*Metil-Seq – Methylome Sequencing*

*MET – MET Proto-Oncogene, Receptor Tyrosine Kinase*

*mRNA – RNA Mensageiro*

*MYC – MYC Proto-Oncogene, bHLH Transcription Factor*

*NGS – Next-Generation Sequencing*

*NRAS – Neuroblastoma RAS Viral Oncogene Homolog*

*OMS – Organização Mundial de Saúde*

*pb – Pares de base*

*PDGFRA – Platelet Derived Growth Factor Receptor Alpha*

*PIK3CA – Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha*

*qPCR – Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa*

*RAF1 – Raf-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase*

*RET – Ret Proto-Oncogene*

*RNA – Ácido Ribonucleico*

RNA-Seq – Sequenciamento de RNA

SBS – *Sequencing by Synthesis*

SFRPs – *Secreted Frizzled-Related Proteins*

SIFT – *Sorting Intolerant from Tolerant*

SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*

TCF/LEF – *T-Cell Factor/Lymphoid Enhancer Factor*

TCGA – *The Cancer Genome Atlas*

TMB – *Tumor Mutational Burden*

TP53 – *Tumor Protein P53*

Beta-TrCP – *Beta-Transducin Repeat Containing Protein*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

UMI – *Unique Molecular Index*

VAF – *Variant Allele Frequency*

WES – *Whole Exome Sequencing*

WGS – *Whole Genome Sequencing*

Wnt – *Wingless-related integration site*

WT – *Wild-Type*

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	19
2.1 Ameloblastoma Adenoide .....	19
2.2 Via de sinalização Wnt/beta-catenina.....	24
2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS).....	26
3 OBJETIVOS.....	29
3.1 Objetivo geral .....	29
3.2 Objetivos específicos .....	29
4 METODOLOGIA.....	29
4.1 Aspectos éticos .....	29
4.2 Isolamento de gDNA e preparo de bibliotecas .....	30
4.3 Sequenciamento de nova geração .....	30
5 RESULTADOS .....	31
5.1 Caracterização das amostras .....	31
5.2 Sequenciamento de nova geração e análises <i>in silico</i> .....	35
6 DISCUSSÃO.....	38
7 CONCLUSÃO.....	42
REFERÊNCIAS .....	43
APÊNDICE A .....	46

## 1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma adenoide (AA) é um tumor odontogênico epitelial recentemente reconhecido como uma entidade distinta e classificado na 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS) (LOYOLA *et al.*, 2015; THAVARAJ; BILODEAU, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Foram estabelecidos critérios diagnósticos essenciais e desejáveis para o diagnóstico de AA. As características histopatológicas essenciais para o diagnóstico de AA incluem a presença de um componente epitelial semelhante ao ameloblastoma, estruturas semelhantes a ductos, condensações moruliformes e arquitetura cribriforme (THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Os critérios diagnósticos desejáveis incluem a presença de depósitos de matriz dentinoide, agrupamentos de células claras e queratinização focal com presença de células fantasma (THAVARAJ; BILODEAU, 2023).

Considerando a sobreposição histopatológica entre o AA e outros tumores odontogênicos, incluindo o ameloblastoma, o tumor odontogênico adenomatoide e o tumor dentinogênico de células fantasma, a patogênese molecular do AA foi investigada, principalmente por meio de sequenciamento direto de genes alvo (BILODEAU; SEETHALA, 2019; COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023; KHALAJ *et al.*, 2023; NODA *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). A ocorrência da mutação *BRAF* p.Val600Glu, considerada uma assinatura mutacional para o ameloblastoma (KURPPA *et al.*, 2014), foi investigada no AA. Primeiramente, observou-se imunopressão negativa de *BRAF* Val600Glu em uma coorte de 3 amostras de AA (BILODEAU; SEETHALA, 2019). Posteriormente, Coura e colaboradores avaliaram o status mutacional do gene *BRAF* em 9 casos de AA por PCR quantitativo (qPCR) alelo-específico, demonstrando genótipo selvagem para *BRAF* p.Val600Glu (COURA *et al.*, 2021). Subsequentemente, outros grupos avaliaram o status mutacional do *BRAF* utilizando imunohistoquímica, sequenciamento de Sanger e sequenciamento de nova geração (NGS) (BILODEAU; SEETHALA, 2019; COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023; KHALAJ *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Em conjunto, os resultados parecem convergir para o fato de o AA não apresentar mutação *BRAF* p.Val600Glu (BILODEAU; SEETHALA, 2019; COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022; OH; HONG; YOON, 2023; KHALAJ *et al.*, 2023), com apenas um estudo relatando dois casos com resultado positivo para a mutação, o que requer validação adicional (XUE *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

A presença de estruturas ductiformes e arquitetura cribriforme levanta a possibilidade de semelhança com o tumor odontogênico adenomatoide. Nosso grupo demonstrou que as mutações no códon 12 do *KRAS*, um evento genético prevalente no tumor odontogênico adenomatoide (GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019), estão ausentes no AA (COURA *et al.*, 2021). Tais resultados foram confirmados por estudos adicionais (BASTOS *et al.*, 2022; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023). Juntamente com a aparente ausência de mutações no *BRAF*, esses achados sugerem que o AA é molecularmente distinto tanto do ameloblastoma quanto do tumor odontogênico adenomatoide (COURA *et al.*, 2021).

Mutações no *CTNNB1* estão associadas à formação de células fantasma em lesões odontogênicas e não odontogênicas. Dada a falta de identificação de uma provável assinatura molecular para o AA, juntamente com a potencial presença de agrupamentos de células fantasma neste tumor, mutações no *CTNNB1* foram avaliadas no AA (BASTOS *et al.*, 2022). Utilizando uma combinação de imuno-histoquímica e sequenciamento de Sanger, nosso grupo descreveu mutações no éxon 3 do *CTNNB1* em 4/9 casos de AA (BASTOS *et al.*, 2022). Considerando os resultados do nosso estudo e de outros grupos, mutações no *CTNNB1* foram relatadas em um total de 6/24 casos (25%), com frequências que variam de 7,6% a 50% em três estudos independentes (BASTOS *et al.*, 2022; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Além disto, mutação no gene *APC* foi descrita em 1/2 casos de AA (XUE *et al.*, 2023). Os genes *CTNNB1* e *APC* são ambos componentes da via de sinalização Wnt/beta-catenina. Permanece desconhecido se os casos com genótipo selvagem para *CTNNB1* e *APC* apresentam outras alterações genéticas.

O objetivo deste projeto foi expandir a avaliação de variantes genéticas no AA empregando um painel de NGS que cobre mutações em 22 genes comumente mutados em tumores sólidos. Adicionalmente, dado o maior poder da tecnologia de NGS para identificar variantes raras com frequências alélicas mais baixas em comparação com qPCR alelo-específico e sequenciamento de Sanger, foi possível reavaliar o status das mutações *hotspot* no códon 12 do gene *KRAS*, *BRAF* p.Val600Glu e no éxon 3 do *CTNNB1* em casos investigados anteriormente (COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022).

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Ameloblastoma Adenoide

A compreensão da patogênese molecular dos tumores, particularmente em neoplasias complexas e raras como os tumores odontogênicos, tem sido profundamente transformada pelos avanços na patologia molecular e nas tecnologias genômicas. O conhecimento detalhado de vias de sinalização celular cruciais, como a via Wnt/beta-catenina, juntamente com o poder de resolução oferecido pelo sequenciamento de nova geração está remodelando a pesquisa oncológica. Esta remodelação abrange desde a descoberta de mecanismos fundamentais subjacentes ao desenvolvimento tumoral até a identificação de biomarcadores diagnósticos, prognósticos e alvos terapêuticos (SACHDEV *et al.*, 2021).

Os tumores odontogênicos, um grupo heterogêneo de lesões derivadas de remanescentes do epitélio odontogênico, do ectomesênquima ou de ambos, embora frequentemente benignos, podem exibir um comportamento localmente agressivo e apresentar altas taxas de recorrência. Tal comportamento torna imperativo o aprofundamento nos seus mecanismos moleculares para otimizar as estratégias de diagnóstico e tratamento.

O reconhecimento de características adenoides em ameloblastomas remonta a meados do século XX, com Waldron (1959) sendo um dos primeiros a descrevê-las. Posteriormente, o termo "Ameloblastoma Adenoide" foi utilizado por Brannon em 1994 (BRANNON, 1994 *apud* ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Contudo, foi apenas recentemente, na 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS, que o AA foi classificado como um tipo tumoral distinto, e não um subtipo de ameloblastoma (THAVARAJ; BILODEAU, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Esta decisão baseou-se em um conjunto crescente de evidências que apontavam para diferenças histopatológicas, posteriormente confirmadas em nível molecular (LOYOLA *et al.*, 2015; ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; BILODEAU; SEETHALA, 2019; COURA *et al.*, 2021; THAVARAJ; BILODEAU, 2023).

A nomenclatura do AA foi mantida devido ao seu uso já estabelecido na literatura, embora a OMS não o considere mais um subtipo de ameloblastoma convencional, mas sim uma entidade independente (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Esta distinção é fundamental, pois implica diferentes considerações patogênicas. Apesar do consenso crescente, a classificação do AA não é isenta de controvérsias. Alguns autores ainda debatem se o AA seria melhor classificado como um subtipo raro de ameloblastoma ou mesmo um tumor híbrido, dada a sobreposição de algumas características com outros tumores odontogênicos (ODELL;

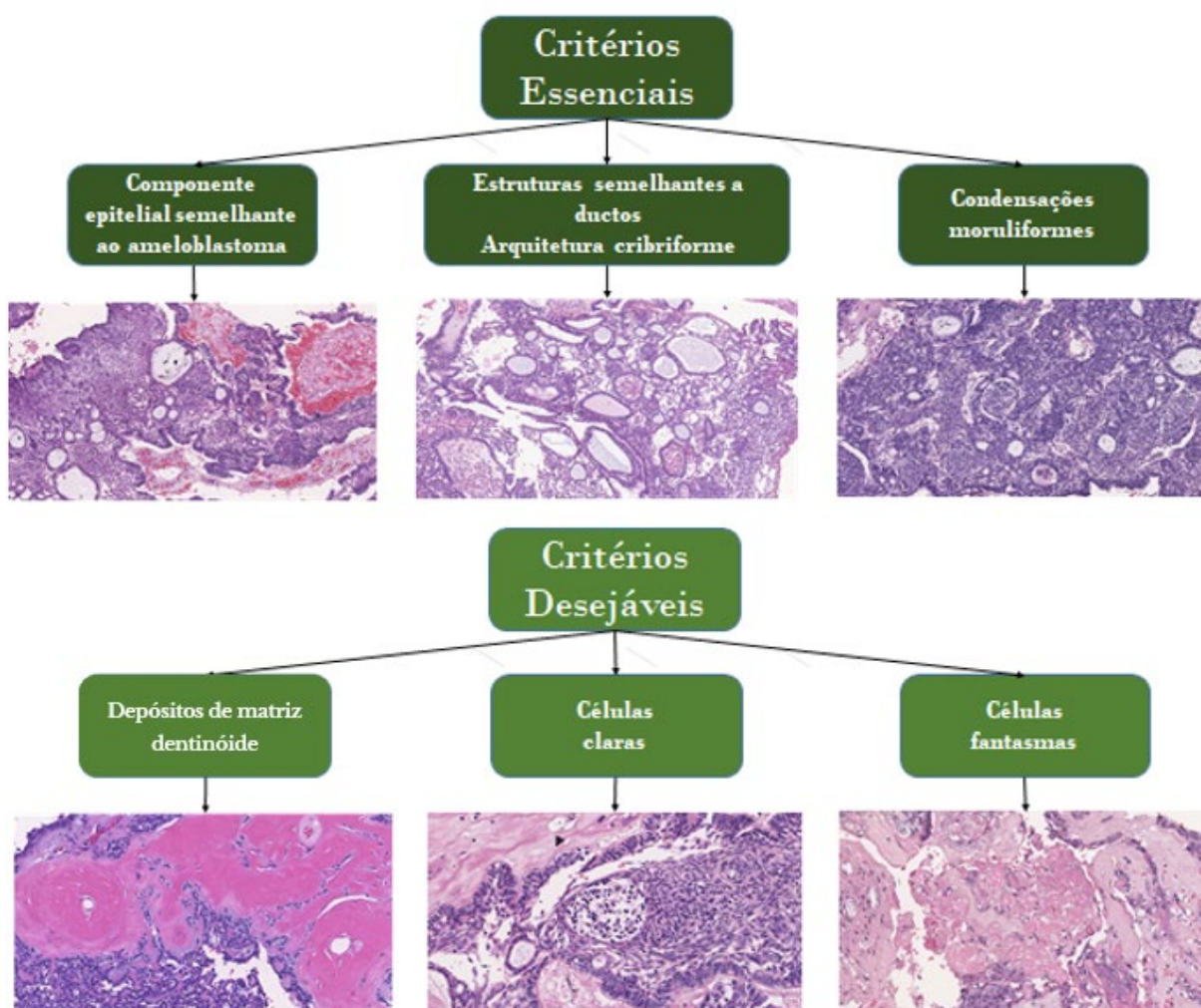
GOMES; THAVARAJ, 2024). Tais debates reforçam a importância da aplicação rigorosa dos critérios diagnósticos e da contínua investigação molecular para refinar sua nosologia.

O AA é considerado um tumor odontogênico raro (LOYOLA *et al.*, 2015; BILODEAU; SEETHALA, 2019). Estudos e revisões sistemáticas, embora baseados em um número limitado de casos devido à sua raridade, indicam uma ligeira predileção pelo sexo masculino e um pico de incidência na quarta década de vida, embora possa ocorrer em uma ampla faixa etária (15 a 82 anos). Há relatos de maior ocorrência na maxila em comparação com a mandíbula, frequentemente na região posterior (LOYOLA *et al.*, 2015; BILODEAU; SEETHALA, 2019).

Clinicamente, o AA geralmente se manifesta como uma tumefação indolor, de crescimento lento, mas com potencial para comportamento localmente agressivo. Em alguns casos, pode haver expansão óssea significativa. Radiograficamente, a lesão tipicamente se apresenta como uma área radiolúcida, que pode ser unilocular ou multilocular, com margens geralmente bem definidas, embora lesões com limites mais difusos também possam ser observadas. O comportamento biológico do AA é uma área de particular interesse e debate. Embora benigno, há evidências que sugerem que o AA pode exibir um comportamento mais agressivo e um maior potencial de recorrência em comparação com o ameloblastoma convencional (LOYOLA *et al.*, 2015; DEARRUDA *et al.* apud ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

O diagnóstico de AA baseia-se em um conjunto de características histopatológicas definidas pela OMS (Figura 1), divididas em critérios essenciais e desejáveis (THAVARAJ; BILODEAU, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Os critérios essenciais incluem componente epitelial semelhante ao ameloblastoma, no qual há presença de ilhas ou cordões de epitélio odontogênico que lembram os padrões folicular ou plexiforme do ameloblastoma convencional, com células periféricas colunares ou cuboidais exibindo polaridade nuclear reversa e citoplasma vacuolizado, e células centrais semelhantes ao retículo estrelado. Estruturas ductiformes, ou pseudoductos, que são formações que se assemelham a ductos, revestidas por células epiteliais cuboidais ou colunares, frequentemente contendo material eosinofílico amorfo ou mucinoso em seu lúmen devem estar presentes (THAVARAJ; BILODEAU, 2023). É também essencial a presença de condensações moruliformes, que são aglomerados celulares densos, muitas vezes com arranjo espiralado ou em redemoinho, que podem lembrar os "nós de esmalte" (*enamel knots*) observados durante a odontogênese. A arquitetura cribiforme é outro critério essencial de diagnóstico do AA, que apresenta um

padrão arquitetural complexo, caracterizado por cordões epiteliais anastomosados e fenestrados, formando um aspecto de "renda" ou "peneira".



**Figura 1.** Critérios histopatológicos de diagnóstico do ameloblastoma adenoide de acordo com a 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde (THAVARAJ; BILODEAU, 2023)  
Fonte: O autor.

Já os critérios desejáveis, que auxiliam no diagnóstico, mas não são indispensáveis, compreendem a presença de material dentinoide, que são depósitos de material acelular, eosinofílico, hialino, semelhante à dentina displásica ou osteodentina, frequentemente em proximidade com as ilhas epiteliais. Há também presença de células claras, que são grupos ou focos de células com citoplasma claro, opticamente vazio, que podem estar presentes dentro das ilhas epiteliais ou no estroma. Por fim, a queratinização focal por células fantasma, correspondendo a células epiteliais individualmente queratinizadas, com citoplasma eosinofílico vítreo, contorno celular preservado e ausência do núcleo ou apenas um "fantasma"

nuclear. Esta característica, quando presente, é geralmente focal (LOYOLA *et al.*, 2015; COURA *et al.*, 2016; THAVARAJ; BILODEAU, 2023).

A sobreposição de características histopatológicas do AA com outros tumores odontogênicos torna seu diagnóstico diferencial desafiador. A principal distinção molecular entre o AA e o ameloblastoma convencional reside na ausência da mutação *BRAF* p.Val600Glu no AA, que é um marcador molecular do ameloblastoma convencional (KURPPA *et al.*, 2014). Além disso, as características adenoideas proeminentes, como estruturas ductiformes e arquitetura cribriforme, são definidoras do AA e não típicas do ameloblastoma convencional (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

Embora o AA apresente estruturas ductiformes que podem lembrar o tumor odontogênico adenomatoide, o AA é caracterizado pela ausência de mutações em *KRAS* (códon 12), que são frequentes no tumor odontogênico adenomatoide (GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019). Morfologicamente, o tumor odontogênico adenomatoide tipicamente não exibe um componente epitelial proeminente semelhante ao ameloblastoma, como visto no AA, e pode apresentar estruturas em roseta e material amiloide, que não são características do AA (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

Devido à considerável sobreposição histológica e molecular entre o AA e o tumor dentinogênico de células fantasma, este representa um dos diagnósticos diferenciais mais complexos. Ambos, AA e tumor dentinogênico de células fantasma, podem apresentar um componente epitelial semelhante ao ameloblastoma, células fantasma e deposição de material dentinoide (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024; XUE *et al.*, 2023). Além disso, ambos os tumores demonstram evidências de ativação da via Wnt/beta-catenina, incluindo acúmulo nuclear de beta-catenina e, em alguns casos, mutações em genes da via, como *CTNBI* e *APC* (OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

A distinção histopatológica entre o AA e o tumor dentinogênico de células fantasma pode ser sutil, frequentemente baseada na predominância relativa de certas características. O AA tende a exibir uma arquitetura cribriforme e estruturas ductiformes mais proeminentes, enquanto no tumor dentinogênico de células fantasma, as células fantasma são geralmente mais abundantes e difusas (THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Odell e colaboradores (2024) argumentam que, apesar das semelhanças, AA e tumor dentinogênico de células fantasma devem, por ora, permanecer classificados como entidades separadas, aguardando uma caracterização molecular mais detalhada que possa elucidar diferenças moleculares definitivas.

Alguns autores, no entanto, chegam a sugerir que AA e tumor dentinogênico de células fantasma podem representar um espectro da mesma entidade patológica (OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023). Essa sobreposição de características histopatológicas é o maior desafio diagnóstico dessas entidades. Para sanar essa incerteza, futuras pesquisas precisarão identificar os eventos moleculares e os perfis genéticos específicos de cada tumor. Esse conhecimento é crucial para garantir diagnósticos precisos e tratamentos adequados.

A caracterização molecular inicial do AA foi fundamental para reforçar sua diferença genética com o ameloblastoma. Um dos achados mais consistentes e distintivos é a ausência da mutação *BRAF* p.Val600Glu (BILODEAU; SEETHALA, 2019; COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022; KHALAJ *et al.*, 2023; THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Esta mutação é considerada uma assinatura molecular do ameloblastoma convencional, especialmente os localizados na mandíbula (KURPPA *et al.*, 2014). Diversos estudos, utilizando uma variedade de técnicas moleculares, incluindo imuno-histoquímica para a proteína BRAF Val600Glu, qPCR alelo-específico, sequenciamento de Sanger e NGS, corroboraram o status selvagem de *BRAF* na grande maioria dos AAs (THAVARAJ; BILODEAU, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Relatos isolados que descreveram a presença da mutação *BRAF* p.Val600Glu em casos diagnosticados como AA, como o de Noda *et al.* (2023), ainda necessitam de validação por estudos independentes e avaliação criteriosa dos critérios diagnósticos empregados, uma vez que a presença de arquitetura cribriforme e condensações moruliformes não foram explicitamente mencionadas nesse caso particular (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

De modo análogo, o AA demonstrou ser consistentemente selvagem para mutações nos códons 12 e 13 do gene *KRAS* (COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022). As mutações no codon 12 são eventos genéticos prevalentes no tumor odontogênico adenomatoide (GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019). A ausência dessas alterações moleculares, características do ameloblastoma convencional e do tumor odontogênico adenomatoide nos genes *BRAF* e *KRAS*, respectivamente, forneceu um forte argumento para a identidade molecular distinta do AA (THAVARAJ; BILODEAU, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

Com a ausência de mutações nos genes *BRAF* e *KRAS* no AA, a pesquisa se voltou para outras vias de sinalização. Evidências emergentes começaram a apontar para o envolvimento da via Wnt/beta-catenina, com a detecção de mutações no gene *CTNNB1* em uma proporção de casos de AA (BASTOS *et al.*, 2022), um achado que será detalhado na seção subsequente.

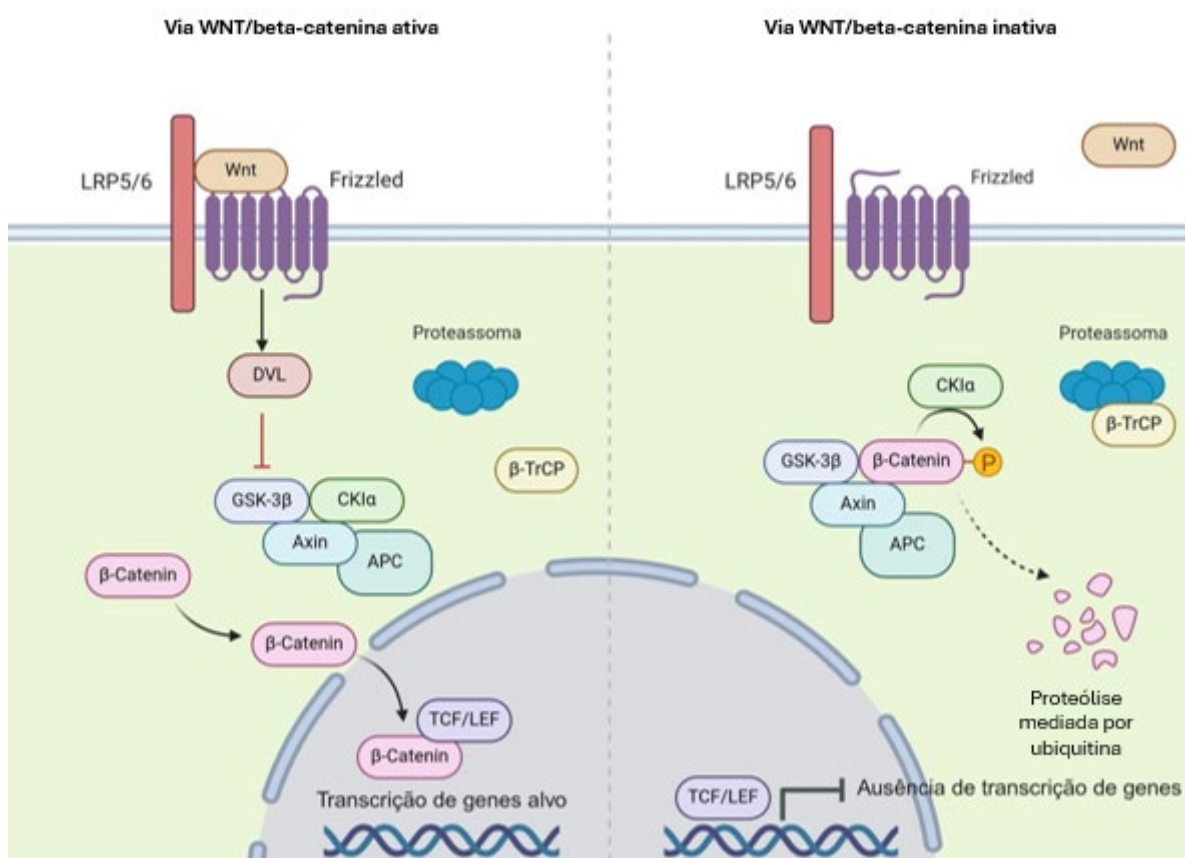
A transição do AA de uma variante pouco compreendida para uma entidade distinta na classificação da OMS ilustra vividamente o impacto crescente da caracterização molecular no refinamento da nosologia dos tumores odontogênicos. Inicialmente, o AA era frequentemente percebido como uma variante histológica ou um tumor com características sobrepostas a outras lesões odontogênicas. A investigação molecular, inicialmente focada em genes conhecidos por estarem alterados em tumores odontogênicos morfológicamente semelhantes, como o ameloblastoma convencional, que apresenta mutação *BRAF* p.Val600Glu, e o tumor odontogênico adenomatoide, que apresenta mutações no códon 12 do gene *KRAS*, revelou um padrão molecular distinto para o AA. Consistentemente, estudos demonstraram que o AA não apresenta a mutação *BRAF* p.Val600Glu nem as mutações comuns em *KRAS*. O fato de não apresentar mutações *BRAF* e *KRAS*, forneceu uma base sólida para argumentar que o AA não é simplesmente uma variação histológica de ameloblastoma ou tumor odontogênico adenomatoide, mas sim uma entidade com uma patogênese molecular potencialmente diferente. Este fato, aliado às suas características histopatológicas peculiares, culminou no seu reconhecimento como um tipo tumoral independente pela OMS (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024), demonstrando como a biologia molecular está redefinindo fronteiras diagnósticas que antes eram baseadas predominantemente na morfologia.

## 2.2 Via de sinalização Wnt/beta-catenina

A via canônica de sinalização Wnt/beta-catenina é uma cascata molecular evolutivamente conservada que desempenha um papel essencial na comunicação intercelular. A sinalização é iniciada quando ligantes da família de glicoproteínas Wnt se ligam a um complexo na superfície celular, composto primariamente por receptores transmembrana da família *Frizzled* (FZD) e co-receptores como LRP5 ou LRP6. Essa ligação recruta a proteína adaptadora *Dishevelled* (DVL) para a membrana, que então transduz o sinal para o interior da célula (LIU *et al.*, 2022).

O funcionamento da via Wnt/beta-catenina (Figura 2) pode ser entendido em dois estados distintos. Em um estado inativo, na ausência de ligantes Wnt, um complexo de destruição citoplasmático — cujos componentes centrais são as proteínas *Axina*, *Adenomatous Polyposis Coli* (APC), Glicogênio Sintase Quinase 3Beta (GSK-3Beta) e Caseína Quinase 1 $\alpha$  (CK1 $\alpha$ ) — continuamente fosforila a beta-catenina (LIU *et al.*, 2022). Essa fosforilação marca a beta-catenina para ser reconhecida pela Beta-TrCP, uma E3 ubiquitina ligase que promove sua rápida degradação pelo proteossoma. Consequentemente, os níveis de beta-catenina livre

são mantidos baixos e, no núcleo, os fatores de transcrição da família TCF/LEF atuam como repressores, silenciando os genes alvo da via (LIU *et al.*, 2022).



**Figura 2.** Via de sinalização canônica Wnt/beta-catenina em sua forma ativa e inativa.

Fonte: O autor.

Em contrapartida, no estado ativado da via, a presença de um ligante Wnt ativa os receptores, o que leva à inibição do complexo de destruição. Sem ser fosforilada e degradada, a beta-catenina se estabiliza e se acumula no citoplasma, translocando-se para o núcleo. Ali, ela se associa aos fatores TCF/LEF, convertendo-os de repressores em ativadores transcripcionais. Esse evento desencadeia a expressão de um conjunto de genes alvo, como *MYC*, *CCND1* (ciclina D1) e *AXIN2*, que são cruciais para a proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (LIU *et al.*, 2022).

Essa regulação precisa confere à via Wnt/beta-catenina um papel indispensável durante o desenvolvimento embrionário, onde governa processos como a determinação do eixo corporal, a especificação do destino celular e a organogênese, sendo a odontogênese um processo particularmente dependente dessa sinalização. Em tecidos adultos, a via continua a ser fundamental para a homeostase, especialmente na regulação de células-tronco e na regeneração tecidual (LIU *et al.*, 2022).

Dada sua profunda influência sobre a proliferação e o destino celular, não é surpreendente que a desregulação da via Wnt/beta-catenina seja um evento frequente e muitas vezes central na patogênese de diversos tipos de câncer. A ativação aberrante e constitutiva desta via pode levar à proliferação celular descontrolada e resistência à apoptose. Os mecanismos mais comuns de desregulação incluem mutações no gene *CTNNB1* (que codifica a beta-catenina), especialmente em seu éxon 3. Essas mutações impedem a fosforilação da proteína, resultando em sua estabilização e acúmulo nuclear. De forma similar, mutações inativadoras no gene supressor de tumor *APC*, um componente essencial do complexo de destruição, também resultam na ativação constitutiva da via. Mecanismos menos frequentes, como mutações na Axina ou alterações epigenéticas, podem contribuir para o mesmo resultado (LIU *et al.*, 2022).

Nesse contexto, evidências crescentes indicam que a ativação da via Wnt/beta-catenina desempenha um papel patogênico central no desenvolvimento do AA. A detecção de mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1*, como p.Ser33Cys e p.Gly34Arg, foi relatada em uma proporção significativa de casos de AA (4/9, 44%) (BASTOS *et al.*, 2022). Além de *CTNNB1*, a mutação *APC* (p.Glu789fs) também foi relatada em um de dois casos de AA avaliados, enquanto a mutação *APC* p.Gln1080\* foi descrita em um dos três tumores dentinogênicos de células fantasma (OH; HONG; YOON, 2023). Essa base genética é corroborada por achados imuno-histoquímicos que demonstram um acúmulo nuclear de beta-catenina nas células tumorais, um marcador da ativação da via (COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022).

Essas alterações moleculares em *CTNNB1* (p.Ser33Cys e p.Gly34Arg) diferenciam o AA de outros tumores odontogênicos. Enquanto o ameloblastoma convencional e o tumor odontogênico adenomatoide são frequentemente associados a mutações na via MAPK/ERK (nos genes *BRAF* e *KRAS*, respectivamente), o AA parece depender primariamente da desregulação da via Wnt/beta-catenina. Essa dicotomia molecular não apenas reforça a classificação do AA como uma entidade distinta, mas também possui implicações diretas para o desenvolvimento de futuras terapias direcionadas, sugerindo que estratégias que visam a via Wnt/beta-catenina poderiam representar uma abordagem racional do AA no futuro.

### 2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O NGS, também conhecido como sequenciamento em larga escala ou massivamente paralelo, revolucionou a pesquisa biomédica e a prática clínica na última década. Ao permitir a análise rápida e simultânea de milhões de fragmentos genômicos independentemente de conhecer a sequência, o NGS superou as limitações de rendimento do tradicional método de

Sanger, abrindo novas fronteiras no entendimento da complexidade biológica do câncer (METZKER, 2010). O NGS engloba um conjunto de tecnologias disruptivas que permitem o sequenciamento de DNA e cDNA de forma massivamente paralela. Diferentemente do método de Sanger, que sequencia um único fragmento por vez, as plataformas de NGS fragmentam os ácidos nucleicos em milhões de pedaços que são sequenciados simultaneamente. É importante ressaltar que, para a análise de transcritos (RNA), é necessária uma etapa prévia de conversão do RNA em DNA complementar (cDNA) através da transcriptase reversa, uma vez que as plataformas de sequenciamento padrão operam sobre moldes de DNA (GOODWIN, MCPHERSON, MCCOMBIE, 2016). Posteriormente, as leituras geradas são alinhadas a um genoma de referência por ferramentas de bioinformática para identificar variantes genéticas com alta precisão (BERGER, MARDIS, 2018).

O fluxo de trabalho do NGS, embora com variações entre as plataformas, tipicamente envolve etapas sequenciais. Começa com o preparo de uma biblioteca, onde o DNA ou RNA de interesse é fragmentado e ligado a sequências adaptadoras. Subsequentemente, os fragmentos são submetidos a uma amplificação clonal, gerando milhões de cópias que formam *clusters* em uma superfície sólida. A etapa de sequenciamento determina a ordem dos nucleotídeos, utilizando estratégias como o Sequenciamento por Síntese (SBS), popularizado pela empresa Illumina, que identifica nucleotídeos pela emissão de luz, ou o Sequenciamento por Semicondutores, que detecta a liberação de íons de hidrogênio. Finalmente, as sequências curtas geradas (*reads*) são processadas por bioinformática para identificar variantes genômicas e outras informações relevantes (GOODWIN, MCPHERSON, MCCOMBIE, 2016).

A versatilidade do NGS permite uma vasta gama de aplicações, desde a análise completa do genoma (*Whole Genome Sequencing*, WGS) ou de suas regiões codificadoras (*Whole Exome Sequencing*, WES), até abordagens mais focadas, como painéis de genes alvo. Além disso, a tecnologia possibilita análises do transcriptoma através do sequenciamento de RNA (RNA-Seq), que informa sobre a expressão e fusões gênicas, e estudos epigenéticos, como o Metil-Seq e o ChIP-Seq, que investigam modificações no DNA e interações proteína-DNA, respectivamente (BERGER, MARDIS, 2018).

A tecnologia NGS forneceu meios sem precedentes para investigar a complexidade dos tumores, e uma de suas aplicações mais impactantes foi na descoberta de genes e mutações associadas ao câncer. Grandes consórcios, como o *The Cancer Genome Atlas* (TCGA), utilizaram NGS para mapear o panorama genômico de milhares de tumores, identificando inúmeros genes *drivers* e expandindo nosso conhecimento sobre a biologia tumoral

(VOGELSTEIN *et al.*, 2013). Esse conhecimento aprofundado está, por sua vez, refinando a classificação tradicional de tumores, permitindo uma categorização molecular mais precisa baseada em perfis mutacionais, o que tem implicações diretas no prognóstico e tratamento (BERGER, MARDIS, 2018).

A aplicação desta tecnologia através de painéis de genes-alvo permite focar a análise em regiões genômicas de interesse clínico conhecido. O painel utilizado neste estudo (*QIAseq Targeted DNA Human Actionable Solid Tumor Panel*) abrange 22 genes estrategicamente selecionados por desempenharem papéis críticos na tumorigênese de neoplasias sólidas. Estes genes podem ser categorizados funcionalmente de acordo com as vias de sinalização que integram: a via das MAP quinases (MAPK), essencial para a proliferação celular e frequentemente desregulada em tumores odontogênicos (*BRAF*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1*); a via PI3K/AKT/mTOR, fundamental para o crescimento e sobrevivência celular (*AKT1*, *PIK3CA*); e os Receptores Tirosina Quinase (RTKs), que atuam como sensores moleculares iniciando estas cascatas (*ALK*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *KIT*, *MET*, *PDGFRA*, *RET*). Adicionalmente, o painel investiga genes envolvidos no metabolismo celular (*IDH1*, *IDH2*), sinalização por proteínas G (*GNA11*, *GNAQ*), regulação hormonal e transcricional (*ESR1*, *FOXL2*), além do gene supressor de tumor *TP53* - o "guardião do genoma" - e, de particular relevância para o ameloblastoma adenoide, o gene *CTNNB1*, efetor central da via de sinalização Wnt/beta-catenina (VOGELSTEIN *et al.*, 2013; SONDKA *et al.*, 2018).

No contexto do NGS, os Identificadores Moleculares Únicos (UMIs) são ferramentas essenciais para aumentar a precisão e a sensibilidade das análises. Eles são pequenas sequências de DNA, funcionando como "códigos de barras" únicos, que são adicionados a cada molécula de DNA ou RNA individualmente antes de qualquer etapa de amplificação por PCR. A grande importância dos UMIs reside na sua capacidade de corrigir o viés de amplificação e os erros de sequenciamento. Ao agrupar as leituras que possuem o mesmo UMI — pois todas se originaram da mesma molécula inicial — é possível criar uma sequência de consenso que filtra os erros e revelar a variante verdadeira. Isso permite uma quantificação molecular exata e a detecção confiável de variantes genéticas de baixa frequência (KIVIOJA *et al.*, 2012).

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Ampliar a caracterização genética do ameloblastoma adenoide por meio da investigação de mutações em um painel de 22 oncogenes e genes supressores de tumor frequentemente mutados em tumores sólidos em humanos.

#### 3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Reavaliar a presença de mutações nos genes *BRAF* (p.Val600Glu), *KRAS* (códon 12) e no éxon 3 do gene *CTNNB1* em amostras de AA analisadas utilizando outras técnicas em estudos prévios;

3.2.2 Investigar a presença de variantes genéticas em outras regiões nos genes acima e em outros genes que pudessem estar envolvidas na patogênese do AA;

### 4 METODOLOGIA

#### 4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (número de protocolo 30556120.0.0000.5149) e seguiu a Declaração de Helsinque. Uma amostra de conveniência composta por 15 amostras de AA fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) de 13 casos foi obtida dos serviços de patologia oral da UFMG, Universidade Estadual de Campinas, *Texas A&M University* (Estados Unidos da América) e *King's College London* (Inglaterra). O diagnóstico foi estabelecido associando as características clínicas e histopatológicas em lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) com base nos critérios diagnósticos essenciais estabelecidos pela 5ª edição da Classificação dos Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS (THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Dados clínicos incluindo sexo, idade, manifestação clínica (tumor primário ou recorrência), localização e tamanho do tumor foram obtidos.

Da amostra de conveniência inicial (n=15), 6/15 amostras apresentaram recuperação limitada de DNA genômico (gDNA) ou baixa qualidade do DNA. O preparo de bibliotecas foi realizado utilizando as 9/15 amostras com quantidade/qualidade de gDNA adequados, e 2/9 bibliotecas não atenderam aos critérios de controle de qualidade. Sete amostras foram sequenciadas, mas uma não alcançou o padrão mínimo no controle de qualidade. Portanto, 6 amostras de 6 casos foram incluídas na análise final (AA1, AA2, AA3, AA4, AA5, AA6). Essas 6 amostras foram previamente incluídas em outro estudo (BASTOS *et al.*, 2022).

#### 4.2 Isolamento de gDNA e preparo de bibliotecas

O gDNA foi isolado das amostras FFPE utilizando o kit *QIAamp® DNA FFPE Tissue* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. Um espectrofotômetro (Nano-Drop™ 2000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) e um fluorômetro (Qubit™ 4, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) foram utilizados para avaliar a concentração e a pureza do gDNA.

As bibliotecas de sequenciamento para Illumina® foram preparadas utilizando o kit *QIAseq Targeted DNA Human Actionable Solid Tumor Panel* (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. O painel direcionado cobre *hotspots* de mutação dos genes *AKT1*, *ALK*, *CTNNB1*, *ERBB3*, *ESR1*, *FOXL2*, *GNA11*, *GNAQ*, *IDH1*, *IDH2*, *MET*, *RAF1*, *RET*, éxons específicos de *BRAF*, *PDGFRA*, *EGFR*, *KRAS*, *NRAS*, *KIT*, e todas as regiões codificantes de *ERBB2*, *PIK3CA* e *TP53*, em todos os transcritos conhecidos desses 22 genes com base no genoma de referência humano GRCh37/hg19.

#### 4.3 Sequenciamento de nova geração

As bibliotecas foram sequenciadas no equipamento Illumina *MiSeq™* utilizando os kits *MiSeq™ Reagent v2* (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), gerando leituras de extremidade pareada de 150 bp. Um relatório de qualidade pós-sequenciamento foi gerado utilizando o MultiQC (v. 1.12.dev0), através do software Illumina *BaseSpace Sequence Hub DRAGEN™ FastQC + Multi QC* (Illumina Inc., San Diego, CA, EUA), utilizando o genoma de referência humano GRCh37/hg19. A análise bioinformática do painel QIAseq foi realizada utilizando o portal *GeneGlobe™ Data Analysis* (Qiagen, Hilden, Alemanha) por meio da seleção de UMIs.

As variantes detectadas foram inspecionadas manualmente no software *Integrative Genomics Viewer™* (IGV) (v. 2.17.3, de licença de código aberto do MIT; disponível em <https://igv.org>). O *strand bias* e as regiões flaqueadoras foram examinados para verificar as variantes relatadas na planilha de resultados do *GeneGlobe*. Foram relatadas variantes localizadas em regiões com profundidade mínima de 100X, suportadas por pelo menos 10 leituras para o alelo alternativo e exibindo uma frequência de alelo variante (VAF) superior a 4%. As variantes detectadas foram filtradas excluindo polimorfismos germinativos presentes no *Genome Aggregation Database* (gnomAD, <https://gnomad.broadinstitute.org>).

Considerando que variantes no *CTNNB1* foram previamente relatadas em AA, os resultados do sequenciamento foram manualmente inspecionados no IGV para verificar se alguma variante no *CTNNB1* havia sido perdida pelo algoritmo do *GeneGlobe*.

Análises *in silico* utilizando *Sorting Intolerant from Tolerant* (SIFT) (<https://sift.bii.a-star.edu.sg/>), *PolyPhen-2* (<http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>), *MutationTaster* (<https://www.mutationtaster.org/>) e *SpliceAI* (<https://spliceailookup.broadinstitute.org/>) foram utilizadas para prever a patogenicidade das variantes.

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das amostras

As características clínicas, moleculares e histopatológicas (presença ou ausência dos critérios microscópicos desejáveis segundo a OMS) dos 13 casos de AA inicialmente selecionados são mostradas na Tabela 1. A idade média dos 13 pacientes foi de 47,2 anos (mediana=48 anos), com forte predileção pelo sexo masculino (11 de 13 casos).

Tabela 1 - Informações clínicas, histológicas e moleculares dos casos de ameloblastoma adenoide selecionados (continua).

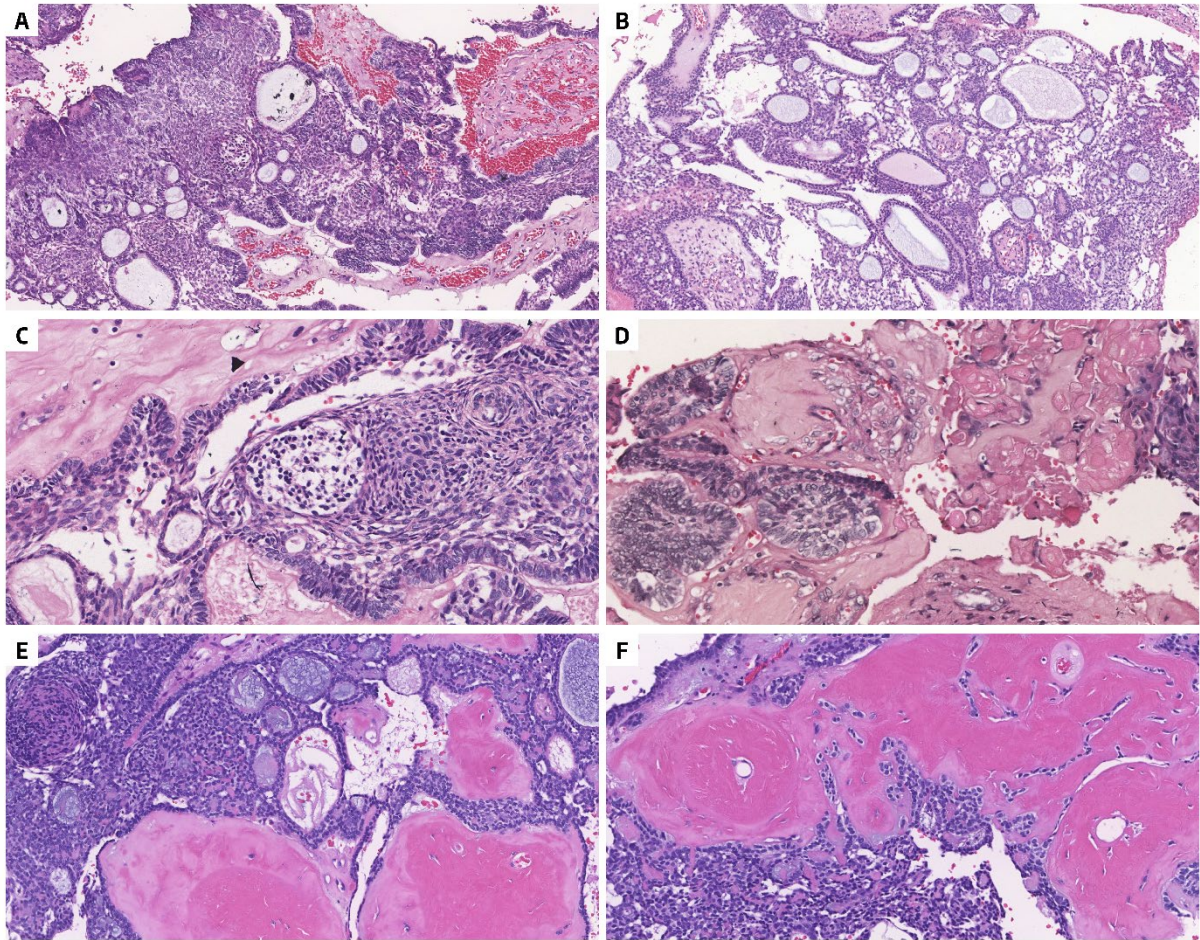
Amostra	Células fantasma	Material dentinoide	Células claras	beta-catenina nuclear (IHQ)	Status de *CTNNB1* (Sanger)	Resultados do NGS	Idade (anos)	Sexo	Manifestação clínica	Localização	Tamanho do tumor (mm)
AA1	Ausente	Presente	Presente	N.D.	WT	Nenhuma variante patogênica	34	M	Recorrência	Maxila esquerda (anterior e posterior)	45
AA2	Presente	Ausente	Presente	+	WT	<i>CTNNB1 p.Leu31Leu;</i> <i>TP53 p.Asp393Asn</i>	24	M	Primário	Maxila (posterior)	N.D.
AA3	Presente	Presente	Presente	+	p.Ser33Cys	<i>CTNNB1 p.Ser33Cys</i>	78	M	Primário	Maxila esquerda (invadindo fossa nasal)	50
AA4	Ausente	Presente	Presente	+	p.Gly34Arg	<i>CTNNB1 p.Gly34Arg</i>	41	M	Primário	Maxila posterior	N.D.
AA5	Ausente	Presente	Presente	+	WT	Nenhuma variante patogênica	27	F	Primário	Maxila esquerda	20
AA6	Presente	Presente	Presente	-	WT	<i>CTNNB1 p.Gln68*;</i> <i>ERBB2 p.Val782Ile;</i> <i>PIK3CA p.His1048Tyr</i>	48	M	Recorrência	Maxila direita	N.D.
AA7	Ausente	Presente	Ausente	+	WT	Falha no preparo da biblioteca	62	F	Recorrência	Maxila direita (posterior)	N.D.
AA8a	Presente	Presente	Presente	+	p.Ser37Phe	Falha no sequenciamento	55	M	Primário	Mandíbula direita	N.D.

(continuação) Tabela 1 - Informações clínicas, histológicas e moleculares dos casos de ameloblastoma adenoide selecionados.

Amostra	Células fantasma	Material dentinoide	Células claras	beta-catenina nuclear (IHQ)	Status de *CTNNB1* (Sanger)	Variações genéticas (NGS)	Idade (anos)	Sexo	Manifestação clínica	Localização	Tamanho do tumor (mm)
AA8b	Ausente	Presente	Presente	+	p.Ser37Phe	Baixa quantidade/qualidade de gDNA	61	M	Recorrência	Mandíbula direita	N.D.
AA8c	Ausente	Ausente	Presente	+	p.Ser37Phe	Baixa quantidade/qualidade de gDNA	67	M	Recorrência	Mandíbula direita	N.D.
AA9	Ausente	Presente	Presente	+	p.Ser33Cys	Falha no preparo da biblioteca	60	M	Primário	Mandíbula esquerda	N.D.
AA10	Ausente	Ausente	Presente	N.D.	N.D.	Baixa quantidade/qualidade de gDNA	52	M	N.D.	Mandíbula anterior	N.D.
AA11	Ausente	Ausente	Ausente	N.D.	N.D.	Baixa quantidade/qualidade de gDNA	55	M	N.D.	Maxila posterior	N.D.
AA12	Ausente	Presente	Presente	N.D.	N.D.	Baixa quantidade/qualidade de gDNA	39	M	N.D.	Mandíbula posterior	N.D.
AA13	Ausente	Ausente	Ausente	N.D.	N.D.	Baixa quantidade/qualidade de gDNA	39	M	N.D.	Mandíbula posterior	N.D.

F: feminino; M: masculino; mm: milímetros; N.D.: Não disponível. Para os casos AA1 e AA6, apenas amostras da recidiva estavam disponíveis para sequenciamento. Os casos AA1-AA9 foram previamente incluídos no estudo molecular conduzido por Bastos *et al.* (2022), e os casos AA10-AA13 foram incluídos no estudo molecular conduzido por Coura *et al.* (2021).

Microscopicamente, todas as amostras apresentaram epitélio semelhante ao ameloblastoma convencional, estruturas ductiformes, condensações celulares focais em redemoinho e reminiscentes de mórulas, que são critérios diagnósticos essenciais para esta lesão (THAVARAJ; BILODEAU, 2023) (Figura 3). Em relação aos critérios diagnósticos desejáveis, algumas amostras exibiram células claras (n=12/15, 80%; Figura 3C), células fantasma (n=4/15, 26%; Figura 3D) e matriz dentinoide (n=10/15, 66%; Figura 3E-F).



**Figura 3.** Características microscópicas do ameloblastoma adenoide. Os tumores exibiram um epitélio semelhante ao ameloblastoma convencional, com arquitetura cribriforme, estruturas semelhantes a ductos (A,B), juntamente com condensações moruliformes (C). Características desejáveis adicionais, como células claras (C), células fantasma (D) e matriz dentinoide (E,F) também foram observadas em alguns dos casos.

Fonte: Fonseca *et al.* (2025).

Resultados de estudos prévios (usando Sequenciamento de Sanger e/ou qPCR alelo-específico) não detectaram mutações *BRAF* p.Val600Glu ou *KRAS* p.Gly12Val/Arg em nenhum dos casos incluídos no presente trabalho (COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022). Três amostras (AA8a, b e c) foram derivadas de um único tumor que desenvolveu duas recidivas consecutivas ao longo de 12 anos após a enucleação cirúrgica do tumor primário, sendo a primeira após 6 anos. Todas essas 3 amostras exibiram a mutação *CTNNB1* p.Ser37Phe por

sequenciamento de Sanger (BASTOS *et al.*, 2022). Além disso, a mutação *CTNNB1* p.Ser33Cys foi detectada em uma amostra (AA9) (BASTOS *et al.*, 2022).

## 5.2 Sequenciamento de nova geração e análises *in silico*.

O resumo dos resultados das análises moleculares e *in silico* é apresentado na Tabela 2. As informações de sequenciamento e os parâmetros de qualidade são mostrados na Tabela 3.

Tabela 2 - Dados moleculares dos casos de ameloblastoma adenoide para os quais foram detectadas variantes patogênicas e resultados das análises *in silico*.

Amostra	Gene	Alteração no DNA	Alteração na proteína	Profundidade de sequenciamento (X)	Frequência do alelo variante (VAF)	SIFT	PolyPhen-2	MutationTaster	SpliceAI <sup>d</sup>
AA2	<i>CTNNB1</i>	c.91C>T	p.Leu31Leu	16681	7,8%	Tolerada	N.A. <sup>c</sup>	Causadora de doença	0,00 <sup>e</sup>
AA2	<i>TP53</i>	c.1177G>A	p.Asp393Asn	19676	13,6%	Afeta a função da proteína	Provavelmente danosa	Causadora de doença	N.A.
AA3	<i>CTNNB1</i>	c.98C>G	p.Ser33Cys <sup>a</sup>	35550	39,6%	Afeta a função da proteína	Provavelmente danosa	Causadora de doença	N.A.
AA4	<i>CTNNB1</i>	c.100G>A	p.Gly34Arg <sup>a</sup>	33319	21,0%	Afeta a função da proteína	Provavelmente danosa	Causadora de doença	N.A.
AA6	<i>CTNNB1</i>	c.202C>T	p.Gln68* <sup>b</sup>	1252	7,0%	N.A. <sup>c</sup>	N.A. <sup>c</sup>	Causadora de doença	N.A.
AA6	<i>ERBB2</i>	c.2344G>A	p.Val782Ile	4133	4,4%	Tolerada	Provavelmente danosa	Causadora de doença	N.A.
AA6	<i>PIK3CA</i>	c.3142C>T	p.His1048Tyr	654	8,3%	Tolerada	Possivelmente danosa	Causadora de doença	N.A.

<sup>a</sup>Previamente reportado por Bastos *et al.* (2022)

<sup>b</sup>Esta mutação no *CTNNB1* não foi analisada anteriormente por sequenciamento de Sanger, pois a região não foi coberta pela amplificação; Também não foi reportada pelo algoritmo *GeneGlobe*, sendo detectada por inspeção manual dos resultados de sequenciamento no IGV.

<sup>c</sup>*SIFT* não é adequado para prever o impacto funcional de mutações *nonsense*. *PolyPhen* não é adequado para prever o impacto funcional de mutações *nonsense* ou sinônimas.

<sup>d</sup>A ferramenta de predição *SpliceAI* foi usada para avaliar o efeito potencial da variante sinônima no *splicing*.

<sup>e</sup>Uma pontuação *SpliceAI* de 0.00 indica que, de acordo com o modelo, a variante analisada não tem um impacto detectável nos sítios de *splicing*.

N.A.: Não aplicável

Tabela 3 - Informações de sequenciamento e qualidade de mapeamento das amostras de ameloblastoma adenoide.

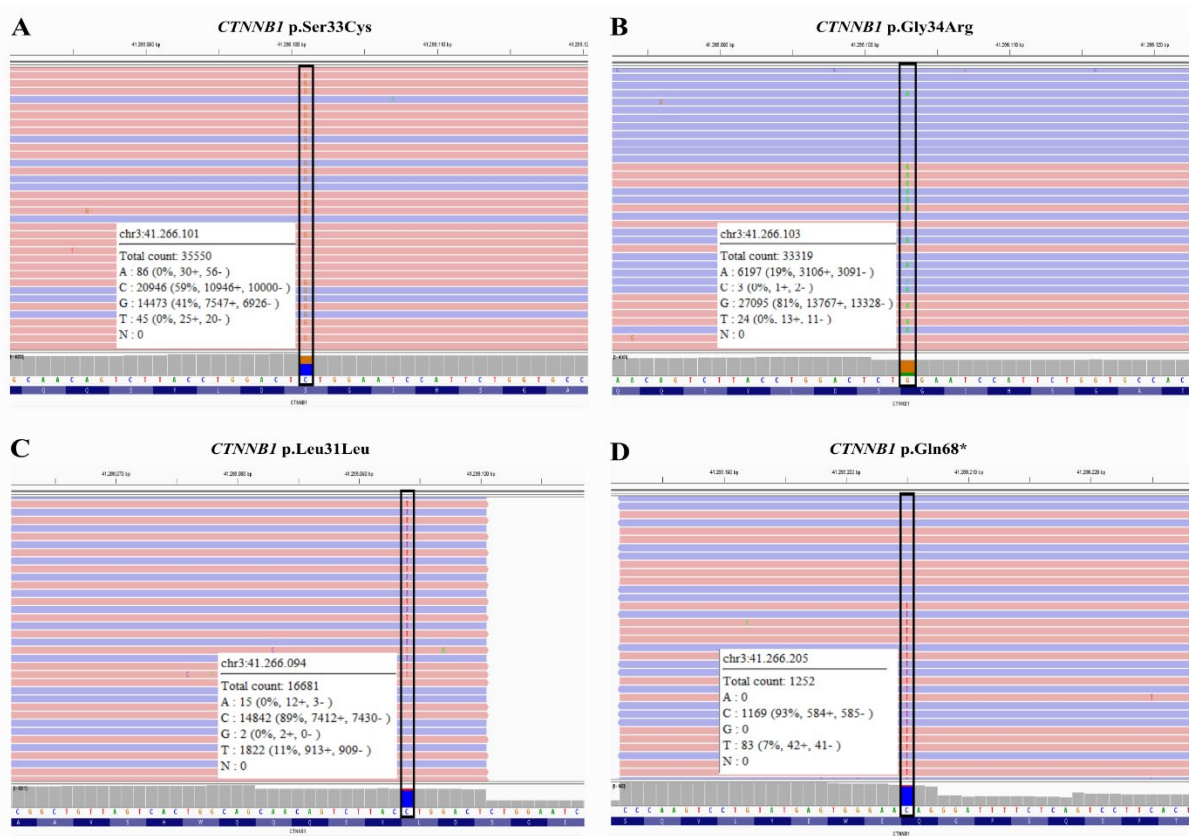
Informações de sequenciamento	AA1	AA2	AA3	AA4	AA5	AA6
Leituras totais	6.457.167	4.333.026	4.952.911	4.877.571	2.658.968	882.018
Fragmentos de leitura <i>on-target</i> usados na análise	5.148.885	2.605.634	4.286.477	3.982.732	2.335.075	496.743
Porcentagem de fragmentos <i>on-target</i> ( <i>on-target</i> /total)	79,74%	60,13%	86,54%	81,65%	87,82%	56,32%
Profundidade média de leitura (X)	35.911	16.977	29.466	26.867	16.965	2.400
% de bases com profundidade >30% da média	96,87%	66,7%	91,23%	96,35%	98,4%	67,58%
Tamanho mediano dos fragmentos (pb)	164	126	164	134	158	90
Score de qualidade 30 (q30)	93,75%	87,8%	94,58%	94,15%	94,6%	88,39%

pb: pares de base.

Variantes no *CTNNB1* foram detectadas em 4/6 amostras (67%), incluindo as variantes p.Ser33Cys (VAF=39,6%) e p.Gly34Arg (VAF=21%) previamente relatadas nos casos AA3 e AA4, respectivamente (BASTOS *et al.*, 2022), e variantes não relatadas anteriormente em AA, p.Leu31Leu e p.Gln68\* nas amostras AA2 e AA6, respectivamente. Capturas de tela do IGV mostrando as mutações no *CTNNB1* são exibidas na Figura 4. Em duas amostras, as variantes no *CTNNB1* ocorreram simultaneamente com outras variantes. Em AA2, ocorreu simultaneamente com *TP53* p.Asp393Asn. Esta variante no *TP53* não está no gnomAD e sua VAF de 13,6% é consistente com uma mutação somática. A amostra AA6 é de um tumor recorrente e ocorreu em um paciente de 48 anos. Além da variante no gene *CTNNB1*, também foram detectadas variantes nos genes *ERBB2* e *PIK3CA* nessa amostra, com VAF consistente com mutações somáticas (Tabela 2). Embora as variantes nos genes *ERBB2* e *PIK3CA* tenham sido classificadas como causadoras de doença pelo *MutationTaster* e como provável ou

possivelmente danosas pelo *PolyPhen*, as variantes nesses dois genes foram previstas como toleradas pelo *SIFT*.

A variante sinônima *CTNNB1* c.91C>T, que leva a p.Leu31Leu, é catalogada no gnomAD em 3/1461674 alelos. Sua VAF de 7,8% em AA2 apoia seu status somático. A variante *nonsense* *CTNNB1* p.Gln68\* foi prevista como causadora de doença pelo *MutationTaster*.



**Figura 4.** Variantes do gene *CTNNB1* detectadas em ameloblastoma adenoide. Capturas de tela do IGV mostrando as variantes *CTNNB1* p.Ser33Cys (c.98C>G) na amostra AA3 (A), p.Gly34Arg (c.100G>A) na amostra AA4 (B), p.Leu31Leu (c.91C>T) na amostra AA2 (C), e p.Gln68\* (c.202C>T) na amostra AA6 (D).

Fonte: Fonseca *et al.* (2025).

Notavelmente, nenhuma variante somática relevante foi detectada em dois casos (AA1 e AA5). O SNP *TP53* p.Pro72Arg (rs1042522) foi detectado em AA2, AA3, AA4, AA5 e AA6. O SNP *ERBB2* p.Pro1170Ala (rs1058808) foi detectado em AA2, AA3, AA4 e AA6.

Os resultados do presente estudo foram redigidos sob forma de artigo científico, publicado no periódico *Modern Pathology* (Fonseca YG, Bastos VC, Moreira RG, Fonseca FP, Vargas PA, Wright JM, Aguiar RS, Odell EW, Gomez RS, Guimarães LM, Gomes CC. Expanding the Molecular Characterization of Adenoid Ameloblastoma by Assessing a Panel of

Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Mod Pathol. 2025 Oct 16;39(1):100920. Epub ahead of print. PMID: 41109353), o qual encontra disponível a sua primeira página no Apêndice A.

## 6 DISCUSSÃO

Neste estudo, expandimos a caracterização molecular do AA empregando NGS direcionado para avaliar mutações acionáveis em um painel de oncogenes e genes supressores de tumor comumente mutados em neoplasias sólidas. Além disso, o status das variantes *hotspot* no códon 12 do *KRAS*, *BRAF* p.Val600Glu e éxon 3 do *CTNNB1* foi reavaliado em 6 casos previamente analisados por outras técnicas moleculares (COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022). A metodologia empregada não apenas permitiu uma triagem mais aprofundada dessas regiões, mas também a investigação de várias outras regiões e genes nessas amostras.

A ausência das mutações *BRAF* p.Val600Glu e *KRAS* p.Gly12Val/Arg no AA foi demonstrada anteriormente (BILODEAU; SEETHALA, 2019; COURA *et al.*, 2021; BASTOS *et al.*, 2022; GOMES *et al.*, 2023; OH; HONG; YOON, 2023; KHALAJ *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024) e reforçada pelos resultados do presente estudo, já que todos os seis casos sequenciados com sucesso não apresentaram variantes nas regiões-alvo de *BRAF* e *KRAS*. Notavelmente, a profundidade de sequenciamento alcançada para essas regiões no presente estudo, juntamente com a estratégia de UMI, é sem precedentes, conferindo confiabilidade aos dados obtidos para as amostras de genótipo selvagem. Esses resultados sugerem que estímulos oncogênicos dependentes da cascata de sinalização RAS-RAF-MEK-ERK não parecem participar da patogênese do AA (pelo menos, não por mutações nos genes avaliados dessa via de sinalização).

Considerando a ausência de mutações no *BRAF* e a falta de caracterização molecular do AA, além das semelhanças histopatológicas com tumores odontogênicos ricos em células fantasma que apresentam mutações no *CTNNB1*, o status do *CTNNB1* foi investigado em amostras de AA por Bastos *et al.* (2022). O estudo revelou pela primeira vez mutações no *CTNNB1* nesses tumores, achados posteriormente confirmados por outros autores (OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023). Coletivamente, esses estudos detectaram mutações *CTNNB1* em 6/24 casos (25%) e mutação *APC* (p.Glu789fs) em 1/2 casos (OH; HONG; YOON, 2023), apoiando o envolvimento da via Wnt/beta-catenina na patogênese do AA. A variabilidade nas frequências de mutação do *CTNNB1* relatadas entre diferentes estudos pode, em parte, derivar de diferenças nos fatores pré-analíticos das amostras que impactam a integridade do DNA, e também do tipo de sequenciamento utilizado. As rigorosas medidas de controle de qualidade

detalhadas em nossa metodologia, juntamente com a alta profundidade de sequenciamento e a estratégia de UMI, foram essenciais para superar esses desafios e garantir a confiabilidade de nossos achados moleculares.

No presente estudo, variantes no *CTNNB1* foram detectadas em 4/6 casos (67%). Duas dessas variantes, p.Ser33Cys e p.Gly34Arg, já haviam sido previamente detectadas nessas amostras de AA por Sanger (BASTOS *et al.*, 2022). A análise realizada no presente estudo permitiu identificar que a VAF para essas variantes é de 39,6% e 21%, respectivamente. A serina 33 serve como um sítio de fosforilação alvo da GSK-3Beta, enquanto a glicina 34 é essencial para a interação entre a beta-catenina fosforilada e um complexo de ubiquitina ligase (KIM; JEONG, 2019). Mutações nesses resíduos prejudicam a ubiquitinação dependente de fosforilação, levando à estabilização e acúmulo de beta-catenina, desencadeando a tumorigênese em vários contextos neoplásicos (KIM; JEONG, 2019).

As outras duas variantes no *CTNNB1* detectadas em AA2 (p.Leu31Leu) e AA6 (p.Gln68\*) não haviam sido detectadas anteriormente nessas amostras (BASTOS *et al.*, 2022). A primeira porque a sensibilidade do sequenciamento de Sanger provavelmente foi insuficiente para detectar a variante e a última porque a região não estava coberta pelos *primers* de sequenciamento (BASTOS *et al.*, 2022). A variante sinônima p.Leu31Leu é classificada como uma variante de interação proteína-proteína, o que significa que, apesar de ser sinônima, não é necessariamente silenciosa (SHARMA *et al.*, 2019; SARKAR; PANATI; NARALA, 2022). Mesmo não alterando a sequência de aminoácidos, mutações sinônimas ainda podem impactar o *splicing* do RNA ou a tradução, afetando potencialmente os níveis e a estabilidade da proteína beta-catenina (SHARMA *et al.*, 2019; SARKAR; PANATI; NARALA, 2022). Apesar de a análise *in silico* pelo *MutationTaster* ter indicado a variante *CTNNB1* p.Leu31Leu como causadora de doença, o SIFT a classificou como tolerada, e o *SpliceAI* não previu impacto significativo nos sítios de *splicing*. Os efeitos funcionais desta variante sinônima não silenciosa precisam ser elucidados. A variante *nonsense CTNNB1* p.Gln68\* resulta em um códon de parada. Ela está catalogada no banco de dados COSMIC (<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/login>) ocorrendo em carcinoma gástrico e em uma amostra de carcinoma oral. No entanto, o impacto funcional de ambas as variantes relatadas pela primeira vez em AA precisa de maior esclarecimento.

No estudo anterior realizado por Bastos e colaboradores (2022), foi observada imunopositividade nuclear focal para beta-catenina em 7/8 casos de AA. Em 4/7 dos casos imunopositivos, mutações no *CTNNB1* foram detectadas por sequenciamento de Sanger,

enquanto os outros 3 apresentaram status de genótipo selvagem para este gene (BASTOS *et al.*, 2022). Para outros tumores, a positividade imuno-histoquímica para beta-catenina pode ser um substituto para avaliação genética de mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* (TRAVAGLINO *et al.*, 2019), e, portanto, no presente estudo, reavaliamos o status mutacional do *CTNNB1* em amostras da coorte original com uma profundidade de sequenciamento sem precedentes. Foi identificada a mutação *CTNNB1* p.Leu31Leu em um caso (AA2) previamente classificado como de genótipo selvagem pela análise por sequenciamento de Sanger, o qual apresentava imunopositividade para beta-catenina (Tabela 1). Nenhuma variante patogênica foi detectada no caso AA5, apesar de sua imunopositividade para beta-catenina.

É digno de nota que a imunoexpressão nuclear consistente de beta-catenina em AA foi relatada em vários estudos, apesar da heterogeneidade no status mutacional do *CTNNB1* (BASTOS *et al.*, 2022; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023). Por exemplo, no estudo de Bastos e colaboradores (2022), 7/8 casos avaliados por meio de imuno-histoquímica mostraram marcação nuclear focal para beta-catenina (BASTOS *et al.*, 2022) (Tabela 1). No estudo de Oh e colaboradores (2023), o caso que apresentava a mutação no gene *APC* mostrou imunopositividade nuclear difusa para beta-catenina, enquanto o caso com uma mutação não-*hotspot* no *CTNNB1* mostrou imunorreatividade nuclear focal (OH; HONG; YOON, 2023). No estudo de Xue e colaboradores (2023), o acúmulo nuclear de beta-catenina foi observado em todos os 13 casos de AA, e somente em 1/13 mutação *CTNNB1* foi detectada, com este caso em particular demonstrando imunopositividade nuclear focal. Em conjunto, os achados sugerem que a imunopositividade nuclear da beta-catenina em AA não se correlaciona totalmente com o status mutacional do *CTNNB1*, diferentemente de outros tumores (TRAVAGLINO *et al.*, 2019). Estudos adicionais são necessários para comprovar o valor da imuno-histoquímica na predição de mutações no *CTNNB1* e em outros genes no AA.

Variantes nos genes *TP53*, *ERBB2* e *PIK3CA* foram detectadas ocorrendo simultaneamente em um contexto de mutação no *CTNNB1*. A amostra AA6 é um tumor recorrente de um paciente de 48 anos e variantes nos genes *ERBB2* e *PIK3CA*, além da variante no *CTNNB1*, foram detectadas nesse caso. Isso poderia hipoteticamente sugerir que as variantes nos genes *ERBB2* e *PIK3CA* ocorrem como mutações passageiras. Por outro lado, a amostra AA2 é de um tumor primário de um paciente de 24 anos, no qual foram detectadas uma variante no *TP53*, bem como uma variante no *CTNNB1*. Com base nas evidências atuais, é difícil especular se há um significado biológico para essas mutações ocorrerem simultaneamente com variantes no *CTNNB1* em AA. A análise histopatológica não revelou uma associação clara entre

o fenótipo histológico do tumor e a presença de mutações concomitantes. Notavelmente, a VAF para a variante no *TP53* (13,6%) é compatível com sua presença em uma subpopulação de células tumorais. O impacto funcional desta variante específica do *TP53* (p.Asp393Asn), ocorrendo simultaneamente com uma mutação no *CTNNB1*, exigiria estudos funcionais adicionais para determinar sua contribuição para o comportamento biológico do tumor.

Merece ser discutido que em 2/6 casos de AA investigados, nenhuma mutação patogênica foi detectada. Uma avaliação genômica mais abrangente, seja usando um painel de genes maior ou WES, poderia revelar se outros genes estão alterados em amostras para as quais variantes não foram detectadas.

O AA e o tumor dentinogênico de células fantasma compartilham semelhanças histopatológicas e algumas moleculares, como apontado por diferentes grupos (OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Apesar de seu reconhecimento de longa data pela OMS, em comparação com o AA, pouco se sabe sobre o panorama mutacional do tumor dentinogênico de células fantasma (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Até o momento, a presença de alterações na via Wnt/beta-catenina neste tumor foi sugerida com base em dados de imuno-histoquímica para beta-catenina, com apenas três estudos abordando a questão em nível genético (KIM; JEONG, 2019; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023).

Embora a expressão imuno-histoquímica da beta-catenina pareça semelhante entre o AA e o tumor dentinogênico de células fantasma, com ambos exibindo acúmulo nuclear de beta-catenina, os resultados do sequenciamento de DNA diferem substancialmente. A partir de dados agrupados de casos de tumor dentinogênico de células fantasma investigados molecularmente (n=18) (KIM; JEONG, 2019; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023), mutações no *CTNNB1* foram avaliadas em 18 casos e mutações no *APC* foram investigadas em um único caso de tumor dentinogênico de células fantasma. Esses estudos são detalhados adiante, mas como os tumores dentinogênicos de células fantasma às vezes tendem a ser mais mineralizados e hipocelulares que o AA, é preciso ainda mais cautela ao interpretar a literatura sobre o tumor dentinogênico de células fantasma. Na coorte avaliada por Oh *et al.* (2023), apenas 1 de 3 casos de tumor dentinogênico de células fantasma foi submetido ao WES, revelando uma mutação *APC* p.Gln1080\*, mas nenhuma mutação no *CTNNB1*. Nos outros 2 casos incluídos neste estudo, o sequenciamento Sanger direcionado do *CTNNB1* revelou sequências de genótipo selvagem. Xue *et al.* (2023) sequenciaram por Sanger os *hotspots* mutacionais do *CTNNB1* em 14 amostras de tumor dentinogênico de células fantasma, nenhuma apresentando mutações,

mas todas mostrando positividade imuno-histoquímica nuclear para beta-catenina. Kim *et al.* (2019) relataram um caso de tumor dentinogênico de células fantasmas com uma mutação *CTNNB1* p.Thr3Ser identificada por sequenciamento Sanger, embora essa mutação ocorra fora dos sítios mutacionais *hotspot* no éxon 3. Deve-se levar em consideração as limitações relativas ao sequenciamento de DNA dessas amostras, incluindo as dificuldades decorrentes da amostragem tecidual, os protocolos de descalcificação para melhor integridade do DNA, bem como a sensibilidade dos métodos de sequenciamento, sendo que tudo isso pode afetar os resultados finais. Em conjunto, a verdadeira prevalência de mutações da via Wnt/beta-catenina no tumor dentinogênico de células fantasma provavelmente permanece subestimada.

## 7 CONCLUSÃO

Nosso estudo fornece caracterização molecular adicional do AA, revelando novos *insights* sobre as alterações genéticas que podem estar associadas à sua patogênese. A ausência de mutações nos genes *KRAS* e *BRAF*, juntamente com a identificação de mutações no *CTNNB1*, apoia o envolvimento da via de sinalização Wnt/beta-catenina na tumorigênese desta neoplasia rara. Investigações contínuas são necessárias para compreender os mecanismos moleculares subjacentes aos AA em que variantes em *CTNNB1* não puderam ser detectadas.

## REFERÊNCIAS

- Adorno-Farias D, Muniz VRVM, Soares AP, Cury PR, Rabelo RG, Fernández-Ramires R, *et al.* Ameloblastoma with adenoid features: a series of eight cases. *Acta Histochem.* 2018 Jul;120(5):468-76.
- Bastos VC, Coura BP, Guimarães LM, *et al.* Adenoid ameloblastoma harbors beta-catenin mutations. *Mod Pathol.* 2022;35(11):1562-9.
- Berger MF, Mardis ER. The emerging clinical relevance of genomics in cancer medicine. *Nat Rev Clin Oncol.* 2018;15(6):353-65.
- Bilodeau EA, Seethala RR. Adenoid ameloblastoma: a series of 5 tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2019;128(2):e78.
- Coura BP, Bernardes VF, de Souza LL, *et al.* Adenomatoid ameloblastoma: a series of 24 cases with a review of the literature. *Head Neck Pathol.* 2016;10(3):327-33.
- Coura BP, Bernardes VF, de Sousa SF, *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Mod Pathol.* 2019;32(6):799-806.
- Coura BP, Dos Santos JN, Fonseca FP, *et al.* Adenoid ameloblastoma with dentinoid is molecularly different from ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2021;50(10):1067-71.
- Fonseca YG, Bastos VC, Moreira RG *et al.* Expanding the Molecular Characterization of Adenoid Ameloblastoma by Assessing a Panel of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. *Mod Pathol.* 2025 Oct 16;39(1):100920.
- Gomes CC, de Sousa SF, de Menezes GHF, *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol.* 2016;56:e3-5.
- Gomes IP, Bastos VC, Guimarães LM, Gomes CC. The molecular basis of odontogenic cysts and tumours. *J Oral Pathol Med.* 2023;52(4):351-6.
- Goodwin S, McPherson JD, McCombie WR. Coming of age: ten years of next-generation sequencing technologies. *Nat Rev Genet.* 2016;17(6):333-51.
- Khalaj F, Cinel L, Aminishakib P, Mosavat F, Soluk-Tekkesin M. Adenoid ‘ameloblastoma’: clinicopathological description of 4 additional BRAF-negative cases. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg.* 2023;124(6S):101585.
- Kim SA, Ahn SG, Kim SG, *et al.* Investigation of the beta-catenin gene in a case of dentinogenic ghost cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103(1):97-101.
- Kim S, Jeong S. Mutation hotspots in the beta-catenin gene: lessons from the human cancer genome databases. *Mol Cells.* 2019;42(1):8-16.
- Kivioja T, Vähärautio A, Karlsson K, Yli-Harja O, *et al.* Counting absolute numbers of molecules using unique molecular identifiers. *Nat Methods.* 2012;9(1):72-4.

Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol.* 2014;232(5):492-8.

Liu J, Xiao Q, Xiao J, *et al.* Wnt/beta-catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduct Target Ther.* 2022;7(1):3.

Loyola AM, Cardoso SV, de Faria PR, *et al.* Adenoid ameloblastoma: clinicopathologic description of five cases and systematic review of the current knowledge. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120(3):368-77.

Metzker ML. Sequencing technologies — the next generation. *Nat Rev Genet.* 2010;11(1):31-46.

Noda Y, Sawada S, Sakagami T, Kojima Y, Higasa K, Tsuta K. Adenoid ameloblastoma with BRAF p.V600E mutation revealing ameloblastomatous origin: a first case report. *Head Neck Pathol.* 2023;17(3):788-92.

Odell EW, Gomes CC, Thavaraj S. The evolving molecular characterisation, histological criteria and nomenclature of adenoid ameloblastoma as a World Health Organisation tumour type. *Histopathology.* 2024;85(6):846-52.

Oh KY, Hong SD, Yoon HJ. Adenoid ameloblastoma shares clinical, histologic, and molecular features with dentinogenic ghost cell tumor: the histologic spectrum of WNT pathway–altered benign odontogenic tumors. *Mod Pathol.* 2023;36(3):100051.

Sachdev S, *et al.* UCP2 as a potential biomarker for adjunctive metabolic therapies in tumor management. *Front Oncol.* 2021;11:640720.

Sarkar A, Panati K, Narala VR. Code inside the codon: the role of synonymous mutations in regulating splicing machinery and its impact on disease. *Mutat Res Rev Mutat Res.* 2022;790:108444.

Sharma Y, Miladi M, Dukare S, *et al.* A pan-cancer analysis of synonymous mutations. *Nat Commun.* 2019;10(1):2569.

Sondka Z, Bamford S, Cole CG, Ward SA, Dunham I, Forbes SA. The COSMIC Cancer Gene Census: describing genetic dysfunction across all human cancers. *Nat Rev Cancer.* 2018;18(11):696-705.

Swasdison S, Dhanuthai K, Jankittivong A, *et al.* The diverse histopathologic and clinical spectrum of adenomatoid ameloblastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;116(6):e463-70.

Thavaraj S, Bilodeau EA. Adenoid ameloblastoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board, editors. Head and neck tumours. 5th ed. Vol. 9. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2023.

Travaglino A, Raffone A, Saccone G, *et al.* Immunohistochemical nuclear expression of beta-catenin as a surrogate of *CTNNB1* exon 3 mutation in endometrial cancer. *Am J Clin Pathol.* 2019;151(5):529-38.

Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339(6127):1546-58.

Xue J, Zhang W, Zhang J, *et al.* Adenoid ameloblastoma shares clinicopathologic, immunohistochemical, and molecular features with dentinogenic ghost cell tumor. *Am J Surg Pathol*. 2023;47(11):1274-84.

## Research Article

## Expanding the Molecular Characterization of Adenoid Ameloblastoma by Assessing a Panel of Oncogenes and Tumor Suppressor Genes

Ygor G. Fonseca<sup>a</sup>, Victor C. Bastos<sup>a</sup>, Rennan G. Moreira<sup>b</sup>, Felipe P. Fonseca<sup>c</sup>, Pablo A. Vargas<sup>d</sup>, John M. Wright<sup>e</sup>, Renato S. Aguiar<sup>f</sup>, Edward W. Odell<sup>g</sup>, Ricardo S. Gomez<sup>c,h</sup>, Letícia M. Guimarães<sup>a</sup>, Carolina C. Gomes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>b</sup> Genomics Laboratory, Multiuser Laboratories Center, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>c</sup> Department of Oral Pathology and Medicine, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>d</sup> Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, Brazil; <sup>e</sup> Diagnostic Sciences Department, Texas A&M University College of Dentistry, Dallas, Texas; <sup>f</sup> Department of Genetics, Ecology and Evolution, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil; <sup>g</sup> Head and Neck Pathology, King's College London, Guy's Hospital, London, England; <sup>h</sup> Medical School, Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 3 August 2025  
Revised 16 September 2025  
Accepted 9 October 2025  
Available online 16 October 2025

## Keywords:

adenoid ameloblastoma  
BRAF  
CTNNB1  
KRAS  
odontogenic tumor  
Wnt/β-catenin pathway

## ABSTRACT

Adenoid ameloblastoma (AA) is a rare epithelial odontogenic tumor microscopically characterized by ameloblastoma-like epithelium, duct-like structures, epithelial whorls, cribriform architecture, and dentinoid matrix. Wnt/β-catenin activation, usually by *CTNNB1* mutations, is thought to characterize AA, which are *BRAF* and *KRAS* wild type. The present study aimed to expand the genetic characterization of AA by interrogating variants at several sites known to be linked to solid tumor pathogenesis. Six AA samples were sequenced at an unprecedented sequencing depth using a 22-gene panel including oncogenes and tumor suppressor genes commonly mutated in solid human tumors, namely *AKT1*, *ALK*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB3*, *ESR1*, *FOXL2*, *GNAI1*, *GNAQ*, *IDH1*, *IDH2*, *KRAS*, *KIT*, *MET*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *RAF1*, *RET*, and *TP53*. Reinforcing the distinct molecular identity of AA, absence of *BRAF* p.Val600Glu and *KRAS* p.Gly12Val/Arg mutations was observed. *CTNNB1* mutations were identified in 4 of 6 cases (67%), including previously reported variants (p.Ser33Cys and p.Gly34Arg) as well as novel ones (p.Leu31Leu and p.Gln68\*), supporting the involvement of the Wnt/β-catenin signaling pathway in AA pathogenesis. In 2 cases, *CTNNB1* variants co-occurred with either *TP53* or *ERBB2* and *PIK3CA* variants, suggesting potential secondary oncogenic events. Notably, in 2 cases, no variants were detected. Our findings provide further evidence for AA classification as a separate tumor entity. The identification of previously reported *CTNNB1* and novel genetic variants contributes to better characterization of the molecular profile of AA. Future studies are required to interrogate variants in other genes in wild-type cases.

© 2025 United States & Canadian Academy of Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights are reserved, including those for text and data mining, AI training, and similar technologies.

## Introduction

Adenoid ameloblastoma (AA) is an epithelial odontogenic tumor recently recognized as a separate entity in the fifth World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck

<sup>\*</sup> These authors contributed equally: Ygor G. Fonseca and Victor C. Bastos.

<sup>\*</sup> Corresponding author.

E-mail address: [carolinacgomes@ufmg.br](mailto:carolinacgomes@ufmg.br) (C.C. Gomes).

