

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

Victor Coutinho Bastos

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES *HOTSPOT* NOS GENES *KRAS*, *BRAF* E
CTNNB1 NO AMELOBLASTOMA ADENOIDE E DOS PADRÕES DE EXPRESSÃO
DE *Kras* E *Braf* NA ODONTOGÊNESE MURINA**

Belo Horizonte

2025

Victor Coutinho Bastos

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES *HOTSPOT* NOS GENES *KRAS*, *BRAF* E
CTNNB1 NO AMELOBLASTOMA ADENOIDE E DOS PADRÕES DE EXPRESSÃO
DE *Kras* E *Braf* NA ODONTOGÊNESE MURINA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Medicina Molecular.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Carolina Cavaliéri Gomes
Co-Orientadora: Dr^a. Letícia Martins Guimarães

Belo Horizonte

2025

B327i Bastos, Victor Coutinho.
Investigação de Mutações Hotspot no Genes KRAS, BRAF e CTNNB1 no Ameloblastoma Adenoide e dos padrões de expressão de KRAS e BRAF na Odontogênese Murina [recurso eletrônico]. / Victor Coutinho Bastos. - - Belo Horizonte: 2025.
64f.: il.
Formato: PDF.
Requisitos do Sistema: Adobe Digital Editions.

Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.
Coorientador (a): Letícia Martins Guimarães.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Tese (doutorado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Tumores Odontogênicos. 2. Ameloblastoma. 3. Mutação. 4. Quinases de Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno. 5. beta Catenina. 6. Odontogênese. 7. Dissertação Acadêmica. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Guimarães, Letícia 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

CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR**ATA DE DEFESA DE TESE**

Às catorze horas do dia vinte e nove de julho de dois mil e vinte e cinco, no Instituto de Ciências Biológicas, da Universidade Federal de Minas Gerais, realizou-se a sessão pública para a defesa da Tese de **VÍCTOR COUTINHO BASTOS**, inscrição 2021695675. A presidência da sessão coube a Profa. Carolina Cavaliéri Gomes (Orientadora)-UFMG. Inicialmente, a presidente fez a apresentação da Comissão Examinadora assim constituída: Carolina Cavaliéri Gomes (Orientadora)-UFMG, Letícia Martins Guimarães -UFMG, Geraldo Brasileiro Filho-UFMG, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade - UFRJ, Marina Gonçalves Diniz - UFMG e Karuza Maria Alves Pereira - UFC. Em seguida, o candidato fez a apresentação do trabalho que constitui sua Tese de Doutorado, intitulada: " **Investigação de mutações hotspot nos genes KRAS, BRAF e CTNNB1 no ameloblastoma adenoide e dos padrões de expressão de KRAS E BRAF na odontogênese murina**". Seguiu-se a arguição pelos examinadores e logo após, a Comissão reuniu-se, sem a presença do candidato e do público e decidiu considerar aprovada a Tese de Doutorado. O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pela presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ata que, depois de lida, se aprovada, será assinada pela Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 29 de julho de 2025.

Assinatura dos membros da banca examinadora:

Documento assinado eletronicamente por **Geraldo Brasileiro Filho, Professor do Magistério Superior**, em 31/07/2025, às 16:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavaliéri Gomes, Professora do Magistério Superior**, em 31/07/2025, às 18:22, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).https://sei.ufmg.br/sei/controlador.php?acao=documento_imprimir_web&acao_origem=arvore_visualizar&id_documento=4781439&infra_sistema=10000100&infra_unidade_atual=110001072&infra_hash=bb2692e7... 1/2

01/08/2025, 14:02

SEI/UFMG - 4423615 - Ata de defesa de Dissertação/Tese

Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 31/07/2025, às 20:27, 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 **Bruno Augusto Benevenuto de Andrade, Usuário Externo**, em 01/08/2025, às 08:18, 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 **Letícia Martins Guimarães, Usuário Externo**, em 01/08/2025, às 08:19, 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 **Karuza Maria Alves Pereira, Usuário Externo**, em 01/08/2025, às 13:09, 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, informando o código verificador **4423615** e o código CRC **552FFA27**.

Dedico este trabalho à minha família, que me ensinou a sonhar com os pés no chão e de coração cheio. Aos meus amigos, que se tornaram abrigo — de laboratório, de riso, de vida, de silêncio.

AGRADECIMENTOS

Com extrema gratidão, dedico estas palavras àqueles que estiveram ao meu lado ao longo desta jornada. Aos meus ancestrais, guias, mentores, anjos, guardiões e deuses, que me protegem de tudo aquilo que não devo saber.

À minha família, base e porto seguro, agradeço pelo amor constante, pela paciência nos dias difíceis e pelo suporte silencioso, mas essencial, que sempre me guiou adiante. À minha mãe, Reislá, pelo exemplo de determinação e cuidado. Ao meu pai, Rodrigo (*in memoriam*), que apesar de frequentemente alheio às minhas diligências acadêmicas, foi incentivo ao longo de toda minha trajetória acadêmica. Ao meu tio Fernando e aos meus queridos avós, minha eterna gratidão pelo acolhimento, pelos conselhos e pelo apoio que tanto me fortaleceram. Aos meus irmãos, Daniel e Ana, por serem quem são.

À minha orientadora, professora Carolina Cavaliéri Gomes, agradeço profundamente pelo acompanhamento generoso e atento, companheirismo e escuta sempre disponível, e por constituir um dos meus referenciais de excelência acadêmica. Agradeço imensamente pelos incontáveis votos de confiança que pavimentaram e pavimentam minha trajetória acadêmica e profissional.

Aos colegas e membros da equipe do *Laboratório de Biologia Integrativa* e do *Laboratório de Patologia Molecular*, meu sincero obrigado pela troca constante, pelo aprendizado mútuo, pelas risadas compartilhadas e pelo apoio nos momentos em que a ciência se faz desafiadora. Em especial, à Letícia Guimarães, Bruna Coura, Ygor Fonseca, Bianca Gomes, Tamara Vieira, Josiane Gonçalves e Flávia Filiú. À minha também colega de trabalho e amiga, Isadora Gomes, por se fazer parte da família que construí ao longo de tantos anos de aprendizado. À Marina Rocha, por ser luz.

Aos professores do *Centre for Craniofacial and Regenerative Biology* (King's College London/Inglaterra), Martyn Cobourne e Maisa Seppala, por terem me acolhido como aluno visitante e por terem viabilizado um intenso processo de transformação profissional e pessoal. Ao doutorando Daniel Stonehouse-Smith pela colaboração na execução deste trabalho. À Marcela Moreno, que se fez amiga durante meu período

em Londres. Aos demais colegas de departamento, Daniel Doro, William Barrell, Yasmine Kemkem, Jade Desjardins, Carlos Barata, Jordan Joel, e às professoras Karen Liu e Cynthia Andoniadou. Gratidão.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular, por permitirem e viabilizarem meu processo formativo em inúmeras ocasiões.

Aos demais amigos, que navegaram comigo através de momentos bons e de momentos ruins. Aos que estiveram ao meu lado, mesmo que à distância, durante os dias mais áridos — aqueles que, com palavras, silêncios, abraços ou pensamentos positivos, trouxeram luz, ânimo e esperança: minha gratidão mais sincera.

Aos Professores Alexander Chak-Lam Chan, Pablo Agustin Vargas, John Hellstein, Selvam Thavaraj, John M. Wright, Edward William Odell, Ricardo Santiago Gomez, Luiz Armando de Marco, Juan Pedro Martinez-Barbera e Luciana Bastos, que forneceram recursos técnicos e recursos humanos fundamentais para a condução deste trabalho. Aos pacientes, que gentilmente cederam consentimento para utilização de amostras biológicas, fundamentais para este trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial, Domênico Romani, Mara Maia, Daniela Kem e Fernanda Rocha, por serem profissionais e por serem tão cordiais e solícitos.

Por fim, com respeito e reconhecimento, agradeço às agências de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelas bolsas concedidas que subsidiaram minha permanência e dedicação aos estudos aqui no Brasil e também no exterior; à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), que viabilizaram este projeto com recursos indispensáveis.

Obrigado.

“Além disso, não se deve deixar que vão longe os desejos, mas permitamos que saiam pela vizinhança, pois não aceitam ficar de todo reclusos. Posto de lado o que é impossível ou difícil de fazer, sigamos no encalço do que está perto e que faz sorrir nossa esperança [...]. E não invejemos os que estão mais elevados: o que parecia estar nas alturas está defronte a um precipício.”

– Sêneca (*Sobre a tranquilidade da Alma*)

RESUMO

Cistos e tumores odontogênicos representam um grupo heterogêneo de lesões que derivam do aparato odontogênico. Mutações oncogênicas são reportadas nestas lesões, sendo que as alterações moleculares ocorrem principalmente em três vias de sinalização celular: MAPK/ERK, Wnt/beta-catenina e Sonic Hedgehog. O ameloblastoma adenoide é uma neoplasia odontogênica recentemente incluída na 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS. Ele apresenta similaridade histológica com o ameloblastoma, com o tumor odontogênico adenomatoide e com lesões que possuem células fantasmas. Sua patogênese molecular ainda é incerta. Assim, investigamos a presença de mutações nos genes *BRAF*, *KRAS* e *CTNNB1*, comumente mutados nestas lesões, em uma coorte de 11 amostras de ameloblastoma adenoide, derivadas de 9 casos, por meio do sequenciamento de Sanger. Reações de imuno-histoquímica para beta-catenina foram realizadas a fim de explorarmos o padrão de marcação no ameloblastoma adenoide. Dada a alta prevalência de mutações *hotspot* nos genes *KRAS* e *BRAF* em alguns tumores odontogênicos, e ao desconhecimento dos padrões de expressão de tais genes durante a odontogênese, em um segundo momento, propusemo-nos à investigação dos padrões de expressão dos homólogos murinos *Braf* e *Kras* durante a odontogênese em embriões de camundongos CD1 (E12.5–E19.5) utilizando hibridização *in situ* de RNA com *riboprobes* marcadas com digoxigenina. A análise molecular do ameloblastoma adenoide revelou ausência de mutações *hotspot* nos genes *KRAS* e *BRAF* na coorte investigada, ao mesmo tempo em que mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* (p.Ser33Cys, p.Gly34Arg e p.Ser37Phe) foram detectadas em 4 de 9 casos de ameloblastoma adenoide. Imunopositividade nuclear para beta-catenina foi observada em todos os casos avaliados por imuno-histoquímica. A análise dos padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* em molares murinos revelou que a expressão de *Kras* foi principalmente observada no epitélio dental durante os estágios de botão tardio, capuz e campânula, começando na região mesial do germe dentário e, posteriormente, se localizando na região do nó do esmalte. A expressão de *Braf* atingiu seu pico em E14.5 no nó do esmalte, expandindo-se em direção ao epitélio interno do órgão esmalte e ao retículo estrelado em E15.5. Células ectomesenquimais dispersas também exibiram expressão de ambos os genes. Assim, neste estudo, demonstramos de forma inédita a presença de mutações em *CTNNB1* no ameloblastoma adenoide, dando suporte à classificação deste tumor como entidade separada, em vez de um subtipo de ameloblastoma. Também descrevemos os padrões de expressão de *Kras* e *Braf* durante a odontogênese de molares de camundongos, fornecendo conhecimentos que podem contribuir para uma melhor compreensão dos papéis desses genes no desenvolvimento dental, na patogênese de lesões odontogênicas induzidas por mutações na via MAPK/ERK e em sua potencial aplicação na odontologia e medicina regenerativa.

Palavras-chave: tumores odontogênicos; ameloblastoma; ameloblastoma adenoide; mutações genéticas; MAPK/ERK; WNT/beta-catenina; odontogênese.

ABSTRACT

INVESTIGATION OF HOTSPOT MUTATIONS IN THE *KRAS*, *BRAF*, AND *CTNNB1* GENES IN ADENOID AMELOBLASTOMA AND THE EXPRESSION PATTERNS OF *Kras* AND *Braf* GENES DURING MURINE ODONTOGENESIS

Odontogenic cysts and tumours comprise a heterogeneous group of lesions arising from the odontogenic apparatus. Oncogenic mutations have been reported in these lesions, with molecular alterations predominantly affecting three major signalling pathways: MAPK/ERK, Wnt/beta-catenin, and Sonic Hedgehog. Adenoid ameloblastoma is a recently recognised odontogenic neoplasm, included in the fifth edition of the WHO Classification of Head and Neck Tumours. Histologically, it resembles ameloblastoma, adenomatoid odontogenic tumour, and lesions containing ghost cells. However, its molecular pathogenesis remains poorly understood. In this study, we investigated the presence of mutations in *BRAF*, *KRAS*, and *CTNNB1* — genes commonly mutated in odontogenic tumours — in a cohort of 11 adenoid ameloblastoma samples derived from 9 cases, using Sanger sequencing. Immunohistochemistry for beta-catenin was also performed to assess its staining pattern in adenoid ameloblastoma. Given the high prevalence of hotspot mutations in *KRAS* and *BRAF* in certain odontogenic tumours, and the limited knowledge regarding the expression patterns of these genes during odontogenesis, we further explored the expression of the murine homologues *Braf* and *Kras* in developing CD1 mouse embryos (E12.5–E19.5) via digoxigenin-labelled RNA in situ hybridisation. Molecular analysis of the adenoid ameloblastoma cases revealed no hotspot mutations in *KRAS* or *BRAF* in the cohort examined. In contrast, exon 3 mutations in *CTNNB1* (p.Ser33Cys, p.Gly34Arg, and p.Ser37Phe) were identified in 4 of 9 cases. Nuclear immunopositivity for beta-catenin was observed in all cases assessed by immunohistochemistry. The analysis of *Kras* and *Braf* expression in developing murine molars demonstrated that *Kras* was predominantly expressed in the dental epithelium during the late bud, cap, and bell stages, initially localised in the mesial region of the tooth germ and subsequently concentrated in the enamel knot. *Braf* expression peaked at E14.5 in the enamel knot and expanded towards the inner enamel epithelium and stellate reticulum by E15.5. Scattered ectomesenchymal cells also exhibited expression of both genes. This study is the first to report *CTNNB1* mutations in adenoid ameloblastoma, providing molecular evidence in support of its classification as a distinct pathological entity rather than a subtype of ameloblastoma. Furthermore, we characterised the spatial and temporal expression patterns of *Kras* and *Braf* during murine molar odontogenesis, offering insights into the potential developmental roles of these genes and contributing to a deeper understanding of the MAPK/ERK pathway in odontogenic lesion pathogenesis, as well as their prospective implications for regenerative dentistry and medicine.

Keywords: odontogenic tumours; ameloblastoma; adenoid ameloblastoma; genetic mutations; MAPK/ERK; WNT/beta-catenin; odontogenesis.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA	15
2.1	Ameloblastoma Adenoide	15
2.2	Via MAPK/ERK durante o desenvolvimento dentário.....	17
3	OBJETIVOS	19
3.1	Geral.....	19
3.2	Específicos	19
4	MATERIAIS E MÉTODOS	20
4.1	Seleção e obtenção das amostras de ameloblastoma adenoide	20
4.2	Extração do DNA genômico (gDNA), amplificação das regiões-alvo e sequenciamento de Sanger	21
4.3	Imuno-histoquímica.....	23
4.4	Obtenção dos embriões murinos	24
4.5	Histologia dos germes dentários murinos e Hibridização <i>in situ</i> do RNA.....	24
5	RESULTADOS	28
5.1	Descrição da amostra de ameloblastoma adenoide de estudo	28
5.2	Caracterização molecular do ameloblastoma adenoide	30
5.3	Imuno-histoquímica.....	31
5.4	Histologia dos germes dentários murinos e hibridização <i>in situ</i>	34
6	DISCUSSÃO	38
7	CONCLUSÃO	49
	REFERÊNCIAS	50
	APÊNDICE A – Parecer Consubstanciado/Aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (COEP-UFMG)	58
	APÊNDICE B – Primeira página do artigo elaborado e publicado no periódico <i>Modern Pathology</i>	59
	APÊNDICE C – Primeira página da carta ao Editor elaborada e publicada no periódico <i>Head & Neck Pathology</i>	60
	APÊNDICE D – Primeira página da carta ao Editor elaborada e publicada no periódico <i>Modern Pathology</i>	61

1 INTRODUÇÃO

Os dentes se desenvolvem por meio de interações altamente orquestradas, mútuas e indutivas entre tecidos epiteliais — derivados do ectoderma — e tecidos ectomesenquimais oriundos da crista neural (BASTOS; GOMEZ; GOMES, 2022; SHARPE, 2001). O desenvolvimento dentário humano tem início ao final da quinta semana de gestação, com os espessamentos dentários no epitélio oral (equivalente ao décimo dia do desenvolvimento embrionário em camundongos), e progride por etapas morfogenéticas bem definidas: iniciação, estágio de botão, capuz, campânula e histodiferenciação (HOVORAKOVA *et al.*, 2018; KOUSSOULAKOU; MARGARITIS; KOUSSOULAKOS, 2009). Ao longo desse processo, os tecidos associados ao germe dentário sofrem diversas transformações, incluindo involução e apoptose, diferenciação celular, remodelamento tecidual e, em alguns casos, eventos de transição epitélio-mesênquima. O processo culmina com a formação das raízes, o desenvolvimento dos tecidos periodontais e a erupção dos dentes na cavidade oral (BASTOS; GOMEZ; GOMES, 2022; BUCHTOVÁ *et al.*, 2012; MATALOVA; TUCKER; SHARPE, 2004). Alterações que ocorram ao longo do processo de odontogênese, bem como a persistência de remanescentes teciduais enclausurados nos ossos gnáticos, podem predispor ao desenvolvimento de lesões odontogênicas. Assim, tais tecidos, quando reativados/alterados por estímulos inflamatório-infecciosos, aquisição de mutações, reprogramação epigenética ou outros mecanismos ainda não completamente compreendidos, podem sofrer processos de transdiferenciação e originar diferentes tipos de lesões de natureza odontogênica (WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD, 2023). Estas formam um grupo de lesões que recapitulam, de maneira aberrante, os aspectos morfológicos e moleculares dos estágios da odontogênese e dos tecidos associados, retrocedendo na ontogenia dos tecidos dentários e periodontais (BASTOS; GOMEZ; GOMES, 2022; DINIZ *et al.*, 2017). Convencionalmente, os tumores odontogênicos são classificados de acordo com seu componente proliferativo, podendo ter origem epitelial, mesenquimal ou mista (epitelial e mesenquimal).

Embora a maioria das lesões odontogênicas possua características clínicas, radiográficas e morfológicas bem definidas, algumas lesões podem ter

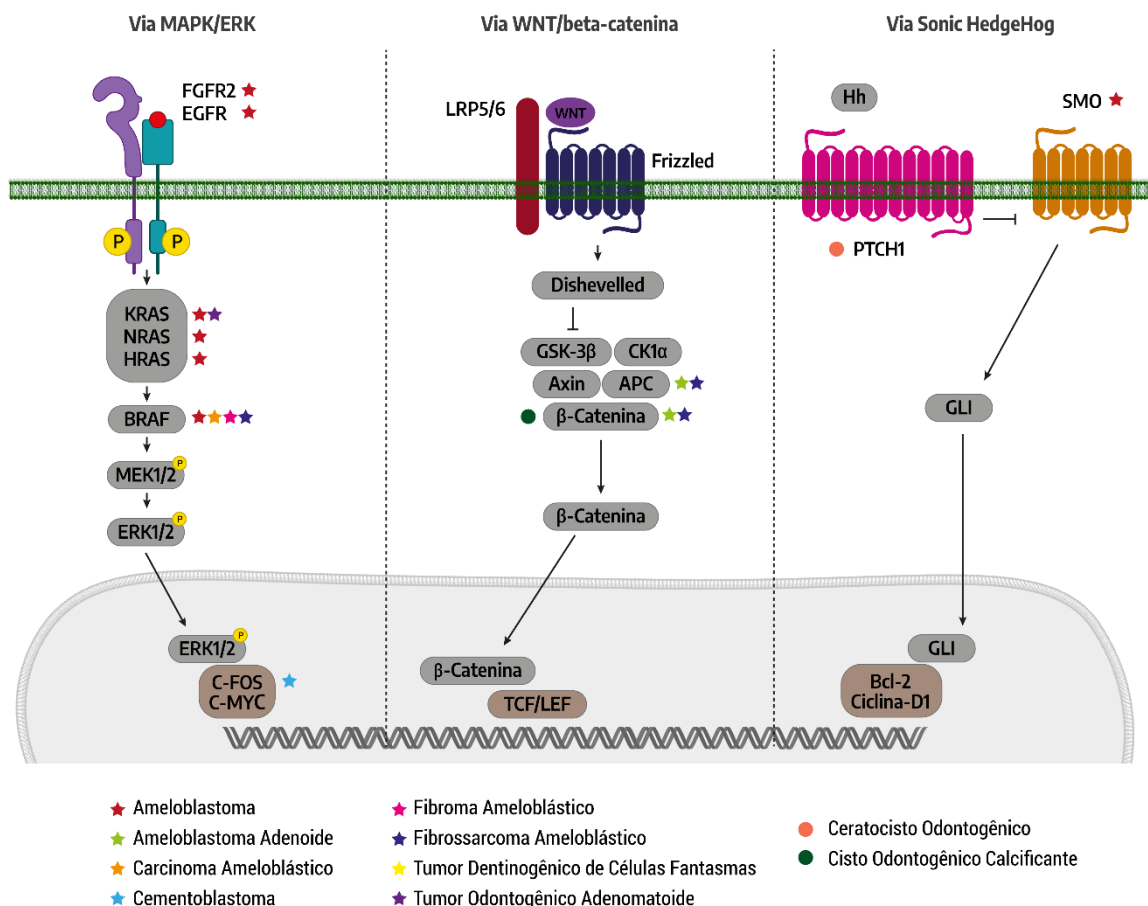
características peculiares, tornando o processo diagnóstico bastante desafiador. Tais desafios podem ser explicados por uma ampla gama de eventos, que vão desde dificuldades técnicas durante os procedimentos de biópsia, biópsias incisionais pequenas e/ou pouco representativas da lesão, até uma infinidade de importantes mudanças morfológicas resultantes das interações entre o parênquima e o estroma, tornando tanto o diagnóstico quanto a tomada de decisão terapêutica difíceis (WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD, 2023). Neste sentido, a 5ª Edição da Classificação de Tumores da Cabeça e Pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS) incluiu critérios diagnósticos essenciais e desejáveis para cada entidade, com uma proposta de facilitar e uniformizar os laudos melhorando a comunicação entre patologistas, dentistas clínicos e cirurgiões (WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD, 2023).

Paralelamente às tentativas de otimização e discussões acerca da classificação de lesões, avanços científico-tecnológicos mais recentes resultaram em sequenciamento de DNA em velocidade sem precedentes, revelando importantes padrões de alterações genéticas em diferentes tecidos e contextos biológicos (tais como envelhecimento, exposição a mutágenos, lesões tumorais não neoplásicas, bem como neoplasias benignas e malignas), incluindo lesões de origem odontogênica (DUARTE-ANDRADE *et al.*, 2020; GOMES, C. C., 2022; GOMES, I. P. *et al.*, 2023; GUIMARÃES *et al.*, 2021; PAVINATO; BAGGIOLINI, 2025). Nestas lesões, evidência acumulada sugere que as principais mutações genéticas se concentram em três vias de sinalização principais, as quais também se mostram relevantes durante o processo de odontogênese, sendo elas as vias MAPK/ERK, Wnt/beta-catenina, e *Sonic hedgehog* (DINIZ *et al.*, 2017; GOMES, I. P. *et al.*, 2023). Os padrões de mutações em componentes específicos de cada uma destas vias e as lesões císticas e tumorais nas quais tais mutações têm sido reportadas podem ser visualizados na **Figura 1**, em representação esquemática.

A via de sinalização MAPK/ERK coordena processos fisiológicos essenciais em resposta a sinais extracelulares (como o *fator de crescimento derivado de fibroblastos*, FGF; e o *fator de crescimento derivado da epiderme*, EGF) sobre seus respectivos receptores tirosina-quinases de membrana. Essa ativação desencadeia a sinalização através da família RAS (KRAS, NRAS e HRAS), família RAF (por exemplo, BRAF), MEK1/2 e ERK1/2, culminando na fosforilação de ERK e translocação para o núcleo,

onde ativa substratos nucleares como c-fos e c-myc. A ativação constitutiva da via MAPK/ERK leva a funções celulares anormais, conferindo potencial tumorigênico às células alteradas (KRISHNA; NARANG, 2008; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020). A via de sinalização Wnt/beta-catenina regula vários processos fisiológicos. As mutações de Wnt/beta-catenina culminam na degradação prejudicada da beta-catenina, resultando assim em níveis citoplasmáticos e nucleares aumentados de beta-catenina, com consequente efeitos pró-tumorigênicos (CLEVERS; NUSSE, 2012; GILES; VAN ES; CLEVERS, 2003; LIU, J. *et al.*, 2022). A via Sonic Hedgehog desempenha um papel essencial durante o desenvolvimento embrionário e a tumorigênese de organismos vertebrados. Na ausência do ligante (HH), o SMO é mantido inativo por PTCH. Após a ligação do HH, o PTCH libera a inibição da SMO e desencadeia eventos de sinalização intracelular que terminam no núcleo com regulação positiva e expressão de genes alvo como Bcl-2 e Ciclina-D1. Mutações no gene *PTCH1* resultam em super atividade da proteína GLI, promovendo a proliferação celular e prevenindo a apoptose (CARBALLO *et al.*, 2018; DINIZ *et al.*, 2017).

Figura 1 – Vias de sinalização frequentemente alteradas nos cistos e tumores odontogênicos.



Legenda: Representação esquemática das vias de sinalização mais comumente afetadas por mutações no contexto das lesões de origem odontogênica. Os componentes específicos de cada uma das vias, e as respectivas lesões em que mutações foram reportadas estão destacados. Tais informações são derivadas de séries de casos ou relatos de caso em que a caracterização molecular foi realizada, empregando-se técnicas como sequenciamento de Sanger, PCR quantitativo em tempo real alelo-específico, e sequenciamento de próxima geração.

Fonte: Autoria própria.

No presente estudo, um conjunto de técnicas moleculares foi empregado a fim de elucidar as bases moleculares do ameloblastoma adenoide, neoplasia odontogênica benigna de origem epitelial, recentemente incluída na 5ª edição da Classificação de Tumores de Cabeça de Pescoço da OMS. Além disto, dada a alta frequência de mutações *hotspot* nos genes *KRAS* e *BRAF* implicadas no desenvolvimento de um subgrupo de neoplasias odontogênicas (**Figura 1**), combinado à falta de conhecimento acerca do papel de tais genes durante a odontogênese, bem como evidência prévia, derivada de modelos animais, de que alterações em componentes da via MAPK/ERK poderiam desencadear defeitos na odontogênese e o desenvolvimento de tumores semelhantes às neoplasias odontogênicas humanas, buscou-se investigar os padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* durante o processo de odontogênese murina.

2 REVISÃO DA LITERATURA E JUSTIFICATIVA

2.1 Ameloblastoma Adenoide

Desde sua primeira descrição na literatura, o ameloblastoma adenoide, por vezes denominado ameloblastoma adenoide com dentinoide, tem recebido atenção como um tumor odontogênico raro que apresenta algumas características histopatológicas semelhantes a ameloblastomas e tumores odontogênicos adenomatoides (ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; LOYOLA *et al.*, 2015). O ameloblastoma adenoide caracteriza-se histopatologicamente pela presença de epitélio ameloblastomatoso, juntamente com estruturas ductiformes, condensações em forma de redemoinhos (condensações moruliformes), e um arranjo cribriforme (ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; COURA *et al.*, 2021; LOYOLA *et al.*, 2015). Depósitos de material dentinoide, células claras e *clusters* de células-fantasma¹ são também observados (COURA *et al.*, 2021; LOYOLA *et al.*, 2015).

Embora o ameloblastoma adenoide tenha sido considerado um subtipo raro de ameloblastoma, devido à sua agressividade e elevadas taxas de recorrência (até 70%) (ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; LOYOLA *et al.*, 2015), a lesão foi recentemente incorporada como uma entidade separada pela OMS na Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço, publicada inicialmente no ano de 2022 (THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Com cerca de 40 casos publicados, o ameloblastoma adenoide apresenta um pico de incidência durante a quarta década de vida, com relatos variando em indivíduos de 25-52 anos de idade. Além disso, a lesão exibe predileção discreta por indivíduos do sexo masculino (1,3M:1F) (THAVARAJ; BILODEAU, 2023).

A patogênese molecular do ameloblastoma adenoide era completamente desconhecida até 2022. Em função de similaridades histológicas com o ameloblastoma convencional e o tumor odontogênico adenomatoide, lesões para as quais são conhecidas as mutações em componentes da via MAPK/ERK (GUIMARÃES *et al.*, 2021), nosso grupo investigou a presença das mutações *hotspot*

¹Células Fantasmas são células epiteliais de volume aumentado, exibindo um padrão de queratinização aberrante e apresentando discretos contornos do núcleo original, correspondendo a remanescentes da membrana nuclear. Tais células recebem esta nomenclatura devido a tais características, observáveis sob a coloração de hematoxilina-eosina (GARG; MALHOTRA; URS, 2022).

BRAF p.Val600Glu e no códon 12 do gene *KRAS* em uma série de 9 casos de ameloblastoma adenoide (COURA *et al.*, 2021). Estas são mutações conhecidas para ameloblastomas e tumores odontogênicos adenomatoides, respectivamente. Mais especificamente, a mutação *BRAF* p.Val600Glu é observada 64% dos ameloblastomas convencionais, 81% dos ameloblastomas unicísticos e 63% dos ameloblastomas periféricos (GOMES, I. P. *et al.*, 2023; GUIMARÃES *et al.*, 2021; KURPPA *et al.*, 2014), enquanto as mutações *KRAS* p.Gly12Val/Arg são observadas em 70% dos tumores odontogênicos adenomatoides (COURA *et al.*, 2019; GOMES, C. C. *et al.*, 2016; GUIMARÃES *et al.*, 2021). Nenhuma das amostras de ameloblastoma adenoide testadas exibiu tais mutações, indicando um perfil molecular distinto em relação ao ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatoide (COURA *et al.*, 2021). Porém, a ausência de tais mutações não permitia ainda uma caracterização genética de tais tumores: haveria uma mutação presente que fosse recorrente em uma parcela dos mesmos?

Células fantasmas podem ser observadas no ameloblastoma adenoide. Estas são frequentemente observadas em uma ampla gama de tumores, odontogênicos e não-odontogênicos, incluindo o cisto odontogênico calcificante, o tumor dentinogênico de células fantasmas, o carcinoma de células fantasmas, o pilomatricoma, o craniofaringioma adamantinomatoso, e também na metaplasia morular observada em um subgrupo dos carcinomas endometriais (GOMES, C. C.; DE SOUSA; GOMEZ, 2019; HASSANEIN *et al.*, 2003; LOYOLA *et al.*, 2015; RUMAYOR *et al.*, 2015; TRAVAGLINO *et al.*, 2021). Dada a forte associação estabelecida entre este padrão de queratinização/diferenciação celular e a presença de mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1*, codificante da proteína beta-catenina, observada nestes tumores (GOMES, C. C.; DE SOUSA; GOMEZ, 2019; HASSANEIN *et al.*, 2003; MANKAPURE, 2017; NAKAMURA, 2018; SEKINE *et al.*, 2002, 2003), interrogou-se o status mutacional de tal gene em amostras de ameloblastoma adenoide.

2.2 Via MAPK/ERK durante o desenvolvimento dentário

A via MAPK/ERK desempenha um papel crucial na regulação de funções celulares fundamentais, como proliferação, sobrevivência, crescimento, metabolismo, migração e diferenciação (GUIMARÃES *et al.*, 2021; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020; YOON; SEGER, 2006). A via canônica é composta pela cascata de proteínas RAS-RAF-MEK-ERK, cuja ativação normal é mediada por sinais externos (por exemplo, fatores de crescimento FGF e EGF) que se ligam aos seus respectivos receptores (GUIMARÃES *et al.*, 2021; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020; YOON; SEGER, 2006). A partir desta interação, há fosforilação sequencial dos componentes da cascata RAS-RAF-MEK-ERK, culminando com a ação de ERK fosforilada em seus substratos nucleares e a regulação das funções biológicas celulares. Alterações nesta via podem contribuir para o sucesso das células neoplásicas, conforme verificado em diversos tumores humanos (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020; YOON; SEGER, 2006).

Mutações em genes da via de sinalização MAPK/ERK ocorrem em alta frequência em tumores odontogênicos benignos e malignos (GUIMARÃES *et al.*, 2021). Nos ameloblastomas, por exemplo, a mutação *BRAF* p.Val600Glu foi primeiramente descrita por Kurppa e colaboradores (2014), em quantidade expressiva de casos (~60%), sendo atualmente interpretada como uma assinatura molecular para a lesão, além de ter sido descrita – com frequência variável –, em fibromas ameloblásticos, fibro-dentinomas, fibro-odontomas, fibrossarcomas e carcinomas ameloblásticos (AGAIMY *et al.*, 2020; COURA *et al.*, 2020; KURPPA *et al.*, 2014). Adicionalmente, mutações *hotspot* que afetam o gene *KRAS*, mais especificamente p.Gly12Val e p.Gly12Arg, são observadas em cerca de 75,9% dos tumores odontogênicos adenomatoides, ocorrendo em baixa frequência (4,3%) em ameloblastomas (MARÍN; NIKLANDER; MARTÍNEZ-FLORES, 2021).

Considerando o papel das mutações em genes da via MAPK/ERK supracitadas na patogênese de tumores odontogênicos, é importante entender o papel de tais genes durante as etapas do desenvolvimento dentário, haja vista o mimetismo dos diferentes tumores com os tecidos que compõem o aparato dental durante a odontogênese. No entanto, o papel de tais genes e das proteínas por eles codificadas durante este processo permanece obscuro. Digno de nota, as proteínas

BRAF e KRAS constituem importantes transdutores de sinais dentro da via MAPK/ERK, agindo como interruptores da via, mediando os efeitos de sinais extracelulares para o núcleo, e influenciando a transcrição de diferentes genes-alvo (KRISHNA; NARANG, 2008; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020). Estudos em animais transgênicos ou contendo mutações em Ras, revelam que estes animais podem apresentar defeitos na diferenciação e proliferação de ameloblastos e seus precursores (CHEN *et al.*, 2009; GOODWIN *et al.*, 2014), e podem desenvolver tumores mandibulares consistentes com tumores odontogênicos (CARDIFF *et al.*, 1993; GIBSON *et al.*, 1992; WRIGHT *et al.*, 1995). Além disso, o papel crítico de outros componentes da via MAPK/ERK (por exemplo, o das proteínas Braf, MEK1/2 e ERK2) no desenvolvimento de tecidos derivados da crista neural e no desenvolvimento de anomalias craniofaciais também foi demonstrado em pacientes humanos e em modelos murinos (NEWBERN *et al.*, 2008).

Assim, o presente estudo também visou analisar os padrões de expressão dos componentes da via MAPK/ERK, *Kras* e *Braf*, em diferentes estágios da odontogênese murina por meio da técnica de hibridização *in situ* de RNA.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

3.1.1 Analisar a presença de mutações *hotspot* nos genes *KRAS*, *BRAF* e *CTNNB1* no ameloblastoma adenoide e analisar os padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* durante a odontogênese murina.

3.2 Específicos

3.2.1 Estabelecer a frequência de mutações em *CTNNB1* em amostras de ameloblastoma adenoide por meio de sequenciamento de Sanger.

3.2.2 Verificar e validar a ausência das mutações *hotspot BRAF Val600Glu* e *KRAS Gly12Val/Arg* em amostras de ameloblastoma adenoide por sequenciamento de Sanger.

3.2.3 Avaliar a imunexpressão nuclear da proteína beta-catenina através da técnica de imuno-histoquímica em amostras de ameloblastoma adenoide.

3.2.4 Correlacionar os padrões de imunexpressão de beta-catenina com o status mutacional do gene *CTNNB1*.

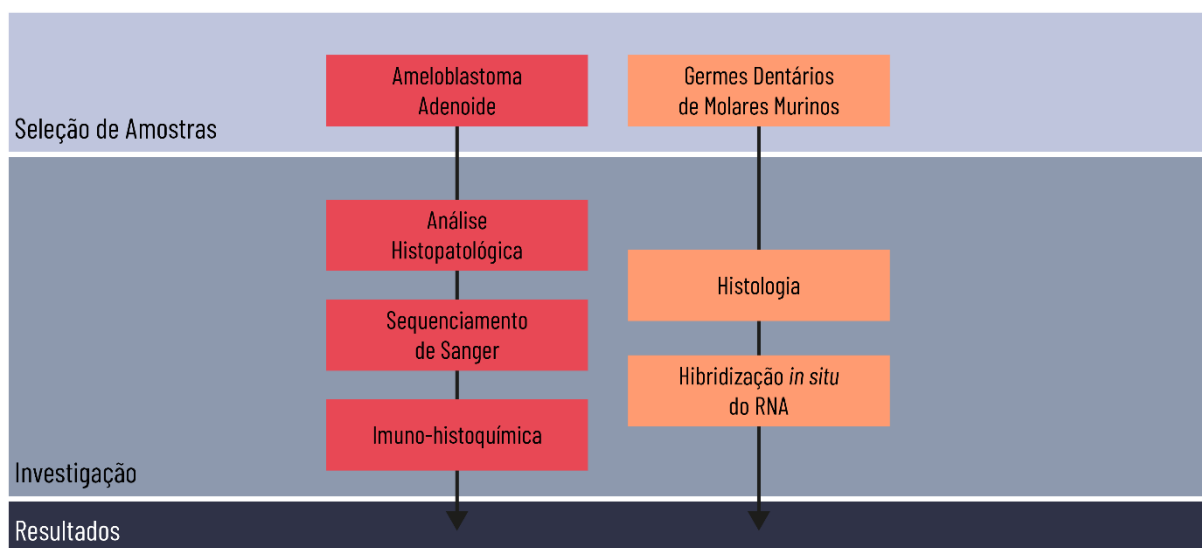
3.2.5 Discutir e contextualizar possíveis diagnósticos diferenciais frente aos achados observados.

3.2.6 Analisar os padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* em molares murinos a partir de preparados histológicos craniofaciais por meio da técnica de hibridização *in situ* de RNA.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Considerando os objetivos delineados neste estudo, o diagrama a seguir representa esquematicamente o fluxo de trabalho empregado (**Figura 2**). Nas seções subsequentes, será apresentada a metodologia detalhada para cada uma das etapas desenvolvidas.

Figura 2 – Fluxo do trabalho desenvolvido.



Legenda: Fluxo de trabalho empregado para cada um dos dois temas centrais do presente estudo.

Fonte: Autoria própria.

4.1 Seleção e obtenção das amostras de ameloblastoma adenoide

O presente estudo foi realizado sob aprovação do projeto em parecer (número: 4.228.043) do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG) (protocolo CAAE: 30697120.9.0000.5149). O Parecer Consubstanciado com tal aprovação é apresentado no **Apêndice A**. Uma amostra de conveniência (n=16 amostras, advindas de 14 casos, com um dos casos contendo amostras do tumor primário e de outras duas recidivas consecutivas) foi obtida através de colaboração com serviços de patologia oral e maxilofacial nacionais e internacionais, com profissionais e grupos de pesquisa das instituições: Universidade

Federal de Minas Gerais (UFMG, Brasil), Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF, Brasil), Universidade Federal da Bahia (UFBA, Brasil), Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ, Brasil), Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP, Brasil), Queen Elizabeth Hospital (China), University of IOWA (EUA), Texas A&M University (TAMU, EUA), King's College London (KCL, Reino Unido).

Inicialmente, todos os casos de ameloblastoma adenoide foram revisitados e reavaliados microscopicamente por patologistas orais experientes. Dados clínicos foram coletados (idade, sexo, se manifestação primitiva/primária ou recorrência/recidiva, e localização). Os critérios utilizados para avaliação histológica foram os mesmos propostos por Loyola e colaboradores (LOYOLA *et al.*, 2015) e estão em conformidade com os critérios propostos pela OMS (THAVARAJ; BILODEAU, 2023).

4.2 Extração do DNA genômico (gDNA), amplificação das regiões-alvo e sequenciamento de Sanger

O gDNA foi isolado a partir de amostras de ameloblastoma adenoide fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE) usando o *QIAamp® DNA FFPE Tissue Kit* (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O princípio da técnica se baseia na adsorção seletiva das moléculas de DNA a uma membrana de sílica contida numa coluna. Assim, após etapas de desparafinação, digestão enzimática e quebra das ligações cruzadas causadas pela formalina, tampões e eluentes são utilizados para isolamento e purificação do gDNA. Um espectrofotômetro (Nano-Drop™ 2000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE, EUA) foi utilizado para avaliar tanto a concentração quanto a qualidade do DNA. Os parâmetros de razão de absorbância nos comprimentos de onda 260/280nm (~1,8) e 260/230nm (1,8-2,2) foram considerados como indicativos de pureza do gDNA extraído.

Regiões específicas dos genes *CTNNB1*, *KRAS* e *BRAF* foram amplificadas por PCR convencional como etapa do processo para sequenciamento de Sanger. Tais regiões incluíram:

- Éxon 3 do gene *CTNNB1*, comumente mutada em lesões ricas em células fantasmas, codificante dos resíduos reguladores da proteína beta-catenina (Asp32, Ser33, Gly34, Ser37, Thr41 e Ser45).
- Éxon 2 do gene *KRAS*, região que engloba o códon 12 (Gly12), comumente mutado no tumor odontogênico adenomatoide e em diversas outras neoplasias humanas.
- Éxon 15 do gene *BRAF*, região que contém o códon 600 (Val600), frequentemente mutado no ameloblastoma e em outras neoplasias humanas.

A PCR foi realizada usando o reagente MyTaq HS Red Mix, 2x (Bioline Reagents, Londres, Reino Unido), seguindo instruções do fabricante. Os iniciadores (*primers*) foram desenhados usando o Primer3 (acessado em <https://primer3.ut.ee/>). Os iniciadores utilizados foram F: 5'TTTGATGGAGTTGGACATGG3' e R: 5'CAGGACTTGGGAGGTATCCA3' para a região de interesse do gene *CTNNB1*; F: 5'GGCCTGCTGAAAATGACTGAA3' e R: 5'GGTCCTGCACCAGTAATATGC3' para *KRAS*; e F: 5'TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA3' e R: 5'CCAAAATTTAATCAGTGGA3' para o gene *BRAF*. Caudas M13 foram adicionadas aos iniciadores para facilitar o fluxo de trabalho e a análise de dados. Controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações. As condições de ciclagem foram definidas em 3 minutos a 95°C para desnaturação inicial, seguidas por 45 ciclos com temperaturas intercaladas de 95°C (15 segundos), 60°C (estabelecida como temperatura de anelamento, 15 segundos) e 72°C (30 segundos), seguidas por um período de extensão final das fitas de gDNA neoformadas por 10 minutos a 72°C e *hold* a 4°C. Os produtos da reação de PCR foram então analisados por eletroforese em gel de agarose a 1,5%, e visualmente inspecionados em aparelho transiluminador de luz UV. Após, foi feita a purificação enzimática dos produtos de PCR com o reagente ExoSAP-IT™ PCR Product Cleanup Reagent (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

O sequenciamento de Sanger foi realizado seguindo a técnica padrão com uso do kit Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems). A reação de Sanger se baseia no princípio da complementaridade das fitas do DNA para geração de amplicons de DNA de diferentes tamanhos/peso molecular para determinação da sequência de nucleotídeos que compõe o gene. Assim como na

reação de PCR convencional, nucleotídeos são continuamente incorporados às fitas neoformadas pela ação da enzima polimerase, ao passo que dideoxynucleotídeos, análogos aos nucleotídeos normais e marcados por fluorescência, e que não possuem o grupo 3'-OH necessário para a formação da ligação fosfodiéster entre nucleotídeos, resultam na interrupção da extensão da fita de DNA ao serem incorporados. Fragmentos de DNA de diferentes tamanhos podem então ser separados por eletroforese capilar e identificados por meio da detecção das moléculas fluorescentes. O sequenciamento foi realizado de forma bidirecional, utilizando-se o equipamento ABI3130 DNA Analyzer (Applied Biosystems).

Os cromatogramas gerados foram manualmente inspecionados no software SnapGene Viewer (versão 5.3, GSL Biotech, disponível em <https://snapgene.com>), usando as sequências NM_001904.4 (*CTNNB1*), NM_004985.5 (*KRAS*), e NM_001354609.2 (*BRAF*) como referência.

4.3 Imuno-histoquímica

Dado o fato de a expressão nuclear de beta-catenina ser considerada um indicativo de mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1*, avaliou-se a imunoexpressão de beta-catenina na coorte de casos incluídas no estudo que possuíam material disponível. O objetivo desta análise foi verificar se haveria o acúmulo intranuclear da proteína beta-catenina nas amostras de ameloblastoma adenoide, e se tal acúmulo refletia o status mutacional destas lesões. As reações foram realizadas seguindo o protocolo padrão, em diferentes serviços de patologia, utilizando os anticorpos primários anti-beta-catenina, clone 14 (IgG₁, camundongo, monoclonal, pré-diluído, Cell Marque®, Darmstadt, Alemanha) e clone β -catenin-1 (IgG₁, FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human, *ready-to-use*, Dako, Dinamarca), seguindo-se recomendações dos respectivos fabricantes. O resultado das reações de imuno-histoquímica foi avaliado e expresso como negativo ou positivo, levando-se em consideração a ausência ou presença do acúmulo intra-nuclear da proteína beta-catenina, em pelo menos uma área focal, observada em maior aumento.

4.4 Obtenção dos embriões murinos

Os experimentos de hibridização *in situ* foram conduzidos durante período de doutorado sanduíche com bolsa de estudos financiada pela Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior (processo: 88887.911883/2023-00), realizado no *Centre for Craniofacial and Regenerative Biology* (CCRB, *King's College London*, Londres, Reino Unido), sob supervisão do Professor Martyn T. Cobourne. Os procedimentos envolvendo animais foram realizados sob licença aprovada (PP6999345), em conformidade com o *Animal (Scientific Procedures) Act* do governo do Reino Unido e com a aprovação ética local do *King's College London*, além de seguirem as diretrizes ARRIVE.

Acasalamentos temporalmente programados foram conduzidos de modo que o meio-dia do dia em que os plugs vaginais foram detectados fosse considerado como E0.5 (E: *embryonic day*). Camundongas prenhes da linhagem CD-1 (*outbred*) foram eutanasiadas por deslocamento cervical ou por meio de câmara de gás. As ninhadas de diferentes idades gestacionais, entre E12.5 e E19.5, foram coletadas e fixadas em paraformaldeído (PFA) a 4% por no mínimo 24 horas, sendo posteriormente lavadas em solução tampão fosfato (PBS) livre de RNase. As cabeças dos camundongos com idade E19.5 foram descalcificadas em uma solução de EDTA 12,5%/PFA 2,5%, com monitoramento até atingirem o ponto adequado para o processamento histológico. Em seguida, os embriões (estágios E12.5-15.5) e as cabeças dos embriões em E19.5 foram desidratados em uma série de concentrações crescentes de IMS (*industrial methylated spirit*, 30-70%), tratados com xilol e incluídos em parafina.

4.5 Histologia dos germes dentários murinos e Hibridização *in situ* do RNA

O processamento histológico dos embriões e a hibridização *in situ* em preparos histológicos craniofaciais foram realizados conforme descrito anteriormente (HASTON *et al.*, 2017). Foram utilizadas secções de 8 µm de espessura da região dos molares, correspondendo a cortes coronais contínuos através de cada germe dentário. Pelo menos três embriões foram analisados por estágio de desenvolvimento, exceto para o estágio E19.5, para o qual apenas dois embriões estavam disponíveis

devido à necessidade de descalcificação cuidadosa e prolongada. Cortes corados em hematoxilina e eosina foram preparados para cada animal/estágio obtido, a fim de certificar a presença de germes dentários de molares para as análises subsequentes.

Plasmídeos contendo os insertos de *Kras* (*Kras-pCMV-Sport6*) e *Braf* (*Braf-pFLC1*) foram gentilmente cedidos pelo Dr. Juan Pedro Martinez-Barbera (*University College London*, Reino Unido) e foram linearizados com a enzima de restrição *SacII* (Promega, Southampton, Reino Unido). As *riboprobes* (sondas) foram geradas por transcrição *in vitro* com as RNA polimerases T7 e T3 (Promega, Southampton, Reino Unido) para os genes *Kras* e *Braf*, respectivamente, e foram marcadas com digoxigenina utilizando o kit comercial DIG RNA Labelling Mix (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, Reino Unido), conforme as instruções do fabricante.

As reações de hibridização *in situ* foram realizadas em triplicata seguindo protocolos descritos anteriormente (FONS ROMERO *et al.*, 2017; SAJEDI *et al.*, 2008). Os passos envolveram a desparafinização, re-hidratação dos cortes histológicos, digestão enzimática com 5µg/mL de proteinase K (10 minutos, 37°C). Posteriormente, as lâminas foram re-fixadas em PFA 4%, acetiladas (125 µL de anidrido acético em 50 mL de TEA-HCl 1,0 M de pH 7,5) e lavadas em PBS. As lâminas foram desidratadas sequencialmente em etanol 70% por 5 minutos e em etanol 95% por alguns segundos, sendo posteriormente secas ao ar livre em capela de exaustão, sobre papel-alumínio.

A solução de hibridização foi preparada para um volume final de 100 mL, contendo: 50% formamida deionizada, 10% dextrano sulfato, 1% Denhardt livre de RNase, 250 µg/mL tRNA de levedura, 0,3M NaCl, 20mM Tris-HCl (pH 8), 5mM de EDTA pH 8, 10 mM de NaPO₄ e 1% sarcosil. Antes da aplicação, foi adicionado 1 µL de inibidor de RNase por mL da solução de hibridização, além de 25 µL de solução estoque de tRNA (20 mg/mL) para cada mL da solução, alcançando uma concentração final de 0,5 mg/mL de tRNA. A quantidade da mistura de sonda e solução de hibridização foi determinada com base no número de lâminas por ensaio (300µL/lâmina). Para a desnaturação da sonda, foram separados 50 µL da solução de hibridização, aos quais adicionou-se 1µg da sonda marcada com digoxigenina. Essa mistura foi homogeneizada por vórtex, centrifugada brevemente, submetida a choque térmico a 85 °C por 1 minuto e então resfriada em gelo por 3 minutos. Após esse

processo, a solução contendo a sonda desnaturada foi adicionada ao restante da solução de hibridização.

Durante a aplicação da mistura nas lâminas, o bloco aquecido foi mantido próximo à bancada, de modo a manter os tubos aquecidos e preservar a conformação da sonda. As seções teciduais foram então cobertas com 300 μ L da solução de hibridização contendo a sonda, sendo sobrepostas com filmes de parafilme. As lâminas foram posicionadas horizontalmente em uma câmara úmida contendo papel absorvente embebido em solução de formamida 50% (formamida/H₂O), garantindo a manutenção da umidade durante a incubação. As câmaras úmidas seladas foram então incubadas a 65°C por cerca de 16 horas em banho-maria.

Para a etapa de lavagem de alta estringência, foi preparada uma solução composta por partes iguais de formamida e tampão de alta estringência, previamente aquecido a 65 °C. As lâminas, previamente cobertas com parafilme, foram colocadas cuidadosamente em um jarro de Coplin contendo solução 5× SSC para que os filmes de parafilme flutuassem e fossem removidos sem causar danos ao tecido. Uma vez descoladas as “lamínulas” de parafilme, as lâminas foram submetidas a uma primeira lavagem em solução de alta estringência (composta por 60mL de água Milli-Q, 15ml SSC (20×) e 75mL de formamida deionizada) a 65 °C por 30 minutos. Em seguida, foram lavadas três vezes por 10 minutos, a 37 °C, em tampão de RNase, cuja composição final consistia em: NaCl 0,5 M, Tris-HCl 10 mM (pH 7,5), EDTA 5 mM (pH 8). Na última lavagem, utilizando-se o mesmo tampão de RNase, as lâminas foram tratadas com RNase A (20 μ g/mL) a 37 °C por 30 minutos.

Após o tratamento com RNase A, as lâminas foram lavadas novamente no tampão de RNase por 15 minutos a 37 °C. A lavagem em tampão de alta estringência foi então repetida duas vezes, por 20 minutos cada, a 65 °C. Em seguida, realizou-se uma lavagem em solução SSC 2× por 15 minutos a 37 °C, seguida de uma nova lavagem com solução SSC 0.1× também por 15 minutos a 37 °C.

Para as etapas de bloqueio, as lâminas foram lavadas com solução PBT (PBS contendo 0,1% de Tween-20) por 15 minutos à temperatura ambiente. Após essa lavagem, realizou-se o bloqueio das seções com 10% de soro de cabra inativado (*Heat-Inactivated Goat Serum*, HiGS) diluído em PBT, por 1 hora à temperatura ambiente. As seções foram incubadas com anticorpo anti-digoxigenina conjugado à

fosfatase alcalina (*Anti-DIG-AP Fab fragment*, Roche), diluído 1:5000 em PBT contendo 1% de HiGS. A incubação foi realizada *overnight*, em câmara fria e sob agitação leve.

Após a incubação com o anticorpo anti-digoxigenina, as lâminas foram lavadas quatro vezes em PBT por 15 minutos à temperatura ambiente, seguidas de duas lavagens de 10 minutos em tampão NTMT (100 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 9.5, 50 mM MgCl₂, 0,1% Tween-20). Antes do uso, adicionou-se 0,5 mg/mL de levamisol para inibição da atividade endógena de fosfatase alcalina. As seções foram então incubadas até obtenção de sinal visível sob microscopia de luz, à temperatura ambiente e protegidas da luz, em BM Purple (Roche Diagnostics, Burgess Hill, West Sussex, Reino Unido) previamente centrifugada (600×g, 4 minutos), contendo 0,5 mg/mL de levamisol.

A reação foi interrompida com lavagem em PBS (2–5 minutos), seguida de pós-fixação rápida em PFA 4% e nova lavagem em PBS. A coloração nuclear foi realizada com Nuclear Fast Red (Abcam, Cambridge, Reino Unido) a 0,005% por 5 minutos. A desidratação foi feita em série crescente de etanol (70%, 95% e 100%) e xilol, com posterior montagem em meio de resina DPX (ThermoFisher Scientific, Loughborough, Reino Unido). As amostras foram então analisadas sob microscopia de luz.

5 RESULTADOS

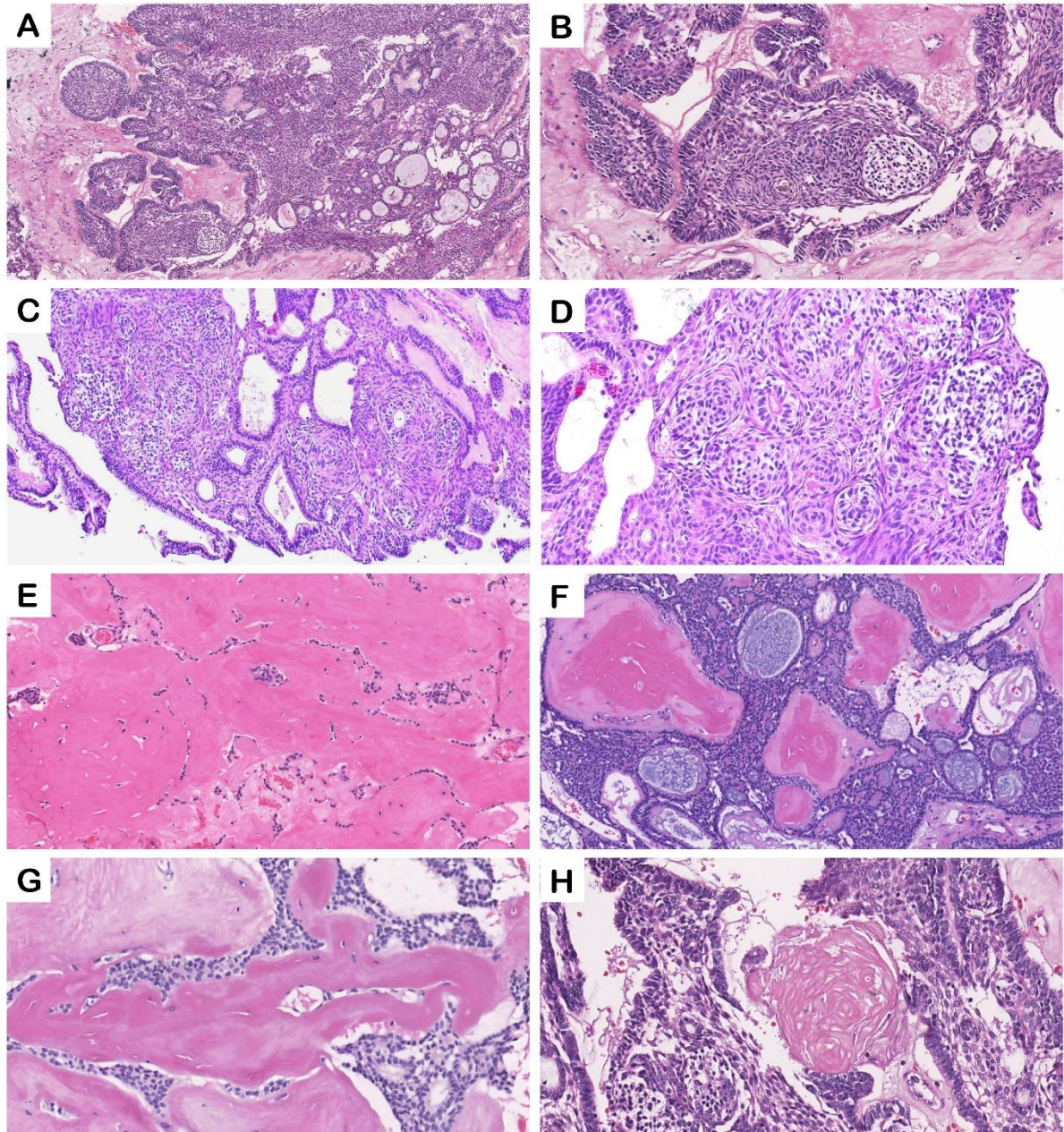
Os resultados aqui apresentados e discutidos para o ameloblastoma adenoide foram redigidos no formato de artigos científicos e foram publicados nos periódicos *Modern Pathology* (IF 2023 JCR: 7,1) e *Head and Neck Pathology* (IF 2023 JCR: 3,2). Os resultados relacionados à análise dos padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* na odontogênese murina foram elaborados em formato de artigo científico na língua inglesa e encontram-se em fase de redação final. Tais resultados seguem aqui apresentados em língua vernácula portuguesa. A primeira página dos artigos originais publicados em língua inglesa estão apresentados na seção **Apêndices**.

5.1 Descrição da amostra de ameloblastoma adenoide de estudo

Após obtenção das amostras, revisão de lâminas, coleta de dados clínicos e extração de gDNA, verificou-se que 5 casos não poderiam ser incluídos devido à insuficiência de material genético para as etapas subsequentes. Assim, foram analisadas amostras de 9 pacientes/casos, sendo que para um deles (paciente #6), 3 amostras foram analisadas, correspondendo a material do tumor primário e de duas recidivas consecutivas. Desta forma, um total de 11 amostras de 9 pacientes foram analisadas (**Tabela 1**).

Histologicamente, todas as amostras apresentaram epitélio semelhante ao ameloblastoma convencional, espaços semelhantes a ductos, e condensações celulares espiraladas reminiscentes de mórulas (**Figura 3A-D**), componentes que são critérios diagnósticos para a lesão. Células claras foram observadas em todos, exceto um dos casos (**Figura 3B-D**) e matriz dentinoide em 7/9 casos (**Figura 3E-G**). Células fantasmas (**Figura 3H**) foram observadas em 4/9 casos.

Figura 3 – Imagens representativas das características histopatológicas dos casos de ameloblastoma adenoide incluídos.



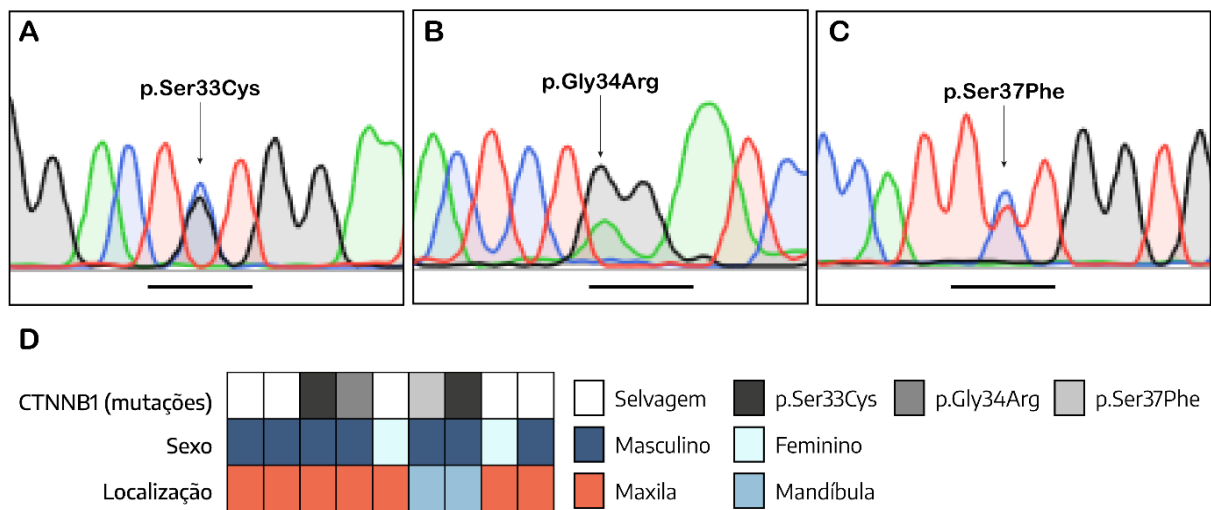
Legenda: Arranjo cribriforme do componente epitelial semelhante ao ameloblastoma, espaços semelhantes a ductos e estruturas de espiral ou mórulas foram observados em todos os casos (A, B, C e D). Aglomerados de células claras (B, C, D) e depósitos de material dentinoide (E, F e G) foram frequentemente observados. Células fantasmas (H) foram observadas com menos frequência. Aumento original: A, C (10×); D, E, F (20×); B (30×); G, H (40×). Coloração de hematoxilina-eosina.

Fonte: BASTOS et al., 2022.

5.2 Caracterização molecular do ameloblastoma adenoide

Seis das 11 amostras apresentaram mutações em *CTNNB1*, incluindo as 3 amostras derivadas do paciente #6, as quais demonstraram resultados moleculares concordantes. Assim, tumores de 4 dos 9 pacientes (44%) apresentaram mutações nos códons 33 (c.98C>G; p.Ser33Cys), 34 (c.100G>A; p.Gly34Arg) e 37 (c.110C>T; p.Ser37Phe). Os cromatogramas exibindo a variedade das mutações verificadas e o sumário dos dados moleculares encontrados estão apresentados na **Figura 4**.

Figura 4 – Cromatogramas ilustrando as mutações patogênicas em *CTNNB1* detectadas nos casos de ameloblastoma adenoide.



Legenda: Foram observadas as mutações p.Ser33Cys (c.98C>G), p.Gly34Arg (c.100G>A) e p.Ser37Phe (c.110C>T) (**A**, **B** e **C**, respectivamente). Um resumo das principais características clínicas e status mutacional relacionado ao gene *CTNNB1* é apresentado em **D**.

Fonte: Traduzido de BASTOS et al., 2022.

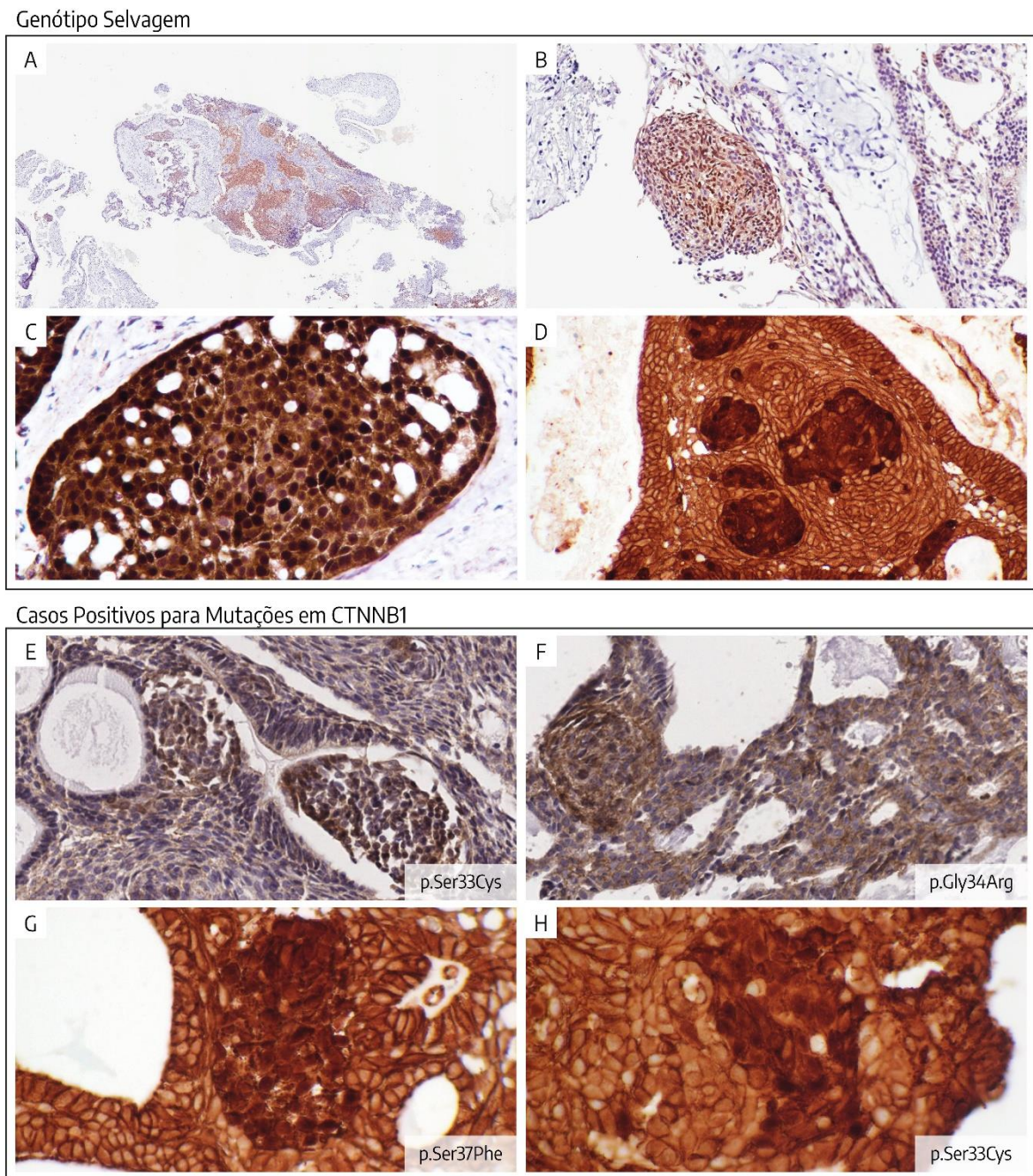
A **Tabela 1** reúne informações acerca das características clínicas, resultados da análise molecular e acerca dos achados microscópicos considerados desejáveis e/ou possivelmente presentes no ameloblastoma adenoide. A saber, células fantasmas foram observadas em 2/6 casos positivos para mutações em *CTNNB1* e, paralelamente, dois casos que exibiam células fantasmas demonstraram genótipo selvagem (*wild-type*) para tais mutações. Os resultados do sequenciamento para as regiões *hotspot* dos genes *BRAF* e *KRAS* demonstraram genótipo selvagem em todos

os casos investigados. Além disso, nenhuma diferença microscópica pôde ser observada entre casos positivos para mutações em *CTNNB1* e os negativos para as mutações.

5.3 Imuno-histoquímica

Reações de imuno-histoquímica foram realizadas em 8 dos 9 casos estudados, devido à limitação de material disponível para estudo. Todos os casos, à exceção de um (7/8), demonstraram imunopositividade nuclear focal e imunoexpressão citoplasmática/peri-membranosa de beta-catenina, independente do status mutacional (**Figura 5**). O caso #9 exibiu apenas expressão citoplasmática (não-mostrado).

Figura 5 – Imunoexpressão de beta-catenina em ameloblastoma adenoide.



Legenda: As fotomicrografias mostram a expressão nuclear focal de beta-catenina em casos de ameloblastoma adenoide tanto com genótipo selvagem para as mutações em *CTNNB1* (painel superior) quanto dos casos com mutação (painel inferior). Verificou-se também a imunopositividade no domínio peri-membranoso. Fotos **A** e **B**: caso #2; fotos **C** e **D**: casos #5 e #8, respectivamente. Os casos #3, #4, #6 e #7 são mostrados em **E**, **F**, **G** e **H**, respectivamente.

Fonte: Traduzido de BASTOS et al., 2022.

Tabela 1 – Informações clínicas, histopatológicas e moleculares dos casos de ameloblastoma adenoide analisados.

Caso #	Características Histopatológicas			Mutações		IHQ [§]	Sexo	Idade	Natureza da Lesão	Localização
	Células Fantasma	Material Dentinoide	Células Claras	<i>CTNNB1</i>	<i>BRAF</i> & <i>KRAS</i>					
1*	-	+	+	WT	WT	N.D.	M	34	Recorrente	Maxila esquerda (anterior e posterior)
2*	+	-	+	WT	WT	+	M	24	Primitiva	Maxila (posterior)
3*	+	+	+	p.Ser33Cys	WT	+	M	78	Primitiva	Maxila esquerda (invadindo fossa nasal)
4*	-	+	+	p.Gly34Arg	WT	+	M	41	Primitiva	Maxila posterior
5	-	+	-	WT	WT	+	F	62	Recorrente	Maxila direita (posterior)
6a**	+	+	+	p.Ser37Phe	WT	+	M	55	Primitiva	Mandíbula direita
6b**	-	+	+	p.Ser37Phe	WT	+	M	61	Recorrente	Mandíbula direita
6c**	-	-	+	p.Ser37Phe	WT	+	M	67	Recorrente	Mandíbula direita
7	-	+	+	p.Ser33Cys	WT	+	M	60	Primitiva	Mandíbula esquerda
8	-	+	+	WT	WT	+	F	27	Primitiva	Maxila esquerda
9	+	+	+	WT	WT	-	M	48	Recorrente	Maxila direita

Legenda: F, feminino; M, masculino; IHQ, imuno-histoquímica; N.D., Não disponível.

*Os casos 1-4 foram previamente testados para mutações *hotspot* em *BRAF* e *KRAS* (COURA et al., 2021).

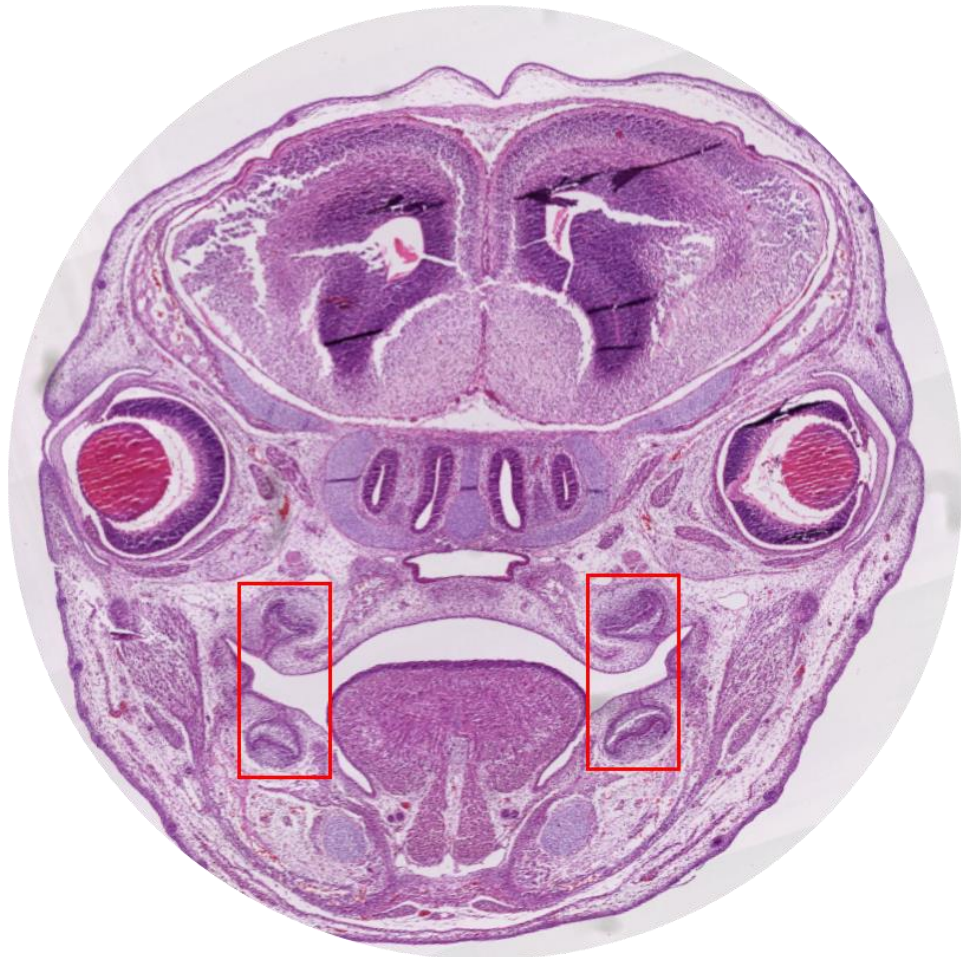
** Três amostras foram avaliadas para o paciente 6, incluindo uma do tumor primário (a) e duas recorrências consecutivas (b e c).

§ Imunopositividade nuclear focal.

5.4 Histologia dos germes dentários murinos e hibridização *in situ*

Secções teciduais coradas com hematoxilina e eosina representativas de cada estágio da odontogênese foram obtidas. Para melhor orientação acerca da localização dos germes dentários dos molares murinos, a **Figura 6** exibe um corte histológico correspondente à região de interesse. Os resultados das reações de hibridização *in situ* são apresentados na **Figura 7**.

Figura 6 – Corte histológico correspondente à seção coronal da região craniofacial em embrião murino em E15.5.



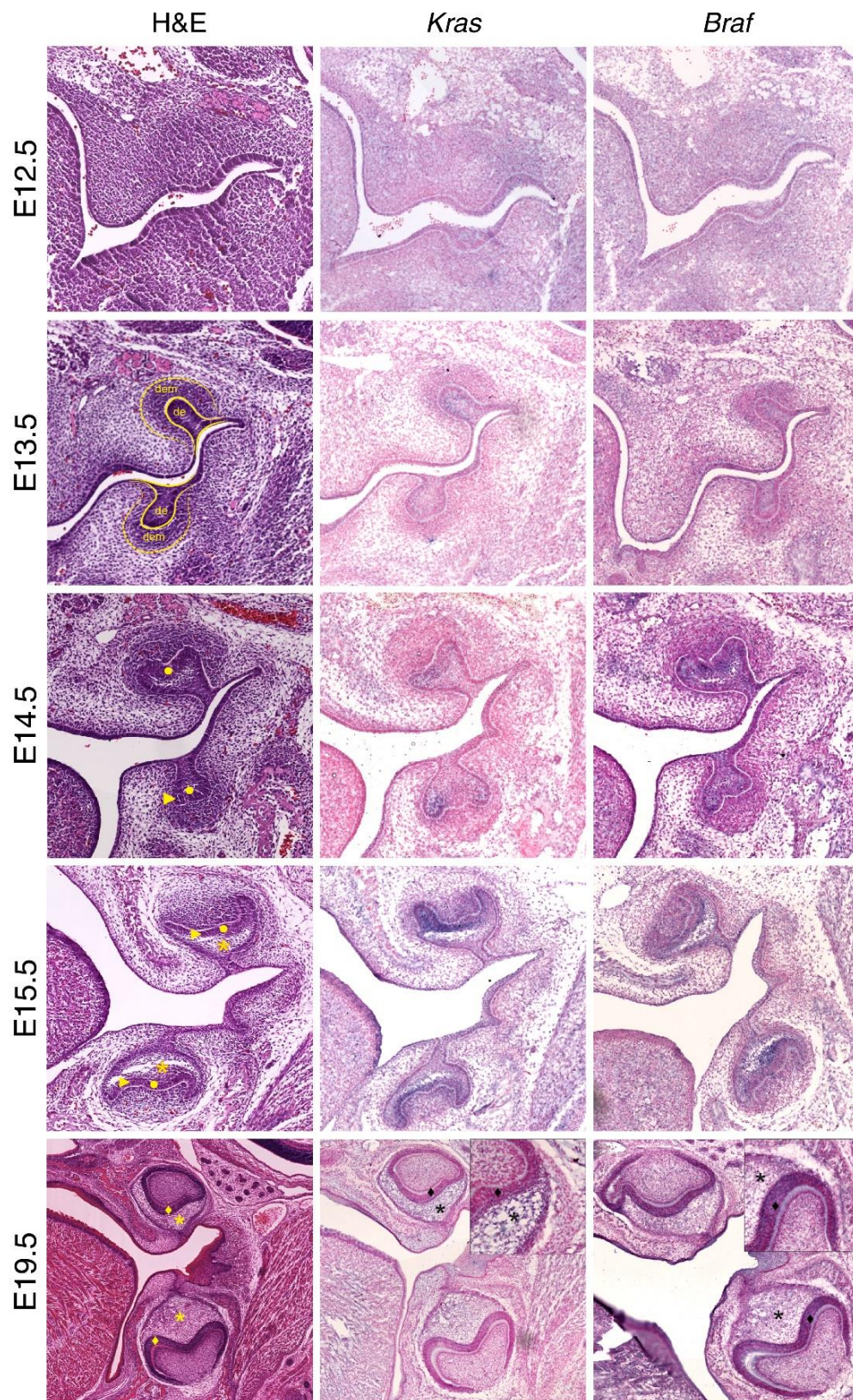
Legenda: A imagem corresponde ao mesmo plano anatômico do desenvolvimento ocular, permitindo a visualização simultânea de estruturas orbitárias, nasais e orais. Os germes dentários dos molares encontram-se destacados em vermelho. Medialmente aos germes dos molares mandibulares, identifica-se a língua em diferenciação, com organização epitelial superficial e tecido mesenquimal muscular subjacente. Na maxila, observam-se as alças palatinas já fusionadas na linha média, posicionadas medialmente aos molares superiores, indicando o avanço do processo de palatogênese. Corado com hematoxilina e eosina.

Fonte: Autoria própria.

A expressão de *Kras* foi predominantemente observada no epitélio dentário, especialmente nos estágios de botão tardio, capuz e campânula. Digno de nota, um padrão de expressão consistente foi identificado, com transcritos de *Kras* predominando na face mesial do epitélio dental durante o estágio de capuz, sendo observados tanto no epitélio interno do esmalte quanto no retículo estrelado ao redor da alça cervical em E14.5, expandindo-se para a região do nó do esmalte em E15.5. Neste estágio, *Kras* também foi expresso por células ectomesenquimais dispersas dentro da papila dentária. Em E19.5, a expressão de *Kras* foi predominante no retículo estrelado.

A expressão de *Braf* também foi observada no epitélio dentário, com um pico em E14.5 na região do nó do esmalte e posterior expansão para o epitélio interno do órgão do esmalte e retículo estrelado em E15.5. Em E19.5, *Braf* foi principalmente expresso por células associadas à camada ameloblástica e ao estrato intermediário. Células ectomesenquimais dispersas também demonstraram expressão de *Braf* a partir de E13.5, tanto na papila dentária quanto no folículo dentário.

Figura 7 – Histologia e resultados da análise dos padrões de expressão de *Kras* e *Braf* em tecidos dentários durante o desenvolvimento do molar murino.



Legenda: Cortes coronais craniofaciais correspondentes à região de desenvolvimento dos molares murinos. A expressão de *Kras* foi predominantemente no epitélio dentário (de, *dental*)

epithelia), com marcação no epitélio interno do órgão esmalte (►), no retículo estrelado (*), e no nó do esmalte (•) entre os estágios E14.5 e E15.5, além de ser observado dispersamente em células ectomesenquimais (dem, *dental ectomesenchyme*). No estágio E19.5, *Kras* apresentou expressão predominante no retículo estrelado (*). *Braf* exibiu um padrão de expressão semelhante, com pico de expressão no nó do esmalte (•) em E14.5, expandindo-se para o epitélio interno do esmalte (►) e para o retículo estrelado (*) em E15.5. No estágio E19.5, *Braf* foi principalmente expresso na camada ameloblástica e no estrato intermediário (♦, ver inserto), além de apresentar expressão ectomesenquimal dispersa a partir de E13.5. A marcação por hibridização corresponde à coloração azulada nas fotomicrografias representativas. Símbolos da legenda foram inseridos nas secções coradas com hematoxilina e eosina para servirem como referência. Nuclear Fast Red foi utilizado como contracoloração. Ampliação original: E12.5–E14.5 (10×); E15.5–E19.5 (8×); E19.5 - inserto (20×).

Fonte: A autoria própria.

6 DISCUSSÃO

Desde sua primeira aparição, e colecionando inúmeras nomenclaturas, o ameloblastoma adenoide foi interpretado como representante de um subgrupo agressivo de ameloblastoma, tendo sido definido por Brannon (1994) como uma *proliferação parenquimatosa semelhante ao tumor odontogênico adenomatoide associada a uma clara diferenciação ameloblástica*, por vezes associada a produção de material dentinoide (a qual deriva-se a nomenclatura “ameloblastoma adenoide com dentinoide”) (BRANNON, 1994). Para além das similaridades morfológicas, somam-se, ainda, o comportamento agressivo – por vezes comparado ao do carcinoma ameloblástico, e a elevada taxa de recidiva frente ao tratamento conservador (~70%) (ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; IDE *et al.*, 2009; KUMAR *et al.*, 2013; LOYOLA *et al.*, 2015; MATSUMOTO; MIZOUE; SETO, 2001). Considerando a pertinência de tal debate e o fato de ameloblastomas possuírem uma assinatura molecular conhecida (mutação *BRAF* p.Val600Glu, presente em até 80% das lesões), nosso grupo avaliou a presença de tal mutação numa coorte de 9 casos de ameloblastoma adenoide, as quais demonstraram genótipo selvagem para a mutação em *BRAF* (COURA *et al.*, 2021; GOMES, I. P. *et al.*, 2023; KURPPA *et al.*, 2014). Além disso, dada alguma similaridade histopatológica com o tumor odontogênico adenomatoide, a investigação de mutações afetando o códon 12 do gene *KRAS* (assinatura molecular desta lesão) também demonstrou genótipo selvagem nos casos de ameloblastoma adenoide investigados. Tais achados serviram de base para indicar que o ameloblastoma adenoide possuiria um *background* genético diferente das lesões às quais fora anteriormente comparado (COURA *et al.*, 2021).

As bases moleculares e patogênese do ameloblastoma adenoide permanecem ainda pouco explorados. Fatores como sua raridade, falta de critérios diagnósticos bem estabelecidos (parcialmente superada pela inclusão de características essenciais e desejáveis pela OMS) e recursos técnicos podem ser apontados. Partindo da premissa de que a presença de material dentinoide e de células fantasmas, características compartilhadas com outras lesões que possuem mutações no gene *CTNNA1*, poderiam sugerir a participação de tais mutações no desenvolvimento do ameloblastoma adenoide, neste trabalho, investigou-se 11 amostras de 9 pacientes com a lesão e 4/9 (44%) dos casos foram positivos para a mutação. Em especial, tais mutações não foram restritas a

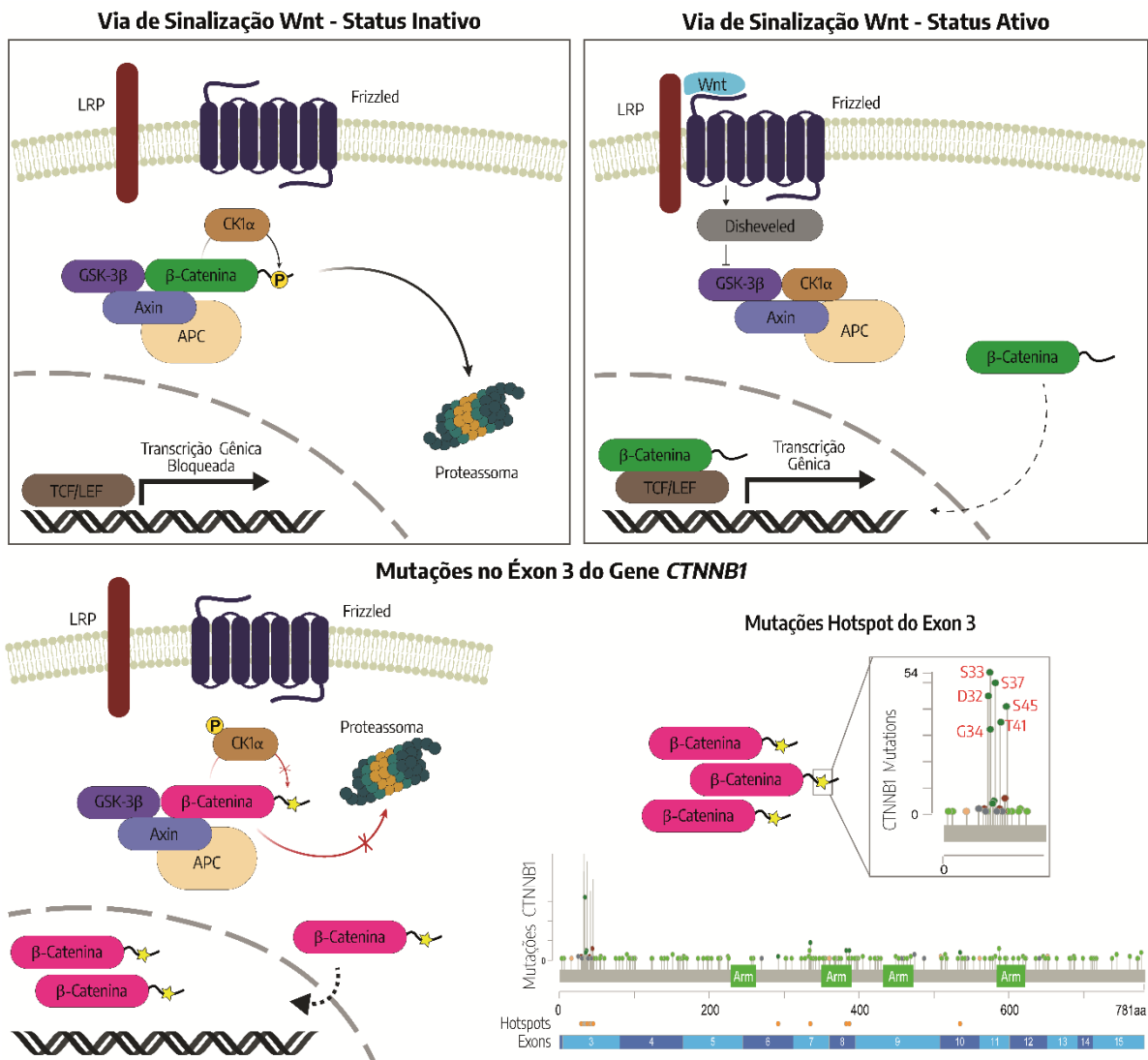
amostras que exibiam células fantasmas, e alguns casos exibindo este componente histopatológico não apresentaram mutações. A validação destes achados com técnicas mais sensíveis para detecção destas mutações poderá aumentar a confiança destes resultados. Ainda assim, pode-se sugerir que outras alterações genéticas possam explicar o padrão de queratinização aberrante observado nas células fantasmas.

As mutações identificadas neste estudo ocorreram nos códons 33, 34 e 37 do éxon 3 do gene *CTNNB1*, que codifica a proteína beta-catenina — um componente central da via de sinalização Wnt e amplamente implicado na oncogênese de diversas neoplasias humanas (KIM, S.; JEONG, 2019). O éxon 3 é particularmente relevante do ponto de vista funcional, pois codifica a porção N-terminal da beta-catenina, a qual abriga resíduos regulatórios críticos, incluindo Asp32, Ser33, Gly34, Ser37, Thr41, Ser45 e Leu46 (**Figura 8**). Essas regiões representam sítios fundamentais para o controle pós-traducional da estabilidade da proteína, por meio de fosforilação e posterior ubiquitinação. De forma canônica, a fosforilação inicial de Ser45 é mediada pela caseína quinase 1 alfa (CK1-alfa), tomando os resíduos subsequentes — Thr41, Ser37 e Ser33 — alvos para fosforilação pela glicogênio sintase quinase 3 beta (GSK-3beta). Esse processo fosforilativo é essencial para o reconhecimento da beta-catenina pelas ligases E3 contendo domínios beta-TrCP, que promovem sua ubiquitinação e direcionamento para degradação proteossomal (GAO, C. *et al.*, 2018; KIM, S.; JEONG, 2019; MARIN *et al.*, 2003).

Notavelmente, a maioria das mutações hotspot em *CTNNB1* concentra-se justamente nesses resíduos regulatórios, como Ser33, Gly34 e Ser37, conforme identificado na presente amostra. Essas substituições de aminoácidos resultam em impedimento direto da fosforilação ou na perda do reconhecimento por proteínas do complexo de destruição, levando ao acúmulo aberrante de beta-catenina no citoplasma e, subsequentemente, à sua translocação para o núcleo, onde atua como coativadora de fatores de transcrição da família TCF/LEF, promovendo a expressão de genes-alvo oncogênicos (**Figura 8**). Além disso, do ponto de vista estrutural, a região N-terminal da beta-catenina é considerada uma região espacialmente dinâmica e de difícil caracterização cristalográfica, devido à sua alta flexibilidade conformacional (GAO, C. *et al.*, 2018; KIM, S.; JEONG, 2019). Por esse motivo, alterações bioquímicas resultantes de mutações genéticas — especialmente substituições de resíduos regulatórios por aminoácidos de propriedades físico-químicas distintas — podem afetar profundamente a conformação local da proteína. Tais alterações comprometem a eficiência da fosforilação pelos complexos quinásicos e interferem na exposição dos

determinantes moleculares reconhecidos pelas ligases E3, tornando a beta-catenina resistente à degradação mediada pela via ubiquitina-proteassoma. Como consequência, essa desregulação pós-traducional favorece a sinalização constitutiva da via Wnt, fenômeno implicado na tumorigênese de múltiplos tecidos.

Figura 8 – Via de sinalização canônica Wnt/beta-catenina sob influência das proteínas beta-catenina selvagem (WT) e mutada.



Legenda: A via de sinalização Wnt/beta-catenina regula processos fisiológicos, incluindo o desenvolvimento embrionário, a homeostase tecidual e a regeneração tecidual. Distúrbios na via Wnt/beta-catenina foram implicados como causas de várias neoplasias humanas. Nós nos concentramos nas principais alterações da via desencadeadas pelo gene *CTNNB1* selvagem (painel superior) e mutado (painel inferior), que codifica a proteína beta-catenina. Na ausência de ligantes Wnt, a beta-catenina citoplasmática é fosforilada pela GSK-3beta e CK1alfa em resíduos de serina-treonina do terminal N, levando à sua destruição pela via ubiquitina-proteassoma. A ligação do Wnt aos receptores de superfície celular Frizzled e LRP impede a degradação mediada por fosforilação da proteína beta-catenina, resultando em um aumento significativo nos níveis citoplasmáticos de beta-catenina. A beta-catenina, então, transloca para o núcleo, onde pode interagir como coativador transcrricional com TCF/LEF, estimulando

a expressão de vários alvos nucleares. Mutações frequentes no éxon 3 que afetam os sítios de fosforilação/regulação da proteína interrompem a ubiquitinação dependente de fosforilação (setas vermelhas, painel inferior), levando à acumulação de beta-catenina e seus efeitos pró-tumorais. As mutações frequentes do éxon 3 de *CTNNB1* são marcadas no gráfico "pirulito" do cBioportal (CERAMI *et al.*, 2012; GAO, J. *et al.*, 2013).

Fonte: BASTOS *et al.*, 2022.

O acúmulo aberrante de beta-catenina nos compartimentos intracelulares desencadeia alterações no metabolismo celular e proliferação, ocasionando efeitos tumorigênicos (GAO, C. *et al.*, 2018; KIM, S.; JEONG, 2019). Ao encontro de tais eventos, a imunopositividade nuclear focal de beta-catenina foi observada em todos os casos positivos para a mutação e em 3/4 dos casos de genótipo selvagem (**Figura 5, Tabela 1**). Considerando que a maior parte dos casos selvagens também tenham exibido acúmulo nuclear da proteína, mutações afetando outros componentes do complexo de destruição da beta-catenina (por exemplo, mutações das proteínas APC e AXIN) ou mecanismos alternativos ativadores da via podem ser considerados (CHAN *et al.*, 1999; GONDAK *et al.*, 2020; KIM, S.-A. *et al.*, 2007). Além disso, mutações de baixa frequência nos genes avaliados podem não ser detectadas através da técnica de sequenciamento de Sanger, assim exigindo a utilização de plataformas de sequenciamento mais sensíveis. De forma importante, resultados comparáveis para os padrões de imunexpressão de beta-catenina foram reportados por dois grupos independentes (OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023), cujos respectivos trabalhos serão escrutinizados nos parágrafos a seguir.

Posteriormente à publicação de nossos resultados, dois grupos independentes reportaram a ocorrência da mutação *BRAF* p.Val600Glu em casos isolados de ameloblastoma adenoide (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Noda e colaboradores (2023) descrevem um caso único exibindo a mutação, embora a descrição dos achados histopatológicos fornecida pareça insuficiente para a conclusão diagnóstica de ameloblastoma adenoide. O artigo não menciona os critérios diagnósticos essenciais para o correto diagnóstico de ameloblastoma adenoide (NODA *et al.*, 2023; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Outros dois casos apresentando a mutação são reportados por Xue e colaboradores (2023), em uma coorte de 13 casos de ameloblastoma adenoide (XUE *et al.*, 2023). O mesmo trabalho ainda menciona a ocorrência da mutação *BRAF* p.Val600Glu em um caso de tumor dentinogênico de células fantasmas, e em dois casos de tumor odontogênico adenomatoide, sendo que em um destes, tal mutação co-ocorreu com a mutação

KRAS p.Gly12Val. Embora possível, a ocorrência de duas mutações em uma mesma via neste tumor é um evento raro. Além disto, reportam a mutação *BRAF* p.Val600Glu em 17/18 (94%) das amostras de ameloblastoma convencional incluídas, proporção consideravelmente superior àquela reportada em outras séries de casos e revisões de literatura (GOMES, I. P. *et al.*, 2023; GUIMARÃES *et al.*, 2021; KURPPA *et al.*, 2014; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024; XUE *et al.*, 2023). Com efeito, relatos sobre a ocorrência de mutações em *BRAF* em amostras de ameloblastoma adenoide permanecem isolados e requerem validação adicional (ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Além disso, todos os casos reportados por Xue e colaboradores (2023) exibiram imunopositividade para beta-catenina, evidenciando que novos estudos são necessários para avaliar melhor a correlação entre a imunexpressão de beta-catenina e mutações nos genes componentes das vias Wnt/beta-catenina e MAPK/ERK.

Outras lesões permeiam o diagnóstico diferencial do ameloblastoma adenoide. Comparado ao cisto odontogênico calcificante e ao tumor dentinogênico de células fantasmas, o diagnóstico de ameloblastoma adenoide pode ser feito baseado na presença dos arranjos pseudoglandulares, condensações moruliformes e estrutura cribriforme (ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; LOYOLA *et al.*, 2015; THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Em especial, com relação ao tumor dentinogênico de células fantasmas, a sobreposição de características histopatológicas com o ameloblastoma adenoide pode ser considerada crítica. Segundo a OMS, os critérios essenciais para o diagnóstico de tumor dentinogênico de células fantasmas incluem a natureza sólida da lesão, a presença de epitélio característico do ameloblastoma convencional, células fantasmas e a presença de material dentinoide (CARLOS; VERED, 2022). A estas características, somam-se algumas características desejáveis: figuras mitóticas escassas e pleomorfismo celular leve, possível em uma minoria dos casos, são admitidos (CARLOS; VERED, 2022). Ao que se observa, a presença de estruturas pseudoglandulares semelhantes a ductos e arranjo cribriforme não permeiam o diagnóstico do tumor dentinogênico de células fantasmas, ao passo que a combinação destas características e a formação de condensações celulares moruliformes constituem critérios essenciais para o diagnóstico do ameloblastoma adenoide (CARLOS; VERED, 2022; THAVARAJ; BILODEAU, 2023). Ainda assim, uma revisão sistemática, publicada por de Souza Vieira e colaboradores (2021), que incluiu 105

casos de tumor dentinogênico de células fantasmas publicados, apontou que 3,8% (5/130) das lesões exibiram estruturas pseudoglandulares/arranjo cribriforme (DE SOUZA VIEIRA *et al.*, 2021). Considerando a recente inclusão do ameloblastoma adenoide como entidade separada na nova Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS (2022) e a determinação de critérios essenciais e desejáveis para cada uma destas lesões, uma carta ao editor do periódico *Head and Neck Pathology*, com menção aos autores desta revisão sistemática foi redigida por nós e publicada (**Apêndice C**), destacando os critérios essenciais e desejáveis para o diagnóstico das duas lesões. Na mesma carta, sugerimos que previamente à catalogação do ameloblastoma adenoide enquanto entidade clínica, alguns casos de tumor dentinogênico de células fantasmas possam ter sido classificados de maneira imprecisa (BASTOS; GOMES; GOMEZ, 2022).

A semelhança clínica e histopatológica do ameloblastoma adenoide para com o tumor dentinogênico de células fantasmas fomentou ideias de que as duas lesões constituam um espectro de lesões sob um mesmo padrão de alterações moleculares na via Wnt/beta-catenina, conforme ponto levantado por Oh e colaboradores (2023). Estes autores apresentam dois casos de ameloblastoma adenoide “típicos”, e três casos de tumor dentinogênico de células fantasmas (OH; HONG; YOON, 2023). Duas amostras foram “diagnosticadas” como tumores “mistos”, por exibirem padrões histológicos compatíveis com as duas lesões, ameloblastoma adenoide e tumor dentinogênico de célula fantasmas. Além disso, uma amostra composta por células claras e abundante material dentinoide foi incluída e classificada como “*dentinoid-only*” devido à falta do epitélio típico de ameloblastoma adenoide e de células fantasmas. Tal ausência de critérios diagnósticos dificulta a interpretação dos resultados, embora os autores afirmem se basear nos critérios estabelecidos pela OMS (BASTOS *et al.*, 2023). Os autores depositam “peso” ao componente de células fantasmas, muito embora este constitua uma característica não essencial ao diagnóstico de ameloblastoma adenoide. Apesar da tendência de que tais células ocorram apenas focalmente no ameloblastoma adenoide, casos com abundância deste componente não necessariamente devam ser classificados de outra forma se todos os critérios essenciais estiverem presentes. Por outro lado, casos de tumor dentinogênico de células fantasmas que apresentem componente adenoide poderiam

ser melhor definidos como ameloblastoma adenoide (BASTOS; GOMES; GOMEZ, 2022; DE SOUZA VIEIRA *et al.*, 2021; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024).

Do ponto de vista molecular, para as amostras incluídas na coorte de Oh e colaboradores (2023), dois casos típicos de ameloblastoma adenoide exibiram mutações em componentes da via Wnt/beta catenina (1 caso com a mutação *APC* Glu789fs, e outro com a mutação *CTNNB1* Tyr333fs, ambos exibindo imunopositividade para beta-catenina); ao passo que 1 de 3 dos casos típicos de tumor dentinogênico de células fantasmas exibiu a mutação *APC* Gln1080* (OH; HONG; YOON, 2023). Atualmente, conforme apontado em revisão de literatura, somados os casos molecularmente caracterizados de ameloblastoma adenoide (inclusive os reportados nesta tese) e de tumor dentinogênico de células fantasmas, observa-se que 6/24 (25%) dos casos de ameloblastoma adenoide apresentam mutações em *CTNNB1*, e 1 de 2 casos da coorte de Oh e colaboradores exibiu mutação em *APC*; em contraste, 1/18 (5,5%) dos casos de tumor dentinogênico de células fantasmas exibiu mutação em *CTNNB1* e 1 de 3 casos da coorte de Oh e colaboradores exibiu mutação em *APC* (BASTOS *et al.*, 2022; KIM, S.-A. *et al.*, 2007; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024; OH; HONG; YOON, 2023; XUE *et al.*, 2023). Válido ressaltar que apenas 2/24 dos casos de ameloblastoma adenoide e 3/18 dos casos de tumor dentinogênico de células fantasmas que contam com alguma caracterização molecular foram avaliados através do sequenciamento completo de exoma (*whole-exome sequencing*) (OH; HONG; YOON, 2023), ferramenta importante para detecção de mutações em genes em que a determinação de *hotspots* é difícil (a exemplo do gene *APC*), o que ressalta a necessidade de estudos adicionais.

Além da aparente discrepância na frequência de mutações em genes da via Wnt/beta-catenina, o que enfraquece a noção de um espectro de lesões dirigido por mutações em comum, sabe-se que o compartilhamento de mutações em uma mesma via não necessariamente implica na determinação de um espectro da mesma doença. Tal relação pode ser exemplificada com o ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatoide, ambos caracterizados por mutações na via MAPK/ERK, que apresentam características clínicas e histológicas distintas e contrastantes (GUIMARÃES *et al.*, 2021). Além disso, para o estabelecimento da ideia de um espectro morfológico justificado por alterações na via Wnt/beta-catenina exigiria uma análise molecular aprofundada de várias outras lesões, tais como o cisto odontogênico

calcificante, tumor dentinogênico de células fantasmas, ameloblastoma adenoide, carcinoma odontogênico de células fantasmas e do carcinoma odontogênico com dentinoide, lesões para as quais mutações em genes da via Wnt/beta-catenina já foram reportadas (BASTOS *et al.*, 2023; BASTOS; GOMES; GOMEZ, 2022; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Acerca de tal proposta de fusão do ameloblastoma adenoide e do tumor dentinogênico de células fantasmas sob uma denominação comum ou espectro, uma segunda carta ao editor foi elaborada e publicada no periódico *Modern Pathology* (BASTOS *et al.*, 2023) (**Apêndice D**).

Para além desta discussão, outros diagnósticos diferenciais do ameloblastoma adenoide podem ser discutidos. Com relação ao carcinoma odontogênico de células fantasmas, a presença mais abundante de células fantasmas, conjugada ao fenótipo maligno das células neoplásicas auxiliam na diferenciação com o ameloblastoma adenoide (ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018; EL-NAGGAR. *et al.*, 2017; LOYOLA *et al.*, 2015; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024; VERED; WRIGHT, 2022). À parte destas três entidades reconhecidas pela OMS e pertencentes ao grupo de lesões ricas em células fantasmas, o carcinoma odontogênico com dentinoide constitui-se como outro mimetizador histológico do ameloblastoma adenoide. Trata-se de uma rara lesão maligna, de baixo grau, histologicamente caracterizada pela presença de lençóis e cordões epiteliais de células eosinofílicas, pálidas ou células claras, associados a depósitos de material dentinoide, e menos frequentemente, exibindo estruturas ductiformes (GONDAK *et al.*, 2020; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014; ODELL; GOMES; THAVARAJ, 2024). Diferentes graus de atipia podem ser observados, assim como invasão perineural e, de maneira importante, mutações nos genes *CTNNB1* e *APC*, ambos componentes da via Wnt/beta-catenina, foram reportados cada um em um caso deste tumor (GONDAK *et al.*, 2020). Conjuntamente, estes dados podem indicar que esta lesão represente a contraparte maligna do ameloblastoma adenoide, ainda que a presença de epitélio ameloblastomatoso não seja um componente expressivo no carcinoma odontogênico com dentinoide (GONDAK *et al.*, 2020; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Estudos adicionais poderão elucidar a relação entre os dois tumores.

Em uma segunda parte desta tese, investigamos a expressão dos genes *Kras* e *Braf*, codificantes de proteínas transdutoras de sinal da via MAPK/ERK, em molares de camundongos. A cascata MAPK/ERK é amplamente reconhecida por

desempenhar um papel central no desenvolvimento dentário; contudo, as funções específicas de seus componentes permanecem desconhecidas nesse contexto (MARANGONI *et al.*, 2015). A importância dessa via na regulação de aspectos como número, tamanho e forma dos dentes, por meio da modulação de funções celulares fundamentais, incluindo proliferação, sobrevivência, crescimento, metabolismo, migração e diferenciação celular, já foi demonstrada (BROOK *et al.*, 2014; LAN; JIA; JIANG, 2014; LI *et al.*, 2014; MARANGONI *et al.*, 2015; THESLEFF; SHARPE, 1997; TUCKER; SHARPE, 1999; TUMMERS; THESLEFF, 2009).

A via MAPK canônica compreende a cascata de proteínas RAS-RAF-MEK-ERK, cuja ativação é mediada por sinais extracelulares, tais como fatores de crescimento derivados de fibroblastos e do epitélio (FGFs e EGFs, respectivamente), que se ligam a seus receptores específicos (LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020; YOON; SEGER, 2006). Essa interação desencadeia a fosforilação sequencial dos componentes da cascata, culminando na ativação da ERK fosforilada sobre seus substratos e na regulação das funções biológicas celulares (GUIMARÃES *et al.*, 2021; LAVOIE; GAGNON; THERRIEN, 2020a; YOON; SEGER, 2006). Destaca-se que os padrões de expressão dos principais indutores da via MAPK/ERK, como FGF e seus receptores FGFR, bem como seus impactos biológicos e funcionais na ativação da via, têm sido amplamente explorados em amostras humanas e modelos murinos de odontogênese (BALIC; THESLEFF, 2015; HUANG *et al.*, 2015; JERNVALL *et al.*, 1994; KETTUNEN *et al.*, 2000; KETTUNEN; THESLEFF, 1998; LI *et al.*, 2014; LIN *et al.*, 2022; LIU, C. *et al.*, 2013; MITSIADIS *et al.*, 2008; NADIRI *et al.*, 2004; PORNTAVEETUS *et al.*, 2011; RUSSO; MAHARAJAN; MAHARAJAN, 1998; TAKAMORI *et al.*, 2008; TSUBOI *et al.*, 2003; TUCKER *et al.*, 1998).

Embora a ativação da via MAPK/ERK tenha sido amplamente estudada na odontogênese, os padrões de expressão de *Kras* e *Braf*, ambos componentes transdutores da cascata de sinalização, permanecem pouco esclarecidos. Essas informações são relevantes não apenas para caracterizar melhor a expressão dos genes da via MAPK/ERK durante desenvolvimento dentário, mas também para auxiliar na elucidação do papel desses genes na patogênese dos tumores odontogênicos. Como discutido previamente, mutações em *KRAS* e *BRAF* são altamente frequentes em tumores odontogênicos humanos.

Nas amostras analisadas no presente estudo, *Kras* foi predominantemente expresso nos estágios de capuz e campânula, especialmente nos aspectos mesiais do dente em desenvolvimento, sugerindo que este gene pode estar envolvido na proliferação celular do epitélio dentário e na morfogênese dentária. Resultados comparáveis foram obtidos por Huang et al. (2015) em amostras humanas, onde a imunoexpressão da proteína codificada pelo gene homólogo *KRAS* foi predominantemente observada no epitélio dentário durante os estágios de capuz, campânula e na fase de histodiferenciação, com pouca ou nenhuma expressão detectada no ectomesênquima dentário (HUANG et al., 2015). Assim, a expressão dos genes *Kras/KRAS* no componente epitelial do germe dentário dialoga com o papel de mutações neste gene observada em tumores odontogênicos epiteliais humanos, com destaque para o tumor odontogênico adenomatoide (COURA et al., 2019; GOMES, C. C. et al., 2016). De modo pertinente, em germes dentários quiméricos, compostos por epitélio dentário murino combinado com ectomesênquima dentário humano, observou-se forte imunoexpressão de *Kras* em ambos os compartimentos teciduais (epitélio e ectomesênquima), associada a um atraso na diferenciação ameloblástica, quando comparado ao germe dentário recombinante murino homogêneo (LIN et al., 2022).

Este é o primeiro estudo a investigar os padrões de expressão do gene *Braf* durante a odontogênese, impossibilitando comparações com relatos prévios. Notavelmente, a expressão sustentada de *Braf* observada na camada ameloblástica em E19.5 é compatível com a sua semelhança morfológica com o componente semelhante a ameloblastos presente em tumores odontogênicos epiteliais humanos, incluindo os ameloblastomas, os quais apresentam alta frequência de mutação *BRAF* (GOMES, I. P. et al., 2023; KURPPA et al., 2014). A expressão de *Braf* em células ectomesenquimais dispersas pode, ainda, correlacionar-se com a presença da mutação *BRAF* p.Val600Glu no componente ectomesenquimal de tumores odontogênicos mistos humanos, incluindo fibroma ameloblástico, fibrodentinoma ameloblástico, fibro-odontoma ameloblástico e fibrossarcoma ameloblástico (COURA et al., 2020). Neste contexto, estudos comparativos adicionais seriam relevantes para identificar semelhanças e diferenças entre a odontogênese murina e humana, bem como nas lesões odontogênicas.

Em suma, conseguimos identificar os padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* durante o desenvolvimento dos molares murinos, o que pode contribuir para uma melhor compreensão da regulação da via MAPK/ERK na odontogênese. A expressão desses genes durante o desenvolvimento dentário pode, em parte, esclarecer como mutações em *KRAS* e *BRAF* resultam em tumores odontogênicos humanos.

7 CONCLUSÃO

Neste estudo, reportamos pela primeira vez a ocorrência de mutações no éxon 3 do gene *CTNNB1* no ameloblastoma adenoide. A imunopositividade nuclear da beta-catenina sugere que a via Wnt/beta-catenina está ativada no tumor. Essa descoberta apoia a nova classificação da OMS dos tumores odontogênicos, a qual classifica o ameloblastoma adenoide como uma entidade separada do ameloblastoma convencional e seus subtipos, ao mesmo tempo que sustenta a possibilidade de uma relação da lesão com o carcinoma odontogênico com dentinoide e outros tumores odontogênicos contendo células fantasmas. Além disto, aprofundamos o debate acerca do diagnóstico diferencial do ameloblastoma adenoide e o tumor dentinogênico de células fantasmas, destacando sutilezas histopatológicas que podem orientar a diferenciação das duas lesões.

Adicionalmente, a partir da análise dos padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* em germes dentários de camundongos, foi possível identificar os padrões de expressão dos genes *Kras* e *Braf* durante o desenvolvimento dos molares murinos, o que pode contribuir para uma melhor compreensão da regulação da via MAPK/ERK na odontogênese. A expressão desses genes durante o desenvolvimento dentário pode, em parte, esclarecer como mutações em *KRAS* e *BRAF* resultam em tumores odontogênicos humanos. Além disso, esse conhecimento pode ser valioso para avanços na medicina e odontologia regenerativa, uma vez que a compreensão das vias de sinalização envolvidas na proliferação e diferenciação celulares pode favorecer o desenvolvimento de novas tecnologias e aplicações no campo da engenharia de tecidos.

REFERÊNCIAS

- ADORNO-FARIAS, D. *et al.* Ameloblastoma with adenoid features: A series of eight cases. *Acta Histochemica*, v. 120, n. 5, p. 468–476, jul. 2018.
- AGAIMY, A. *et al.* Ameloblastic fibrosarcoma: clinicopathological and molecular analysis of seven cases highlighting frequent BRAF and occasional NRAS mutations. *Histopathology*, v. 76, n. 6, p. 814–821, 16 maio 2020.
- BALIC, A.; THESLEFF, I. Tissue Interactions Regulating Tooth Development and Renewal. *Current Topics in Developmental Biology*. 1. ed. United States: Elsevier Inc., 2015. v. 115. p. 157–186.
- BASTOS, V. C. *et al.* Adenoid ameloblastoma harbors beta-catenin mutations. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, v. 35, n. 11, p. 1562–1569, nov. 2022.
- BASTOS, V. C. *et al.* Adenoid Ameloblastoma vs Dentinogenic Ghost Cell Tumor: Are They Related Entities? *Modern Pathology*, v. 36, n. 4, p. 100132, abr. 2023.
- BASTOS, V. C.; GOMES, C. C.; GOMEZ, R. S. Adenoid Ameloblastoma Versus Dentinogenic Ghost Cell Tumor. *Head and Neck Pathology*, v. 17, n. 1, p. 275–276, 28 set. 2022.
- BASTOS, V. C.; GOMEZ, R. S.; GOMES, C. C. Revisiting the human dental follicle: From tooth development to its association with unerupted or impacted teeth and pathological changes. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 251, n. 3, p. 408–423, 4 mar. 2022.
- BRANNON, R. B. Adenoid ameloblastoma with dentinoid. *Washington (DC). Armed Forces Institute of Pathology*, p. 1–94, 1994.
- BROOK, A. *et al.* The dentition: the outcomes of morphogenesis leading to variations of tooth number, size and shape. *Australian Dental Journal*, v. 59, n. s1, p. 131–142, 20 jun. 2014.
- BUCHTOVÁ, M. *et al.* Early Regression of the Dental Lamina Underlies the Development of Diphyodont Dentitions. *Journal of Dental Research*, v. 91, n. 5, p. 491–498, 22 maio 2012.
- CARBALLO, G. B. *et al.* A highlight on Sonic hedgehog pathway. *Cell Communication and Signaling*, v. 16, n. 1, p. 11, 20 dez. 2018.
- CARDIFF, R. D. *et al.* Multiple tumor types appear in a transgenic mouse with the ras

oncogene. *The American journal of pathology*, v. 142, n. 4, p. 1199–207, abr. 1993.

CARLOS, R.; VERED, M. Dentinogenic ghost cell tumour. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD, . (Org.). . *WHO classification of Head and Neck Tumours*. 5th Ed., V ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2022. .

CERAMI, E. *et al.* The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer discovery*, v. 2, n. 5, p. 401–4, maio 2012.

CHEN, X. *et al.* Endogenous expression of Hras(G12V) induces developmental defects and neoplasms with copy number imbalances of the oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 106, n. 19, p. 7979–84, 12 maio 2009.

CLEVERS, H.; NUSSE, R. Wnt/ β -Catenin Signaling and Disease. *Cell*, v. 149, n. 6, p. 1192–1205, jun. 2012.

COURA, B. P. *et al.* Adenoid ameloblastoma with dentinoid is molecularly different from ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v. 50, n. 10, p. 1067–1071, 29 nov. 2021.

COURA, B. P. *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Modern Pathology*, v. 32, n. 6, p. 799–806, 14 jun. 2019.

COURA, B. P. *et al.* Targeted Next-Generation Sequencing and Allele-Specific Quantitative PCR of Laser Capture Microdissected Samples Uncover Molecular Differences in Mixed Odontogenic Tumors. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*, v. 22, n. 12, p. 1393–1399, dez. 2020.

DE SOUZA VIEIRA, G. *et al.* Comparative Analysis Between Dentinogenic Ghost Cell Tumor and Ghost Cell Odontogenic Carcinoma: A Systematic Review. *Head and Neck Pathology*, v. 15, n. 4, p. 1265–1283, 14 dez. 2021.

DINIZ, M. G. *et al.* Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncology*, v. 72, p. 165–173, set. 2017.

DUARTE-ANDRADE, F. F. *et al.* A review of the molecular profile of benign and malignant odontogenic lesions. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 129, n. 4, p. 357–368, abr. 2020.

EL-NAGGAR, A. K. *et al.* Odontogenic and maxillofacial bone tumours. In: EL-NAGGAR, A. K. . *et al.* (Org.). . *WHO classification of Head and Neck Tumours*. 4th.

ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017. p. 206–260.

FONS ROMERO, J. M. *et al.* The Impact of the Eda Pathway on Tooth Root Development. *Journal of Dental Research*, v. 96, n. 11, p. 1290–1297, 16 out. 2017.

GAO, C. *et al.* Exon 3 mutations of CTNNB1 drive tumorigenesis: A review. *Oncotarget*, v. 9, n. 4, p. 5492–5508, 2018.

GAO, J. *et al.* Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science signaling*, v. 6, n. 269, p. pl1, 2 abr. 2013.

GIBSON, C. W. *et al.* Odontogenic tumors in mice carrying albumin-myc and albumin-rats transgenes. *Calcified tissue international*, v. 51, n. 2, p. 162–7, ago. 1992.

GILES, R. H.; VAN ES, J. H.; CLEVERS, H. Caught up in a Wnt storm: Wnt signaling in cancer. *Biochimica et biophysica acta*, v. 1653, n. 1, p. 1–24, 5 jun. 2003.

GOMES, C. C. Recurrent driver mutations in benign tumors. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*, v. 789, n. November 2021, p. 108412, jan. 2022.

GOMES, C. C. *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncology*, v. 56, p. e3–e5, maio 2016.

GOMES, C. C.; DE SOUSA, S. F.; GOMEZ, R. S. Craniopharyngiomas and odontogenic tumors mimic normal odontogenesis and share genetic mutations, histopathologic features, and molecular pathways activation. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 127, n. 3, p. 231–236, mar. 2019.

GOMES, I. P. *et al.* The molecular basis of odontogenic cysts and tumours. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 52, n. 4, p. 351–356, 23 abr. 2023.

GONDAK, R. O. *et al.* CTNNB1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 129, n. 5, p. e249–e256, maio 2020.

GOODWIN, A. F. *et al.* Abnormal Ras signaling in Costello syndrome (CS) negatively regulates enamel formation. *Human molecular genetics*, v. 23, n. 3, p. 682–92, 1 fev. 2014.

GUIMARÃES, L. M. *et al.* The Molecular Pathology of Odontogenic Tumors: Expanding the Spectrum of MAPK Pathway Driven Tumors. *Frontiers in Oral Health*, v. 2, n. September, p. 740788, 14 set. 2021.

HASSANEIN, A. M. *et al.* β -Catenin Is Expressed Aberrantly in Tumors Expressing Shadow Cells. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 120, n. 5, p. 732–736, 1 nov. 2003.

HASTON, S. *et al.* MAPK pathway activation in the embryonic pituitary results in stem cell compartment expansion, differentiation defects and provides insights into the pathogenesis of papillary craniopharyngioma. *Development*, 1 jan. 2017.

HOVORAKOVA, M. *et al.* Early development of the human dentition revisited. *Journal of Anatomy*, v. 233, n. 2, p. 135–145, 2018.

HUANG, F. *et al.* Expression profile of critical genes involved in FGF signaling pathway in the developing human primary dentition. *Histochemistry and Cell Biology*, v. 144, n. 5, p. 457–469, 13 nov. 2015.

IDE, F. *et al.* Diagnostically Challenging Epithelial Odontogenic Tumors: A Selective Review of 7 Jawbone Lesions. *Head and Neck Pathology*, v. 3, n. 1, p. 18–26, 20 mar. 2009.

JERNVALL, J. *et al.* Evidence for the role of the enamel knot as a control center in mammalian tooth cusp formation: non-dividing cells express growth stimulating Fgf-4 gene. *The International journal of developmental biology*, v. 38, n. 3, p. 463–9, set. 1994.

KETTUNEN, P. *et al.* Associations of FGF-3 and FGF-10 with signaling networks regulating tooth morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 219, n. 3, p. 322–32, nov. 2000.

KETTUNEN, P.; THESLEFF, I. Expression and function of FGFs-4, -8, and -9 suggest functional redundancy and repetitive use as epithelial signals during tooth morphogenesis. *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists*, v. 211, n. 3, p. 256–68, mar. 1998.

KIM, S.-A. *et al.* Investigation of the β -catenin gene in a case of dentinogenic ghost cell tumor. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology*, v. 103, n. 1, p. 97–101, jan. 2007.

KIM, S.; JEONG, S. Mutation Hotspots in the β -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. *Molecules and cells*, v. 42, n. 1, p. 8–16, 31 jan. 2019.

KOUSSOULAKOU, D. S.; MARGARITIS, L. H.; KOUSSOULAKOS, S. L. A curriculum vitae of teeth: evolution, generation, regeneration. *International journal of biological sciences*, v. 5, n. 3, p. 226–243, 2009.

KRISHNA, M.; NARANG, H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cellular and Molecular Life Sciences*, v. 65, n. 22, p. 3525–

3544, 1 nov. 2008.

KUMAR, K. *et al.* Dentinoameloblastoma with ghost cells: A rare case report with emphasis on its biological behavior. *Dental research journal*, v. 10, n. 1, p. 103–7, jan. 2013.

KURPPA, K. J. *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *The Journal of Pathology*, v. 232, n. 5, p. 492–498, abr. 2014.

LAN, Y.; JIA, S.; JIANG, R. Molecular patterning of the mammalian dentition. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 25–26, p. 61–70, jan. 2014.

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 10, p. 607–632, 2020a.

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN, M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, v. 21, n. 10, p. 607–632, 23 out. 2020b.

LI, C.-Y. *et al.* Fibroblast growth factor signaling in mammalian tooth development. *Odontology*, v. 102, n. 1, p. 1–13, 17 jan. 2014.

LIN, C. *et al.* FGF8-mediated signaling regulates tooth developmental pace during odontogenesis. *Journal of Genetics and Genomics*, v. 49, n. 1, p. 40–53, jan. 2022.

LIU, C. *et al.* FGF signaling sustains the odontogenic fate of dental mesenchyme by suppressing β -catenin signaling. *Development (Cambridge, England)*, v. 140, n. 21, p. 4375–85, nov. 2013.

LIU, J. *et al.* Wnt/ β -catenin signalling: function, biological mechanisms, and therapeutic opportunities. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, v. 7, n. 1, p. 3, 3 jan. 2022.

LOYOLA, A. M. *et al.* Adenoid ameloblastoma: clinicopathologic description of five cases and systematic review of the current knowledge. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 120, n. 3, p. 368–377, set. 2015.

MANKAPURE, P. K. Ghost Cells and its Histogenesis: A Narrative Review. *IJSS Case Reports & Reviews*, v. 2, n. 6, p. 35–39, 2017.

MARANGONI, P. *et al.* Phenotypic and evolutionary implications of modulating the ERK-MAPK cascade using the dentition as a model. *Scientific Reports*, v. 5, n. 1, p. 11658, 30 jun. 2015.

MARÍN, C.; NIKLANDER, S. E.; MARTÍNEZ-FLORES, R. Genetic Profile of

Adenomatoid Odontogenic Tumor and Ameloblastoma. A Systematic Review. *Frontiers in Oral Health*, v. 2, 15 nov. 2021.

MARIN, O. *et al.* A noncanonical sequence phosphorylated by casein kinase 1 in beta-catenin may play a role in casein kinase 1 targeting of important signaling proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 100, n. 18, p. 10193–200, 2 set. 2003.

MATALOVA, E.; TUCKER, A. S.; SHARPE, P. T. Death in the Life of a Tooth. *Journal of Dental Research*, v. 83, n. 1, p. 11–16, 20 jan. 2004.

MATSUMOTO, Y.; MIZOUE, K.; SETO, K. Atypical plexiform ameloblastoma with dentinoid: adenoid ameloblastoma with dentinoid. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 30, n. 4, p. 251–254, abr. 2001.

MITSIADIS, T. A. *et al.* A regulatory relationship between Tbx1 and FGF signaling during tooth morphogenesis and ameloblast lineage determination. *Developmental biology*, v. 320, n. 1, p. 39–48, 1 ago. 2008.

MOSQUEDA-TAYLOR, A. *et al.* Odontogenic Carcinoma with Dentinoid: A New Odontogenic Carcinoma. *Head and Neck Pathology*, v. 8, n. 4, p. 421–431, 20 dez. 2014.

NADIRI, A. *et al.* Immunolocalization of BMP-2/-4, FGF-4, and WNT10b in the developing mouse first lower molar. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, v. 52, n. 1, p. 103–12, jan. 2004.

NAKAMURA, T. Shadow Cell Differentiation: A Comparative Analysis of Modes of Cell Death with Apoptosis and Epidermal/Trichilemmal Keratinization. *Dermatopathology*, v. 5, n. 3, p. 86–97, 19 jul. 2018.

NEWBERN, J. *et al.* Mouse and human phenotypes indicate a critical conserved role for ERK2 signaling in neural crest development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, v. 105, n. 44, p. 17115–17120, 4 nov. 2008.

NODA, Y. *et al.* Adenoid Ameloblastoma with BRAF p.V600E Mutation Revealing Ameloblastomatous Origin: A First Case Report. *Head and Neck Pathology*, v. 17, n. 3, p. 788–792, 24 abr. 2023.

ODELL, E. W.; GOMES, C. C.; THAVARAJ, S. The evolving molecular characterisation, histological criteria and nomenclature of adenoid ameloblastoma as a World Health Organisation tumour type. *Histopathology*, 24 jun. 2024.

OH, K.-Y.; HONG, S.-D.; YOON, H.-J. Adenoid Ameloblastoma Shares Clinical, Histologic, and Molecular Features With Dentinogenic Ghost Cell Tumor: The Histologic Spectrum of WNT Pathway–Altered Benign Odontogenic Tumors. *Modern Pathology*, p. 100051, jan. 2023a.

OH, K.-Y.; HONG, S.-D.; YOON, H.-J. Adenoid Ameloblastoma Shares Clinical, Histologic, and Molecular Features With Dentinogenic Ghost Cell Tumor: The Histologic Spectrum of WNT Pathway–Altered Benign Odontogenic Tumors. *Modern Pathology*, v. 36, n. 3, p. 100051, mar. 2023b.

PAVINATO, L.; BAGGIOLINI, A. Oncogenic competence: balancing mutations, cellular state, and microenvironment. *Trends in Cancer*, v. 11, n. 4, p. 276–285, abr. 2025.

PORNTAVEETUS, T. *et al.* Expression of fibroblast growth factors (Fgfs) in murine tooth development. *Journal of anatomy*, v. 218, n. 5, p. 534–43, maio 2011.

RUMAYOR, A. *et al.* Ghost cells in pilomatrixoma, craniopharyngioma, and calcifying cystic odontogenic tumor: histological, immunohistochemical, and ultrastructural study. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 44, n. 4, p. 284–290, abr. 2015.

RUSSO, L. G.; MAHARAJAN, P.; MAHARAJAN, V. Basic fibroblast growth factor (FGF-2) in mouse tooth morphogenesis. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, v. 15, n. 2, p. 125–33, 1998.

SAJEDI, E. *et al.* Analysis of mouse models carrying the I26T and R160C substitutions in the transcriptional repressor HESX1 as models for septo-optic dysplasia and hypopituitarism. *Disease Models & Mechanisms*, v. 1, n. 4–5, p. 241–254, 21 nov. 2008.

SEKINE, S. *et al.* Craniopharyngiomas of Adamantinomatous Type Harbor β -Catenin Gene Mutations. *The American Journal of Pathology*, v. 161, n. 6, p. 1997–2001, dez. 2002.

SEKINE, S. *et al.* β -Catenin Mutations Are Frequent in Calcifying Odontogenic Cysts, but Rare in Ameloblastomas. *The American Journal of Pathology*, v. 163, n. 5, p. 1707–1712, nov. 2003.

SHARPE, P. T. Neural Crest and Tooth Morphogenesis. *Advances in Dental Research*, v. 15, n. 1, p. 4–7, 2001.

TAKAMORI, K. *et al.* Epithelial fibroblast growth factor receptor 1 regulates enamel formation. *Journal of dental research*, v. 87, n. 3, p. 238–43, mar. 2008.

THAVARAJ, S.; BILODEAU, E. A. Adenoid Ameloblastoma. In: WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD, .. (Org.). . *Head and neck tumours (WHO classification of tumours series)*. 5th Ed., V ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2023. .

THESLEFF, I.; SHARPE, P. Signalling networks regulating dental development. *Mechanisms of Development*, v. 67, n. 2, p. 111–123, out. 1997.

TRAVAGLINO, A. *et al.* Does endometrial morular metaplasia represent odontogenic differentiation? *Virchows Archiv*, v. 479, n. 3, p. 607–616, 5 set. 2021.

TSUBOI, T. *et al.* Fgf-2 regulates enamel and dentine formation in mouse tooth germ. *Calcified tissue international*, v. 73, n. 5, p. 496–501, nov. 2003.

TUCKER, A. S. *et al.* A novel approach for inhibiting growth factor signalling in murine tooth development. Inhibition of FGF's. *European journal of oral sciences*, v. 106 Suppl, p. 122–5, jan. 1998.

TUCKER, A. S.; SHARPE, P. T. Molecular Genetics of Tooth Morphogenesis and Patterning: The Right Shape in the Right Place. *Journal of Dental Research*, v. 78, n. 4, p. 826–834, 1999.

TUMMERS, M.; THESLEFF, I. The importance of signal pathway modulation in all aspects of tooth development. *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, v. 312B, n. 4, p. 309–319, 15 jun. 2009.

VERED, M.; WRIGHT, J. M. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. *Head and Neck Pathology*, v. 16, n. 1, p. 63–75, 21 mar. 2022.

WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD, . *Head and neck tumours (WHO classification of tumours series)*. 5th. Ed.; ed. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2023.

WRIGHT, J. T. *et al.* Odontogenic tumours in the v-Ha-ras (TG.AC) transgenic mouse. *Archives of oral biology*, v. 40, n. 7, p. 631–8, jul. 1995.

XUE, J. *et al.* Adenoid Ameloblastoma Shares Clinicopathologic, Immunohistochemical, and Molecular Features With Dentinogenic Ghost Cell Tumor. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 47, n. 11, p. 1274–1284, 1 nov. 2023.

YOON, S.; SEGER, R. The extracellular signal-regulated kinase: multiple substrates regulate diverse cellular functions. *Growth factors (Chur, Switzerland)*, v. 24, n. 1, p. 21–44, mar. 2006.

APÊNDICE A – Parecer Consubstanciado/Aprovação pelo Comitê de Ética em pesquisa (COEP-UFMG)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Avaliação de alterações genéticas em folículos dentários e tumores odontogênicos

Pesquisador: Carolina Cavalieri Gomes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 30556120.0.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.228.043

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 20 de Agosto de 2020

Assinado por:
Críssia Carem Paiva Fontainha
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

APÊNDICE B – Primeira página do artigo elaborado e publicado no periódico *Modern Pathology*.



www.nature.com/modpathol

ARTICLE



Adenoid ameloblastoma harbors beta-catenin mutations

Victor Coutinho Bastos^{1,10}, Bruna Pizzolo Coura^{1,10}, Letícia Martins Guimarães¹, Bianca Gomes Fernandes², Alexander Chak-Lam Chan³, Pablo Agustin Vargas⁴, Luciana Bastos-Rodrigues², Luiz Armando De Marco⁵, John Hellstein⁶, Selvam Thavaraj⁷, John M. Wright⁸, Edward William Odell⁷, Ricardo Santiago Gomez⁹ and Carolina Cavaliéri Gomes¹✉

© The Author(s), under exclusive licence to United States & Canadian Academy of Pathology 2022

Adenoid ameloblastoma is a very rare benign epithelial odontogenic tumor characterized microscopically by epithelium resembling conventional ameloblastoma, with additional duct-like structures, epithelial whorls, and cribriform architecture. Dentinoid deposits, clusters of clear cells, and ghost-cell keratinization may also be present. These tumors do not harbor *BRAF* or *KRAS* mutations and their molecular basis appears distinct from conventional ameloblastoma but remains unknown. We assessed *CTNNB1* (beta-catenin) exon 3 mutations in a cohort of 11 samples of adenoid ameloblastomas from 9 patients. Two of the 9 patients were female and 7 male and in 7/9 patients the tumors occurred in the maxilla. Tumors of 4 of these 9 patients harbored *CTNNB1* mutations, specifically p.Ser33Cys, p.Gly34Arg, and p.Ser37Phe. Notably, for one patient 3 samples were analyzed including the primary tumour and two consecutive recurrences, and results were positive for the mutation in all three tumors. Therefore, 6/11 samples tested positive for the mutation. In the 6 mutation-positive samples, ghost cells were present in only 2/6, indicating beta-catenin mutations are not always revealed by ghost cell formation. Dentinoid matrix deposition was observed in 5/6 mutation-positive samples and clear cells in all 6 cases. None of the cases harbored either *BRAF* or *KRAS* mutations. Beta-catenin immunorexpression was assessed in the samples of 8 patients. Except for one wild-type case, all cases showed focal nuclear expression irrespective of the mutational status. Together with the absence of *BRAF* mutation, the detection of beta-catenin mutation in adenoid ameloblastomas supports its classification as a separate entity, and not as a subtype of ameloblastoma. The presence of this mutation may help in the diagnosis of challenging cases.

Modern Pathology; <https://doi.org/10.1038/s41379-022-01125-4>

INTRODUCTION

Adenoid ameloblastoma, also referred to as adenoid ameloblastoma with dentinoid, is a very rare epithelial odontogenic neoplasm. Adenoid ameloblastoma is locally infiltrative, with an aggressive clinical behavior and high recurrence rates after enucleation (approximately 70%)^{1–3}. Approximately 40 cases have been published revealing a peak incidence in the 4th decade (range 25–52 years), slight female predominance, and similar demographics to ameloblastoma^{1,2}. It tends to affect the mandible (64.7%) and it is usually characterized by a painless swelling². Radiographically, at diagnosis the majority (~82%) of tumors have presented as radiolucent lesions, or with occasional radiopaque foci, ill-defined borders, and cortical perforation.

Histologically, adenoid ameloblastoma is characterized by the presence of epithelium resembling conventional ameloblastoma, with additional duct-like structures, epithelial whorls, and cribriform architecture^{1–4}. Dentinoid deposits, clusters of clear cells, and ghost-cell keratinization may also be present^{1,2,4}. Some of these features resemble ameloblastoma, and adenoid elements

resemble adenomatoid odontogenic tumor¹. On the basis of the microscopic similarities to ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumor, our group recently screened a convenience sample of adenoid ameloblastoma for *BRAF* p.Val600Glu and *KRAS* p.Gly12Val and p.Gly12Arg mutations⁴, which are hallmarks of ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors, respectively^{5–7}. All nine samples tested were wild-type for both these pathogenic mutations⁴.

Another histopathological differential diagnosis for adenoid ameloblastoma is dentinogenic ghost cell tumor, and aggressive cases may show overlapping microscopic features with odontogenic carcinoma with dentinoid, for which no clear distinguishing diagnostic criteria have been established^{1,2}. Dentinogenic ghost cell tumors^{8,9}, and odontogenic carcinoma with dentinoid¹⁰ harbor *CTNNB1* (beta-catenin) exon 3 mutations, similar to other lesions rich in ghost cells such as calcifying odontogenic cysts¹¹.

Given the absence in adenoid ameloblastoma of the signature mutations of adenomatoid odontogenic tumor and ameloblastoma and the presence of *CTNNB1* mutation in other microscopic

¹Department of Pathology, Biological Science Institute (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. ²Department of Nutrition, Faculdade de Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. ³Department of Pathology, Queen Elizabeth Hospital, Hong Kong Special Administrative Region, Hong Kong, China. ⁴Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, Universidade de Campinas, Piracicaba, Brazil. ⁵Department of Surgery, School of Medicine, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. ⁶Department of Oral Pathology, Radiology and Medicine, University of Iowa, Iowa City, IA, USA. ⁷Head and Neck Pathology, King's College London (KCL), Guy's Hospital, London, OH, USA. ⁸Diagnostic Sciences Department, TAMU College of Dentistry, Dallas, TX, USA. ⁹Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil. ¹⁰These authors contributed equally: Victor Coutinho Bastos, Bruna Pizzolo Coura. ✉email: gomes.carolinac@gmail.com

Received: 3 March 2022 Revised: 8 June 2022 Accepted: 9 June 2022
Published online: 15 July 2022

APÊNDICE C – Primeira página da carta ao Editor elaborada e publicada no periódico *Head & Neck Pathology*

Head and Neck Pathology
<https://doi.org/10.1007/s12105-022-01482-1>

LETTERS TO THE EDITOR



Adenoid Ameloblastoma *Versus* Dentinogenic Ghost Cell Tumor

Victor Coutinho Bastos¹ · Carolina Cavaliéri Gomes¹ · Ricardo Santiago Gomez²

Received: 24 June 2022 / Accepted: 28 July 2022

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2022

Abstract

Background A recent systematic review published in *Head and Neck Pathology* found that 3.8% of dentinogenic ghost cell tumors harbor duct-like/ cribriform architecture. Herein we discuss this finding regarding the differential diagnosis of this tumor with adenoid ameloblastoma.

Methods A critical review of some microscopic findings reported in a recent paper published in the *Head and Neck Pathology Journal* was done.

Results Although there are overlapping microscopic features with dentinogenic ghost cell tumor, adenoid ameloblastoma is distinguished by the combination of duct-like structures and whorls/morules. In our opinion, at least some cases previously diagnosed as dentinogenic ghost cell tumors may now be more accurately classified as adenoid ameloblastoma.

Conclusion We conclude that a reassessment of dentinogenic ghost cell tumor cases using the diagnostic criteria proposed by the new WHO classification of *Head and Neck Tumors (2022)* is warranted.

Keywords dentinogenic ghost cell tumor · adenoid ameloblastoma · ghost cell lesions · diagnosis · *CTNNT1* mutations

Dear Editor,

We read with great interest the article entitled ‘Comparative Analysis Between Dentinogenic Ghost Cell Tumor and Ghost Cell Odontogenic Carcinoma: A Systematic Review’, conducted by de Souza Vieira and colleagues [1]. We congratulate the authors on the systematic review. In particular, it has come to our attention that according to their review, 3.8% of dentinogenic ghost cell tumors presented adenoid-like/cribriform architecture. In light of the classification of adenoid ameloblastoma in the recently published World Health Organization (WHO) Classification of Head and Neck tumors 2022 [2], we would like to further contribute to this debate of differentiating dentinogenic ghost cell tumor and adenoid ameloblastoma by sharing our impressions.

Most odontogenic tumors have well-established diagnostic criteria with defined histological features. However, differential diagnoses of some of them can be challenging. Therefore, the new edition of the WHO Classification of Head and Neck Tumours (2022) has included “Essential and Desirable Diagnostic Features” for each entity [3]. Essential diagnostic features for adenoid ameloblastoma include epithelium resembling conventional ameloblastoma, duct-like spaces, focal whorled cellular condensations reminiscent of morules, and cribriform architecture [2].

De Souza Vieira et al. [1] found that 3.8% of the dentinogenic ghost cell tumors presented adenoid structures, corresponding to 5 out of 130 cases. However, at least some cases previously diagnosed as dentinogenic ghost cell tumors may now be more accurately classified as adenoid ameloblastoma. Although there are overlapping microscopic features with dentinogenic ghost cell tumors, adenoid ameloblastoma can be distinguished by the combination of duct-like structures and whorls/morules [2, 4]. Also, while ghost cells are prevalent in dentinogenic ghost cell tumors, it is only focally on adenoid ameloblastoma when they appear. Although both tumors share the same molecular event (*CTNNT1* mutations) [5, 6], this alteration is not always associated with ghost cell formation in adenoid ameloblastoma [5]. In this sense, we believe that a reassessment of

✉ Ricardo Santiago Gomez
 rsgomez@ufmg.br

¹ Department of Pathology, Biological Science Institute (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

² Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Antônio Carlos 6627, CEP 31270-901 Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

APÊNDICE D – Primeira página da carta ao Editor elaborada e publicada no periódico *Modern Pathology*

Mod Pathol 36 (2023) 100132

MODERN PATHOLOGY



Journal homepage: <https://modernpathology.org/>

Correspondence

Adenoid Ameloblastoma vs Dentinogenic Ghost Cell Tumor: Are They Related Entities?

To the Editor:

We read with great interest the study conducted by Oh et al,¹ in which they performed a clinicopathologic and molecular analysis of adenoid ameloblastoma (AA) and dentinogenic ghost cell tumor (DGCT). They suggested that these tumors represent a histologic spectrum of WNT pathway–altered benign odontogenic tumors instead of being 2 distinct entities. We would like to further contribute to this debate.

Although some odontogenic tumors have well-defined histopathologic features, overlapping microscopic features between some entities may occur. As an endeavor to simplify and shed light on controversies during the diagnosis, the new edition of the *WHO Classification of Head and Neck Tumours (2022)*² has included “essential and desirable diagnostic features” for each entity. The essential diagnostic features for AA include epithelium resembling conventional ameloblastoma, duct-like structures, whorls/morules, and cribriform architecture. In contrast, a conventional ameloblastoma-like epithelium and the presence of ghost cells and dentinoid are essential features for diagnosing DGCT.³

Oh et al¹ have included in their study 2 AA cases and 3 DGCT cases. However, they further included 2 samples, which they classified as “mixed” consisting of a mixture of AA and DGCT histopathologic patterns and a sample presenting clear cells along with dentinoid deposits, which they classified as “dentinoid-only type” because of the lack of AA-like phenotype and ghost cells. Although adding a “mixed tumor” sounds reasonable to more accurately match the phenotype observed in some of the cases investigated in the study, this subclassification poses hurdles to the interpretation of the findings because this diagnosis is not recognized in the literature. This stratification can affect some of the conclusions made by the authors. Although desirable for the diagnosis of AA, the presence of ghost cells does not constitute an essential diagnostic feature, and when it occurs, it is a minor feature.^{2,4} Following the criteria proposed by WHO (2022), 2 of the cases included in the referred study are AA, one harboring *APC* and the other harboring *CTNGB1* mutation.

Molecular assessment of tumor DNA is a powerful tool to further characterize tumors; however, clinicopathologic correlations are still essential for the diagnosis. The mere fact of sharing mutations in the same signaling pathway does not mean that the tumors represent a spectrum of the same disease. For instance, ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumors are well-known MAPK-driven tumors that represent distinct entities with divergent biological behavior.⁵ Only recently, AA has been recognized as a separate entity by the WHO classification of tumors, and more cases are expected to be revised and reported. Therefore, clinical and demographic characteristics remain to be clearly delineated using the criteria proposed by the WHO. Reassessment of DGCT using these diagnostic criteria is also warranted.⁴

Notably, the idea of a spectrum of WNT pathway–altered odontogenic tumors would require a comprehensive molecular characterization of a reasonable number of samples, including whole-exome sequencing (WES) followed by Sanger sequencing–based validation of calcifying odontogenic cyst, DGCT, AA, ghost cell odontogenic carcinoma, and odontogenic carcinoma with dentinoid. Importantly, it should be highlighted that there are no defined criteria to distinguish aggressive AA from odontogenic carcinoma with dentinoid,⁶ which apparently also carries WNT pathway mutations.⁷ With better defined diagnostic criteria for these tumors, genetic studies with a larger sample cohort and adequate molecular characterization will clarify the molecular profile and the driver events of these pathologic conditions. Regarding the molecular characterization carried out in the study by Oh et al,¹ a more detailed description of the methods used for WES data interpretation would be helpful in allowing reproducibility. Variants were called using only 1 variant caller when the use of >1 variant caller is advisable to keep high confidence. Additionally, it is unclear which criteria the authors have adopted for the percentage of required reads supporting the variant call and if reported variants were inspected on Integrative Genomics Viewer. For *NEDD4L* and *SMURF1* reported variants, eg, the number of supporting reads for the variant is low. These small methodologic details can affect the results of WES because these results comprise sequencing data of approximately 20,000 genes.

Keywords: adenoid ameloblastoma; dentinogenic ghost cell tumor; odontogenic carcinoma; odontogenic tumors; WNT/beta-catenin.



0893-3952/\$ - see front matter © 2023 United States & Canadian Academy of Pathology. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.
<https://doi.org/10.1016/j.modpat.2023.100132>