

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

Bruna Pizziolo Coura

Mutações *KRAS* em tumor odontogênico adenomatoide

BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS
2018

Bruna Pizziolo Coura

Mutações *KRAS* em tumor odontogênico adenomatoide

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

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Dr.^a Marina Gonçalves Diniz

BELO HORIZONTE, MINAS GERAIS
2018

Coura, Bruna Pizzolo.
C858m Mutações KRAS em tumor odontogênico adenomatoide [manuscrito]. /
Bruna Pizzolo Coura. -- Belo Horizonte: 2018.
45f.: il.
Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.
Coorientador (a): Marina Gonçalves Diniz.
Área de concentração: Medicina Molecular.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Tumores Odontogênicos. 2. Neoplasias. 3. Genes ras. 4. Proto-Oncogenes. 5. Análise de Sequência de DNA. 6. Patologia Molecular. 7. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno. 8. Dissertação Acadêmica. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Diniz, Marina Gonçalves. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

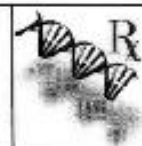
NLM: WU 280

Bibliotecária responsável: Fabiene Letizia Alves Furtado CRB-6/2745



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

Mutações KRAS em tumor odontogênico adenomatóide

BRUNA PIZIOLO COURA

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Mestre em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 31 de agosto de 2018, pela banca constituída pelos membros:


Prof(a). Carolina Cavaliéri Gomes - Orientadora
UFMG


Prof(a). Marina Gonçalves Diniz - Co-orientadora
UFMG


Prof(a). Sílvia Ferreira de Sousa
Universidade Federal de Sergipe


Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes
UFMG

Belo Horizonte, 31 de agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer por essa etapa concluída. Agradeço pela conquista, pelo crescimento como pesquisadora, como profissional e como pessoa. Mas isso não seria possível sozinha, por isso agradeço a todos que me acompanharam nessa jornada.

Agradeço à minha família pelo apoio, amor e dedicação, em especial meus pais Antônio Carlos e Maria Lidia, meus irmãos Rodrigo e Christiane, agregados Bruna e André, sobrinho Vicente (que nem tem tamanho mas já é tão querido). À avó presente de corpo, e aos avós presentes de alma. E aquele que se aconchegou nesse ninho com carinho, Daniel.

À minha orientadora, professora Carolina, e ao professor Ricardo, por me acolherem no laboratório, por todos os ensinamentos e as oportunidades desde a iniciação científica.

À minha coorientadora, Marina, que também contribuiu com seus muitos conhecimentos.

Aos que também colaboraram diretamente na minha pesquisa, principalmente professora Vanessa, professora Sílvia, Núbia, Josiane. Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Molecular, por toda e qualquer contribuição ao trabalho e/ou convivência, com prosas e cafezinhos, Aline, Letícia, Juliana, Sara, Grazielle, Elisa, Taynara, Jéssica, Felipe, Thaís. Aos demais colegas agradeço a companhia.

Aos outros colaboradores que disponibilizaram amostras do tumor: professor Helder Antônio Rebelo Pontes da Universidade Federal do Pará (UFPA), professora Aline Carvalho Batista da Universidade Federal de Goiás (UFG), professor Danyel Elas da Cruz Perez da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), professor Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior da Universidade de Tiradentes, Aracaju, Sergipe, professora Lélia Batista de Souza da Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN) e professora Manoela Domingues Martins da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Aos amigos que conquistei pela vida, em especial às meninas do Colégio Santo Agostinho, às meninas da biologia, e à turminha do barulho!

Às pessoas que sabem que as escolhi para serem minhas irmãs de coração, e que me escolheram como madrinha, principalmente Fernanda e Júlia!

Agradeço também à UFMG, que virou minha segunda casa, ao apoio financeiro da FAPEMIG e aos pacientes que gentilmente colaboraram para a realização deste estudo.

“Que os vossos esforços desafiem as impossibilidades, lembrai-vos de que as grandes coisas do homem foram conquistadas do que parecia impossível.”

Charles Chaplin

RESUMO

O tumor odontogênico adenomatoide (TOA) é um tumor benigno, encapsulado, de crescimento lento e muitas vezes assintomático. O TOA corresponde a cerca de 3 a 7% dos tumores odontogênicos, e tende a ocorrer em indivíduos jovens e em mulheres. O TOA pode ocorrer na variante intraóssea ou na variante extraóssea, sendo esta última muito rara. Recentemente, por meio de uma abordagem de sequenciamento de nova geração, nosso grupo de pesquisa descreveu pela primeira vez a mutação *KRAS* p.G12V em TOA. A mutação *KRAS* p.G12V é muito frequente em tumores malignos como câncer de pulmão, intestino e pâncreas. Porém, não se sabe ao certo o papel dessa mutação no contexto dos tumores benignos. O objetivo desse estudo foi analisar a presença de mutações no códon 12 do gene *KRAS* e a associação delas com parâmetros histopatológicos e clínicos em TOA. Para isso, foi utilizada uma amostra de conveniência de 38 TOAs fixados em formol e incluídos em parafina. Avaliou-se a presença da mutação *KRAS* no códon 12 por meio da reação de qPCR alelo-específico e/ou sequenciamento de Sanger. A ativação da via MAPK, sabidamente ativada por mutações em *KRAS*, foi investigada por meio de reação imuno-histoquímica para a forma fosfolilada das proteínas ERK1/2 (phospho-ERK1/2). Além disto, a cápsula das lesões foi medida por análise morfométrica, os dados clínicos foram coletados e foi realizada análise estatística para correlacionar os achados moleculares com os dados clinicopatológicos da lesão, tais como a associação com dentes inclusos, tamanho e localização da lesão (maxila ou mandíbula, região anterior ou posterior), espessura da cápsula e idade do indivíduo. A mutação ativadora *KRAS* p.G12V (c.35G>T) foi encontrada em 15/38 casos e a mutação *KRAS* p.G12R (c.34G>C) foi detectada em 12/38 casos. Nos 11 casos restantes, não foi detectada mutação no códon 12 do *KRAS*, sendo classificados como *wild-type* (selvagens) para essas mutações. Não houve associação das mutações do códon 12 com os parâmetros clinicopatológicos analisados ($p>0,05$). Nossos resultados indicam que o *KRAS* se encontra mutado em grande parte dos casos estudados (71%). Além disso, foi demonstrada a ativação da via de sinalização celular MAPK/ERK em todos os casos e em todos os tipos morfológicos de células tumorais. Porém, não se sabe o porquê de mutações no *KRAS* ocorrerem em um tumor de comportamento indolente como o TOA, e ao mesmo tempo ocorrerem neoplasias malignas, como por exemplo adenocarcinoma pulmonar, adenocarcinoma pancreático e câncer colorretal.

Palavras-chaves: Tumor odontogênico adenomatoide, *KRAS*, Tumores odontogênicos, Sequenciamento de Sanger, Biologia tumoral, MAPK, genética.

ABSTRACT

The adenomatoid odontogenic tumour (AOT) is a benign, encapsulated tumor, usually growing slowly and being an asymptomatic tumour. The AOT corresponds to about 3 to 7% of all odontogenic tumours, and tends to occur in young individuals and females. AOT can occur in the intraosseous variant or the extraosseous variant, the latter being very rare. Recently, using a next generation sequencing approach, our research group described for the first time *KRAS* p.G12V in AOT. However, its importance in the context of benign tumors is uncertain. The objective of this study was to investigate *KRAS* codon 12 mutations in AOT and the association of these mutations with clinicopathological parameters. A convenience sample of 38 formalin-fixed paraffin-embedded tissue of AOT was included in the study. *KRAS* p.G12 was assessed by quantitative real time PCR assay and/or Sanger sequencing. We also investigated MAPK pathway activation by phospho-ERK immunohistochemistry. Tumour capsule thickness was measured by morphometric analysis, clinical data collected and statistical analysis was performed to correlate the molecular findings with clinicopathological parameters of the lesion, such as the association with impacted teeth, the size and location of the lesion (maxille or mandible, anterior or posterior region), capsule thickness, patient's sex and age. The *KRAS* p.G12V (c.35G>T) mutation was detected in 15/38 cases and *KRAS* p.G12R (c.34G>C) mutation was detected in 12/38 cases. In the other 11 cases, we did not detect *KRAS* codon 12 mutation, and they were classified as wild-type for these mutations. There was no association between codon 12 mutation and the clinicopathological parameters tested ($p>0.05$). These findings indicate that *KRAS* is mutated in a high proportion of cases analysed (71%). Furthermore, we observed MAPK/ERK pathway activation in all cases and in all morphological types of tumour cells. It is unclear why *KRAS* mutations occur in an indolent tumour such as AOT while they occur in tumours with aggressive behavior, such as pulmonary adenocarcinoma, pancreatic adenocarcinoma and colorectal cancer.

Key words: Adenomatoid odontogenic tumor, *KRAS*, Odontogenic tumours, Sanger sequencing, Tumour biology, MAPK, genetics.

LISTA DE TABELAS

TABELA 01: Valores da análise morfométrica da cápsula fibrosa dos tumores odontogênicos adenomatoide.....	29
TABELA 02: Dados clinicopatológicos e achados moleculares listados por amostras de casos de tumor odontogênico adenomatoide.....	33

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 01: Aspecto clínico e histopatológico do tumor odontogênico adenomatoide.....	14
FIGURA 02: Variantes clinicopatológicas do tumor odontogênico adenomatoide.....	15
FIGURA 03: Características histopatológicas do tumor odontogênico adenomatoide.....	16
FIGURA 04: Via de sinalização MAPK.....	18
FIGURA 05: Diagrama esquemático da metodologia.....	21
FIGURA 06: Representação esquemática das principais etapas da extração de DNA.....	23
FIGURA 07: Análise da mutação <i>KRAS</i> p.G12V.....	28
FIGURA 08: Mutação <i>KRAS</i> p.G12 detectada/confirmada pelo sequenciamento de Sanger.....	28
FIGURA 09: Detecção imuno-histoquímica da forma fosforilada da proteína ERK1/2.....	30

LISTA DE QUADROS

QUADRO 01: Expressão imuno-histoquímica da proteína ERK1/2 fosforilada.....	31
QUADRO 02: Resultado análise estatística entre os parâmetros clinicopatológicos e grupo mutado/grupo selvagem.....	32

LISTA DE ABREVIATURA

µm= Micrometro

cm= Centímetro

CT= Cycle threshold

DNA= Ácido Desoxirribonucleico

FAPEMIG= Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

ERK= Quinase regulada por sinal extracelular

FFPE= Fixado em formol tamponado e incluído em parafina

GAP= Proteína ativadora de GTPase

gDNA= DNA genômico

GEFs= Fatores de troca de nucleotídeos de guanina

GDP= Guanosina difosfato

GTP= Guanosina trifosfato

KRAS= Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

MAPK= Proteínas quinases ativadas por mitógenos

mA= Miliampere

mm= Milímetro

pb= Pares de base

PCR= Reação em cadeia polimerase

pH= Potencial de hidrogênio

Primer= Iniciador

qPCR= Reação em cadeia polimerase quantitativa

RSK= Proteína quinase ribossômica S6

TOA= Tumor odontogênico adenomatoide

TOEC= Tumor odontogênico epitelial calcificante

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	14
2.1 Tumor odontogênico adenomatoide.....	14
2.2 Via das MAPKs (<i>Mitogen-Activated Protein kinases</i>) e mutação do gene <i>KRAS</i>	17
3. OBJETIVOS.....	20
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
4.1 Amostras.....	22
4.2 Extração de DNA.....	22
4.3 PCR convencional.....	23
4.4 Detecção da mutação <i>KRAS</i> p.G12 por meio de qPCR em tempo real alelo-específico....	24
4.5 Detecção da mutação <i>KRAS</i> por meio de sequenciamento de Sanger.....	24
4.6 Análise morfométrica da cápsula fibrosa.....	25
4.7 Imuno-histoquímica (IHQ).....	25
4.8 Análise estatística.....	26
5. RESULTADOS.....	27
5.1 Dados clínicos.....	27
5.2 Resultados moleculares.....	27
5.3 Análise morfométrica da cápsula fibrosa.....	28
5.4 Imuno-histoquímica (IHQ).....	30
5.5 Análise estatística.....	32
6. DISCUSSÃO.....	36
7. CONCLUSÃO.....	39
REFERÊNCIAS.....	40
APÊNDICES.....	44
ANEXOS.....	45

1. INTRODUÇÃO

O tumor odontogênico adenomatoide (TOA) é um tumor benigno, encapsulado, de crescimento lento e muitas vezes assintomático. É pouco frequente dentre os tumores odontogênicos, correspondendo a cerca de 3 a 7%, e tende a ocorrer em indivíduos jovens e em mulheres. O TOA ocorre na maioria das vezes como uma variante intraóssea (central), que é subclassificada em tipo folicular ou extrafolicular, ou pode ocorrer em raros casos como variante extraóssea (do tipo periférico) (PHILIPSEN *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2016; PHILIPSEN *et al.*, 2016; WRIGHT & KUSAMA, 2017).

Estudos recentes têm analisado o papel de mutações na alteração das vias das MAPKs e vários de seus componentes, como por exemplo no *RAS* e *RAF*. Essa via está relacionada à regulação de funções celulares importantes como crescimento, diferenciação e proliferação celular, e frequentemente se encontra desregulada em tipos diferentes de tumores. A superfamília de proto-oncogenes *RAS* é importante na regulação da via MAPK, dentre outras, e apresenta três membros: *KRAS*, *NRAS* e *HRAS*. Segundo a literatura, é comum encontrar mutação nesses genes em cânceres humanos, em especial mutações no códon 12 do *KRAS* (DHILLON *et al.*, 2007; PRIOR *et al.*, 2012; KATO *et al.*, 2016; MYERS *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017; HAIGIS, 2017).

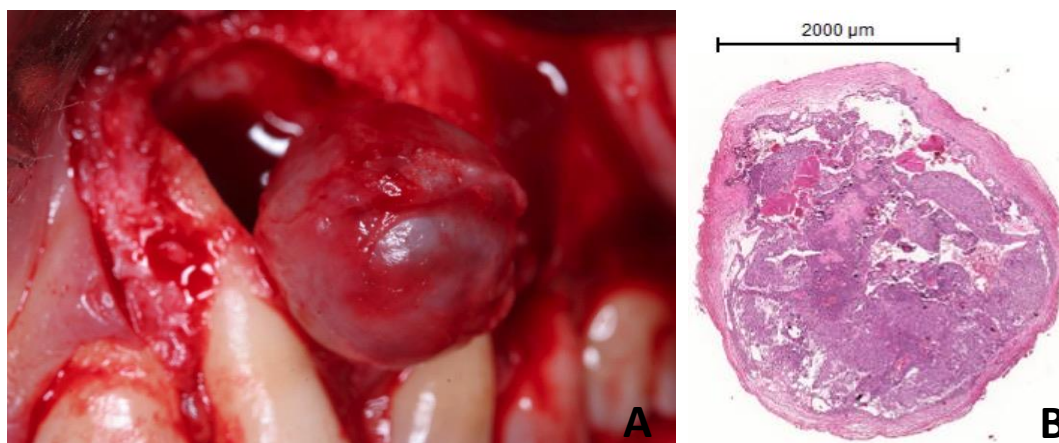
A mutação ativadora *KRAS* p.G12V, por exemplo, ocorre em alta frequência em tumores malignos. Essa mutação consiste na troca de um único nucleotídeo, e tem como consequência ativação constitutiva da via MAPK. Essa mutação, muitas vezes “*driver*” (condutora), está intimamente ligada à agressividade de alguns tumores, e foi descrita pela primeira vez nos TOAs por nosso grupo de pesquisa em 2016 (GOMES *et al.*, 2016). Porém, não se sabe ao certo a importância dessas mutações no contexto dos tumores benignos (NIKOROV, 2008; PRIOR *et al.*, 2012; GOMES *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2016; ANGLESIO *et al.*, 2017; DINIZ *et al.*, 2017; HAIGIS, 2017).

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Tumor odontogênico adenomatoide

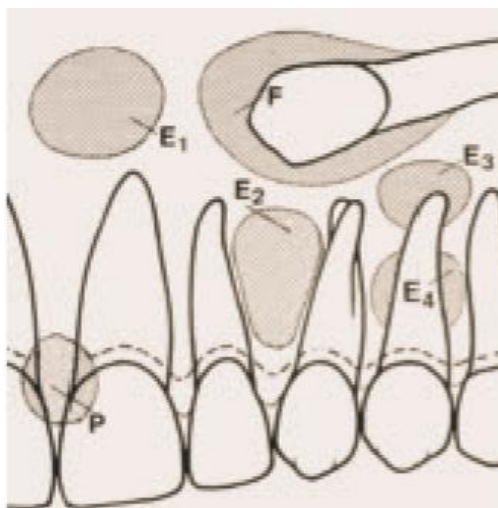
Os tumores odontogênicos são lesões derivadas de elementos epiteliais e ectomesenquimais que dão origem aos elementos dentais. Esses tumores compreendem um grupo complexo de lesões de comportamento clínico e de tipos histológicos diversos, sendo classificados em benignas ou malignas. Os tumores odontogênicos são lesões raras e não apresentam uma faixa etária específica para o seu desenvolvimento (TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

O TOA já foi descrito de inúmeras formas ao longo dos anos, inclusive como uma variante histológica do ameloblastoma denominada adenoameloblastoma. No entanto, a nomenclatura atual foi descrita pela primeira vez por Philipsen e Birn em 1969 (PHILIPSEN *et al.*, 1969), sendo adotada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) dois anos depois (KRAMER *et al.*, 1971). O TOA é um tumor odontogênico epitelial benigno, cuja histogênese ainda é incerta, sendo relativamente pequeno, encapsulado, de comportamento indolente e muitas vezes assintomático. O TOA corresponde a cerca de 3 a 7% dos tumores odontogênicos e afeta, em sua maioria, indivíduos até a terceira década de vida, acometendo duas vezes mais mulheres do que homens (PHILIPSEN *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2016; PHILIPSEN *et al.*, 2016; WRIGHT & KUSAMA, 2017).



Fonte: (A) Cortesia professor Ricardo Gomez. (B) Própria autoria.
Figura 01: Aspecto clínico e histopatológico do tumor odontogênico adenomatoide. (A) Caso de tumor adenomatoide extrafolicular. A lesão localiza-se na região anterior de maxila e apresenta padrão de crescimento expansivo. O tumor é bem delimitado por uma cápsula fibrosa. (B) Histopatologicamente, observa-se uma proliferação epitelial encapsulada, bem delimitada, característico desse tipo de tumor (Hematoxilina & Eosina).

O TOA ocorre preferencialmente na maxila e é encontrado em duas principais variantes clinicopatológicas, a variante central (intraóssea) e variante periférica (extraóssea), sendo essa última muito rara. A variante central, por sua vez, pode ser subclassificada em extrafolicular e folicular, sendo esta a forma mais comumente encontrada, associada a um dente não irrompido (na maior parte das vezes um canino) como ilustrado na Figura 02. Radiograficamente, cerca de 75% dos TOAs são caracterizados por uma área radiolúcida unilocular bem delimitada, circunscrita, que geralmente envolve a coroa de um dente não irrompido, às vezes associado à raiz (demonstrando grande semelhança com cistos dentígeros). É comum observar focos discretos radiopacos, devido à presença de calcificação delicada (PHILIPSEN & BIRN, 1869; PHILIPSEN *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2016; WRIGHT & KUSAMA, 2017).

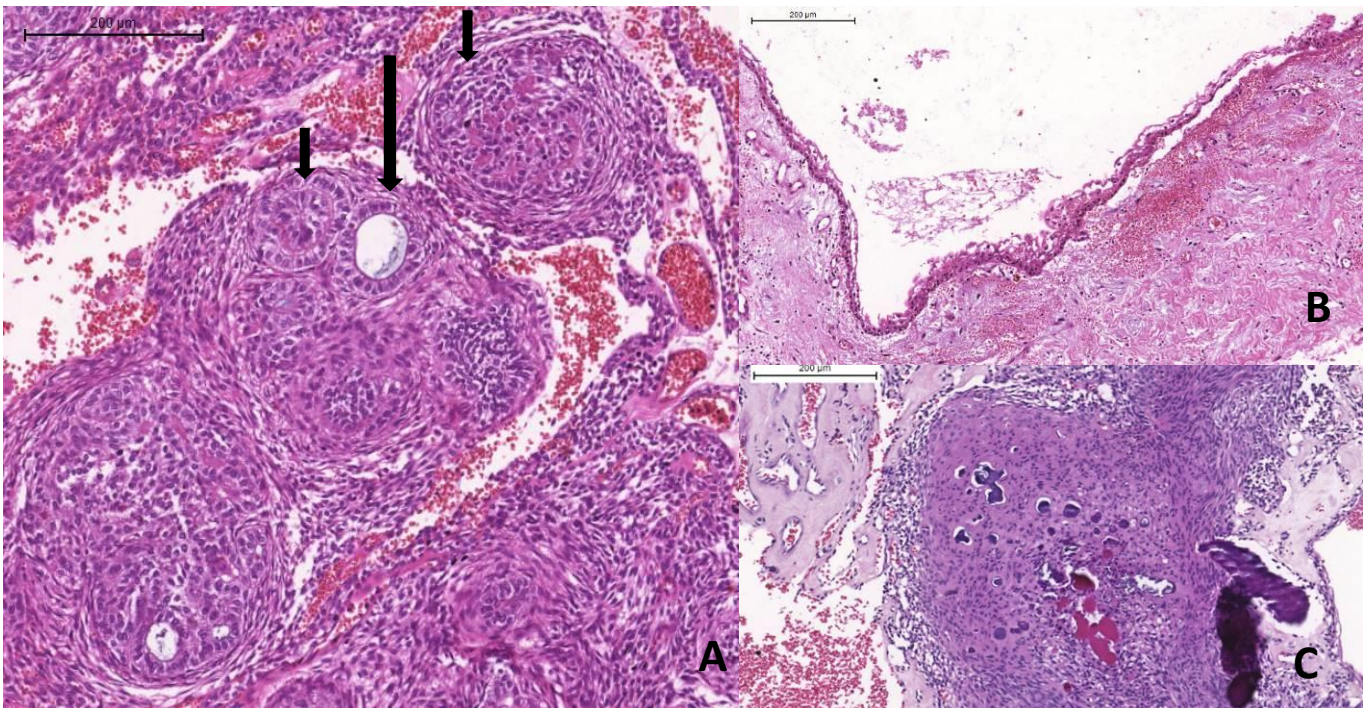


Fonte: PHILIPSEN & REICHART, 1999.

Figura 02: Variantes clinicopatológicas do tumor odontogênico adenomatoide: variante central (F) tipo folicular, o mais comum, geralmente associado ao canino, (E1-E4) tipo extrafolicular. (P) tipo periférico.

Do ponto de vista histológico, o TOA pode se apresentar como uma lesão sólida, com algumas formações características: agregados sólidos de células cuboidais ou poliédricas de epitélio odontogênico com tamanhos variados, que se arranjam em nódulos, estruturas semelhantes a rosetas, ou até mesmo cordões. Outras estruturas que podem estar presentes são aquelas semelhantes a ductos, aspecto característico responsável pela nomenclatura do tumor. Elas consistem em uma região revestida por uma camada de células epiteliais colunares ou cuboidais de polaridade reversa, que lembram estruturas glandulares, cujo lúmen pode estar vazio ou apresentar depósito de material amorfo eosinofílico. Além disso, a lesão geralmente é envolvida por uma cápsula fibrosa, podendo apresentar áreas parcialmente císticas, que em

poucos casos podem mostrar semelhança com cisto dentígero. Em alguns casos, podem haver pontos de calcificação e, ocasionalmente, observam-se áreas de células epiteliais com depósito de material amorfo semelhante a amiloide, que lembram o tumor odontogênico epitelial calcificante (TOEC) (PHILIPSEN *et al.*, 1998; PHILIPSEN *et al.*, 2016; WRIGHT & KUSAMA, 2017).



Fonte: (A) Própria autoria. (B,C) Cortesia professor Ricardo Gomez

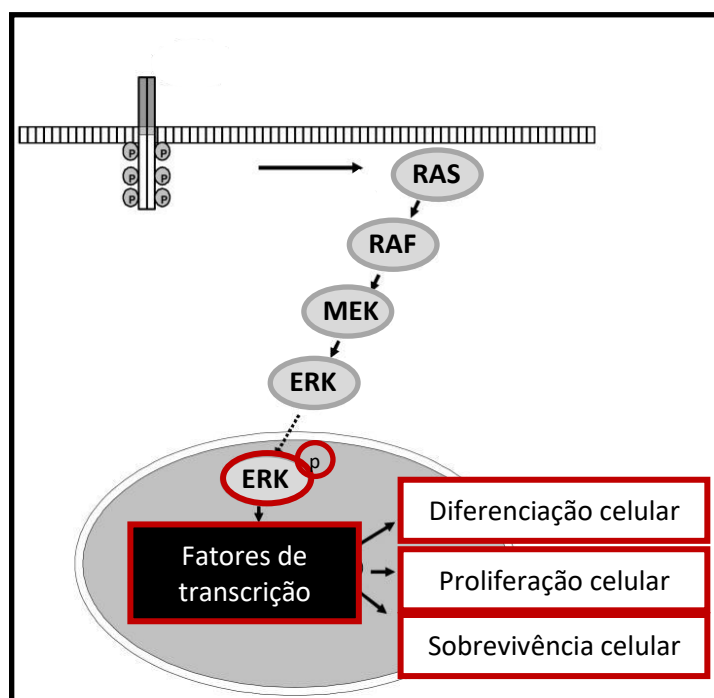
Figura 03: Características histopatológicas do tumor odontogênico adenomatoide. (A) Proliferação de células neoplásicas com padrão sólido. Presença de estruturas semelhantes a ductos de tamanhos variados (seta maior), agregados celulares formando nódulos e estruturas semelhantes a rosetas (setas menores) (Hematoxilina & Eosina). (B) Proliferação de células neoplásicas com padrão cístico (Hematoxilina & Eosina). (C) Presença de pontos de calcificação e áreas eosinofílicas semelhantes ao tumor odontogênico epitelial calcificante) (Hematoxilina & Eosina).

O tratamento cirúrgico conservador, caracterizado principalmente por enucleação ou curetagem, tem sido considerado como a melhor forma de tratamento. Embora alguns autores afirmem que a taxa de recidiva é extremamente baixa, até o presente momento, não há relatos convincentes de casos de recidiva do TOA na literatura (NEVILLE *et al.*, 2016; WRIGHT & KUSAMA, 2017).

2.2 Via das MAPKs (*Mitogen-Activated Protein kinases*) e mutação do gene *KRAS*

A ativação da via das MAPKs, em especial a cascata Ras-raf-MEK-ERK, tem sido estudada tanto em neoplasias malignas quanto em benignas, como por exemplo o TOA. Essa via está intimamente ligada à regulação de algumas funções celulares importantes, como por exemplo crescimento, diferenciação e proliferação celular. A cascata Ras-raf-MEK-ERK encontra-se comumente desregulada em muitos cânceres, algumas neoplasias benignas e até condições não neoplásicas, porém não se sabe ao certo sua importância no contexto dos tumores benignos (DHILLON *et al.*, 2007; MYERS *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017).

A superfamília *RAS*, presente nessa via, apresenta três membros (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*) que codificam uma proteína G monomérica com papel central na sinalização intracelular. Estes genes encontram-se frequentemente mutados em cânceres humanos. Normalmente, *RAS* apresenta-se no citoplasma na forma inativa ou quiescente (ligada ao GDP-difosfato de guanosina) e, após sinais dos receptores de membrana, é convertida para a forma ativa (ligada ao GTP-trifosfato de guanosina), através da reação de fosforilação reversível, catalisada por GEFs (fatores de troca de nucleotídeos guanina). Com *RAS* ativada, ocorre o recrutamento e ativação de RAF (efetora intracelular na sinalização da cascata MAPK), levando à ativação por fosforilação de ERK. A ERK fosforilada interage com proteínas de sinalização no citoplasma, como por exemplo as RSKs, e migra para o núcleo, onde atua diretamente nos fatores de transcrição nucleares, que, por sua vez, atuam na ativação de genes de mitose e genes de controle do ciclo celular. A ativação dessa via pode interagir em outras vias reguladoras de funções celulares importantes, como por exemplo a PIK3-mTOR, devido a ativação cruzada e/ou convergência dos mesmos substratos. A inativação da *RAS* ocorre através da hidrólise do GDP, mediada por GAPs (proteína ativadora de GTPase) (PEYSSONNAUX & EYCHÈNE, 2001; POLLOCK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; DHILLON *et al.*, 2007; NIKOROV, 2008; MENDONZA *et al.*, 2011; PRIOR *et al.*, 2012; BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016; HAIGIS, 2017; MONTAÑO *et al.*, 2018).



Fonte: Nikorov, 2008 adaptado.

Figura 04: Via de sinalização MAPK. Ativação da proteína citoplasmática RAS, em seguida recrutamento e ativação da proteína RAF, com consequente ativação da via MAPK, levando à regulação da proliferação, diferenciação e sobrevivência celular.

Estudos recentes demonstraram que mutação na família *RAS* ocorre com frequência variável em alguns tipos de tumores, como por exemplo nevo sebáceo (GROESSER *et al.*, 2012), adenocarcinoma pancreático (SMIT *et al.*, 1988), adenocarcinoma pulmonar (RODENHUIS *et al.*, 1987), câncer colorretal (BOS *et al.*, 1987; FORRESTER *et al.*, 1987), dentre outros. Das três isoformas de *RAS*, o *KRAS* tem se destacado por ser o proto-oncogene com maior frequência de mutação em neoplasias humanas, sendo o códon 12, seguido dos códons 13 e 61, os mais alterados (PRIOR *et al.*, 2012; KATO *et al.*, 2016; HAIGIS, 2017).

Segundo a literatura, a substituição de apenas um aminoácido no códon 12 pode desencadear um estado oncogênico do gene *KRAS*. Dentre essas mutações podemos encontrar a p.G12D, p.G12R, p.G12C, p.G12A, p.G12V. A mutação missense *KRAS* p.G12V (c.35G>T) resulta em uma substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido valina, enquanto a mutação missense *KRAS* p.G12R (c.34G>C) resulta em uma substituição do aminoácido glicina pelo aminoácido arginina. Mutação ativadora no *KRAS* tem como consequência a resistência da proteína mutada à GAP devido à alteração do sítio ativo, e ao aumento da sua afinidade com o GTP, alterando o balanço entre a forma inativa (ligada ao GDP) e a forma ativa (ligada ao GTP) da proteína. Em decorrência, ocorre a ativação

constitutiva da via MAPK e desregulação de funções importantes como proliferação, sobrevivência e diferenciação celular (NIKOROV, 2008; PRIOR *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016; ANGLESIO *et al.*, 2017; HAIGIS, 2017).

Recentemente nosso grupo de pesquisa descreveu pela primeira vez a presença da mutação ativadora *KRAS* p.G12V em TOA, através do sequenciamento de nova geração utilizando um painel que contém 50 oncogenes e genes supressores de tumor. Nesse mesmo estudo, essa mutação foi validada em um grupo pequeno de TOAs, estando presente em 77,8% (7/9) dos casos (GOMES *et al.*, 2016). Com base nesses resultados, aparentemente a mutação *KRAS* p.G12V poderia ser um marcador molecular para o TOA (GOMES *et al.*, 2016), assim como a mutação *BRAF* p.V600E tem sido reportada e altamente associada ao ameloblastoma (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2017).

3. OBJETIVOS

- Analisar a presença de mutação no códon 12 do *KRAS* em tumores odontogênicos adenomatoide.
- Correlacionar os achados moleculares com os dados clinicopatológicos da lesão, tais como a idade, associação com dentes inclusos, espessura da cápsula, tamanho e localização da lesão.
- Investigar a ativação da via MAPK nos tumores odontogênicos adenomatoide através da imunexpressão da proteína ERK1/2 fosforilada.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 05, pode-se observar o diagrama dos métodos utilizados:

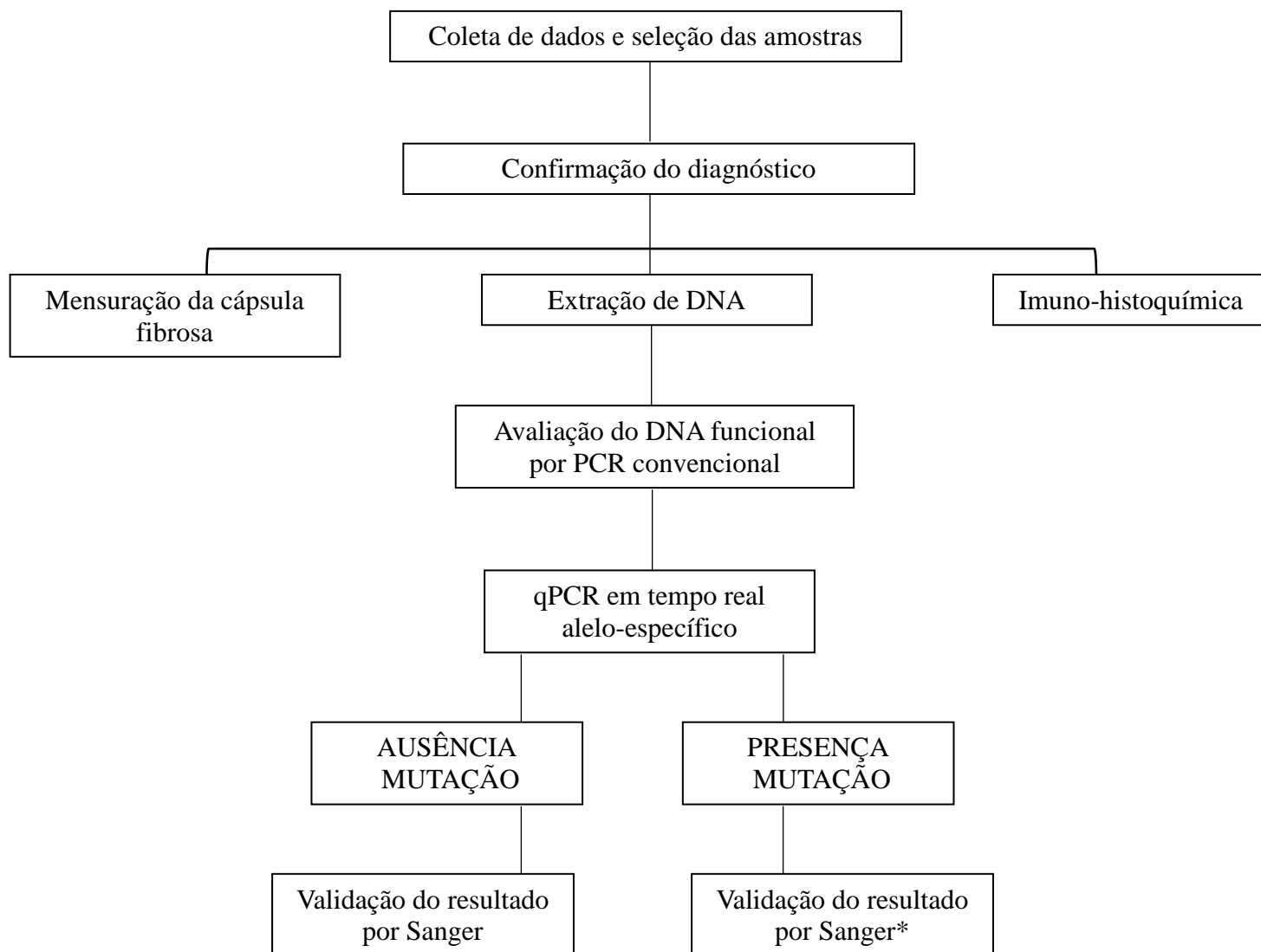


Figura 05: Diagrama esquemático da metodologia.

Sanger*= procedimento realizado em alguns casos para confirmação dos resultados obtidos a partir do qPCR em tempo real alelo-específico (n=5).

4.1 Amostras

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob protocolo CAAE 30405514.5.0000.5149 (Anexo 01). Foi utilizada uma amostra de conveniência de TOAs fixados em formol tamponado a 10% pH 7,4 e incluídos em parafina. Foram selecionadas 50 amostras do acervo do Serviço da Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da UFMG e de outras 7 instituições nacionais: Universidade Federal de Sergipe, Universidade Federal do Pará, Universidade Federal de Goiás, Universidade Federal de Pernambuco, Universidade de Tiradentes-Aracaju, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porém, devido à baixa quantidade de tecido presente e/ou baixa qualidade do DNA obtido, 12 amostras foram excluídas, portanto, 38 amostras foram incluídas nesse estudo. O diagnóstico de todos os casos foi confirmado por três patologistas bucais (C.C.G., R.S.G., V.F.B.). Os dados clínicos, tais como a associação com dentes inclusos, a localização da lesão, espessura da cápsula, sexo e idade foram coletados de todos os casos.

4.2 Extração de DNA

As amostras foram submetidas à extração de DNA genômico (gDNA) utilizando o kit *QIAamp DNA FFPE Tissue* (QIAamp DNA FFPE TissueKit, Qiagen, Hilden, Germany), seguindo o protocolo do fabricante. Inicialmente, foram feitos cerca de 5 a 10 cortes de 10 µm dos tecidos de cada amostra (FFPE). Posteriormente, os cortes dos tecidos foram desparafinizados em 5 banhos de xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) pré-aquecido a 56°C e lavados em álcool absoluto (Merck). Foi realizada então a digestão enzimática utilizando proteinase K em banho seco por 24 horas (56°C) e a incubação em banho seco por 1 hora (90°C). Em seguida o DNA foi retido na coluna *QIAamp Min Elutecolumn* (QIAampMinElute® Columns) e a lavagem foi feita utilizando o tampão Buffer AL e etanol 100% (Merck), Buffer AW1, Buffer AW2. Por fim, a eluição foi realizada em buffer ATE e o material de extração foi quantificado por espectrofotometria utilizando NanoDrop instrument (Thermo FisherScientific, Wilmington, USA). Os resultados da quantificação foram analisados, e os gDNA de cada amostra escolhidos para a próxima etapa foram aqueles que tiveram a taxa de relação 260/280 entre 1,8 e 2,0, e a taxa de relação 260/230 entre 2,0 e 2,2,

de acordo com o sugerido no protocolo do nanodrop (WILFINGER *et al.*, 1997). As principais etapas da extração de DNA estão ilustradas na Figura 06.

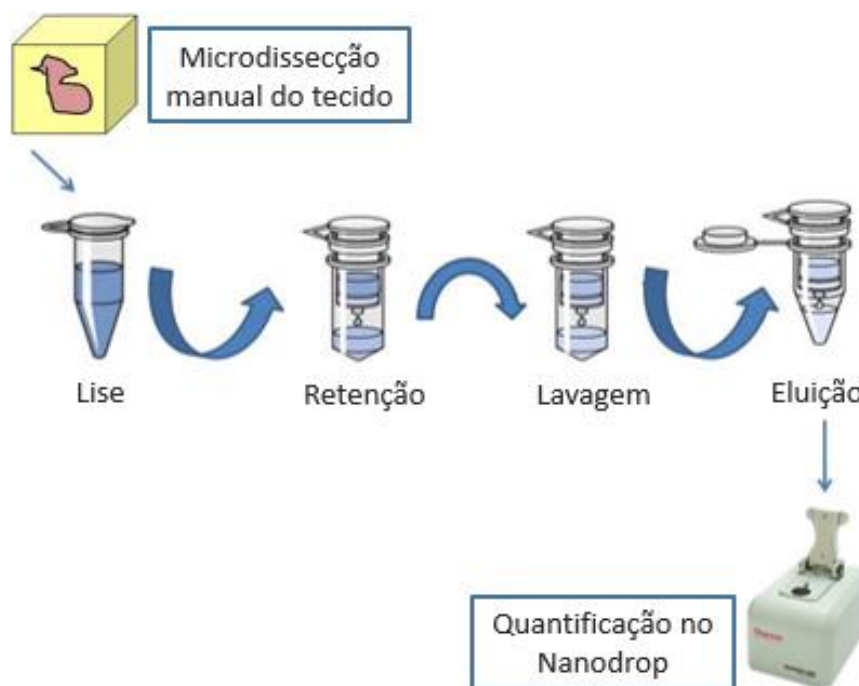


Figura 06: Representação esquemática das principais etapas da extração de DNA.

4.3 PCR convencional

Para prosseguir para os testes moleculares, a presença de gDNA funcional foi verificada. Para isso foi realizado um PCR convencional para o gene *KRAS*. Para amplificação do gDNA, utilizou-se KIT Taq Platinum (Platinum®Taq DNA Polymerase, Invitrogen), o *primer forward* 5'AAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGA3' e o *primer reverse* 5'TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC3'. A primeira etapa da amplificação foi a desnaturação inicial, que ocorreu a 94°C por 1 minuto. As três próximas se repetiram 45 vezes: desnaturação a 94°C por 30 segundos, anelamento a 56°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 minuto. Após esses 45 ciclos, ocorreu a extensão final a 72°C por 10 minutos.

Os produtos obtidos na reação de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de poliacrilamida a 6,5% a 200 mA por 30 minutos em solução tampão TBE. Após corrida eletroforética o gel foi fixado e corado com nitrato de prata. O amplicon gerado pela PCR é de 293pb.

4.4 Detecção da mutação *KRAS* p.G12 por meio de qPCR em tempo real alelo-específico

Após a quantificação no Nanodrop, as amostras de gDNA foram incluídas na reação de qPCR em tempo real alelo-específico. Tal técnica avaliou a presença ou ausência da mutação *KRAS* p.G12. Para isso, foi acrescentado ao gDNA sondas de hidrólise Taqman® sequência específica para o alelo mutado, para *KRAS* p.G12V (*KRAS_520_mu*) e para *KRAS* p.G12R (*KRAS_518_mu*), e alelo referência não mutado (*KRAS_rf*) (Applied biosystem, Foster City, USA) (PO2064497). A reação foi feita no instrumento StepOne Plus (Applied Biosystems). Os dados contendo os valores de CT (do inglês, *cycle threshold*) foram importados para o software *Taqman Mutation Detector*[™] (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA), e o status de mutação foi determinado de acordo com o Delta CT. O Delta CT é um valor de corte pré-determinado pelo fabricante, é específico para cada sonda, e é calculado pela diferença entre valor de CT do alelo mutante e valor de CT do gene referência. Os casos que tiveram o valor detectado de Delta CT maior que 9,96 foram classificados como sem mutação, os casos com valor de Delta CT menor, tiveram o status de mutação positivo. Além disso, para confirmar o resultado, levou-se em consideração o CT individual de cada amostra para cada sonda, em cada reação, de forma que o valor máximo permitido para o CT nos casos que utilizou-se a sonda *KRAS_rf* foi 28, e o valor máximo permitido para o CT nos casos que utilizou-se a sonda *KRAS_520_mu* e *KRAS_518_mu* foi 37. Os casos que apresentaram CT maior que esses valores de corte pré-determinados tiveram os resultados considerados como indeterminados.

4.5 Detecção da mutação *KRAS* por meio de sequenciamento de Sanger

A presença da mutação *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R detectada por qPCR em tempo real alelo-específico foi confirmada por sequenciamento de Sanger em alguma das amostras selecionadas de forma aleatória. Além disso, as amostras que não tiveram a mutação detectada pelo qPCR alelo-específico foram submetidas a análise por sequenciamento direto bidirecional, para confirmar a ausência da mutação apontada pelo qPCR e para analisar outras possíveis mutações já descritas na literatura no códon 12. Para isso foi utilizado o seguinte par de primer: *primer forward* 5'AAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGA3' e *primer reverse* 5'TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC3' (os mesmos utilizados no item 4.3, e sob as mesmas condições térmicas). Os produtos de PCR foram purificados utilizando o reagente de limpeza

ExoSAP-IT™ (78200.200)(Affymetrix INC, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante. Em seguida, as reações de sequenciamento foram realizadas por eletroforese capilar no aparelho ABI3730 (Life Technologies), com reagente BigDye v3.1 (Applied Biosystems™, USA) e foi utilizado POP7 como polímero. Os cromatogramas foram analisados manualmente no software livre Chromas (Technelysium Pty Ltd), utilizando-se a sequência referência NG_007524.1.

4.6 Análise morfológica da cápsula fibrosa

A espessura da cápsula fibrosa dos tumores utilizados na análise molecular foi medida utilizando-se o software MMI CellTools (MMI Molecular Machines & Industries, Tokyo, Japan). As lâminas coradas em Hematoxilina e Eosina (HE) foram colocadas na plataforma do microscópio e escaneadas em um aumento original de 40X. As medições foram feitas através da criação de linhas que mediam desde a parte mais interna até a parte mais externa do tecido conjuntivo adjacente ao tecido tumoral. Os valores foram obtidos em μm e convertidos em mm. Para análise no teste estatístico, foi levada em consideração a média dos valores obtidos em cada caso.

4.7 Imuno-histoquímica (IHQ)

Imuno-histoquímica foi realizada para investigar a presença da proteína ERK1/2 fosforilada, consistente com a ativação da via MAPK, nos casos que ainda tinham material tumoral suficiente (35 casos). Para isso, cortes de $4\mu\text{m}$ das amostras FFPE foram colocados em lâminas de vidro silanizadas (StarFrost, Knittel Glass, Germany). Primeiramente, o excesso de parafina foi retirado em xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) seguido de banhos de álcool (100%, 95% e 80%)(Merck). A recuperação antigênica foi feita com solução TRIS-EDTA (pH 8,0) e o bloqueio da peroxidase endógena foi feito com metanol e água oxigenada a 10 volumes, na proporção 1:1. A incubação do anticorpo primário foi feita por 18 horas a 4°C , com o anticorpo monoclonal de coelho anti-p-ERK1/2 (Thr202/Tyr204, CST #4376), diluído 1:100 com diluente de anticorpo. Em seguida, a reação foi visualizada através do sistema de polímero (EnVision; Dako Corporation, Carpinteria, USA) com uma hora e meia de incubação a temperatura ambiente, e foi utilizado como cromógeno a diaminobenzidina (Dako North America, Carpinteria, USA) por 1 a 7 minutos, de acordo com

inspeção visual. A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris por três minutos. Os cortes então foram desidratados com álcool (70%, 90%, 100%) e foi realizada a montagem das lâminas com Entellan (Merck), após a imersão das mesmas em xilol. Em todas as reações foram incluídos controle positivo (granuloma piogênico) e controle negativo (granuloma piogênico sem anticorpo primário). Os resultados foram avaliados por quatro observadores (B.P.C., R.S.G., V.F.B. e C.C.G) em microscópio óptico de luz, utilizando análise cega em relação aos resultados moleculares, e foi considerado como resultado positivo coloração nuclear e citoplasmática, independente da intensidade. As lâminas foram escaneadas em um aumento de 20X, utilizando Pannoramic MIDI Digital Slide Scanner (3DHistech, Hungary).

4.8 Análise estatística

A análise estatística foi realizada usando o software IBM SPSS Statistics for Windows, Versão 21.0 (Armonk, NY: IBM Corp.). A normalidade dos dados foi avaliada pelo teste de Shapiro-Wilk. A comparação entre o grupo "mutado" e o grupo "tipo selvagem" para cada variável (tamanho do tumor, espessura mínima, média e máxima da cápsula e idade) foi realizada pelo teste t de amostras independentes ou pelo teste U de Mann-Whitney, de acordo com a distribuição dos dados. O teste exato de Fisher foi utilizado para comparar o número de casos entre dois grupos: maxila *versus* mandíbula, região anterior *versus* região posterior e folicular *versus* extrafolicular. O nível de significância (p) foi estabelecido em 0,05.

5. RESULTADOS

Esses resultados estão descritos no artigo científico observado no Apêndice 01.

5.1 Dados clínicos

A idade dos indivíduos variou entre 6 anos e 57 anos, com média de 17,9 anos. A quantidade de mulheres no grupo amostral foi de 25 e de homens foi de 13, gerando a proporção de mulheres:homens de 2:1. Foram encontrados 22 casos foliculares e 15 casos extrafoliculares (não foi possível ter acesso a esse dado de um dos casos), gerando a proporção de aproximadamente 1,5 caso folicular para cada caso extrafolicular. Apenas os casos centrais foram incluídos no estudo, e a maioria deles ocorreu na região anterior (n=26) e na maxila (n=24).

5.2 Resultados moleculares

27/38 casos apresentaram mutação no códon 12, sendo 15 com mutação *KRAS* p.G12V (c.35G>T) e 12 com mutação *KRAS* p.G12R (c.34G>C). A Figura 07 e a Figura 08 representam os resultados obtidos através do qPCR alelo-específico e sequenciamento de Sanger, respectivamente.

11/38 casos foram considerados *wild-type* para as mutações *KRAS* p.G12.

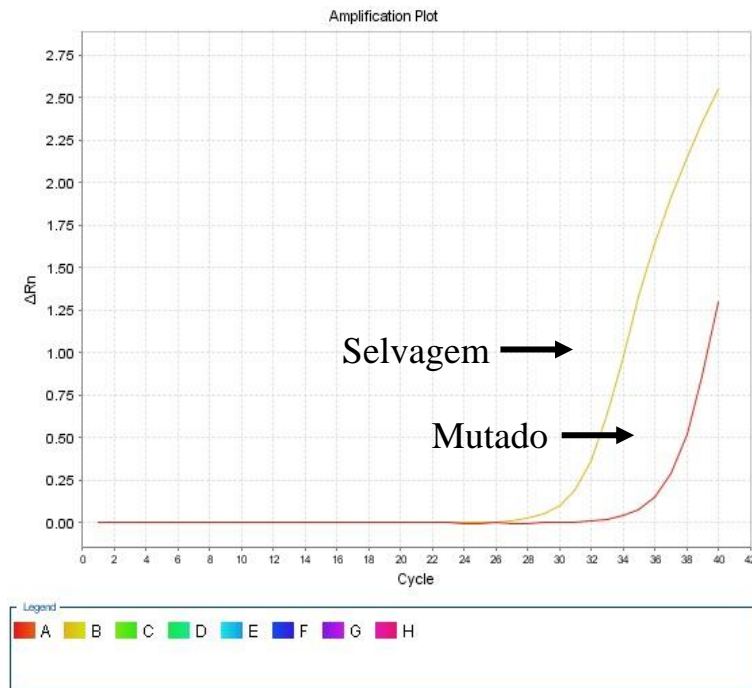


Figura 07: Análise da mutação *KRAS* p.G12V. Achados representativos da detecção da mutação *KRAS* p.G12V pela técnica qPCR alelo-específico, mostrando curva de amplificação tanto do alelo mutado quanto do alelo selvagem.

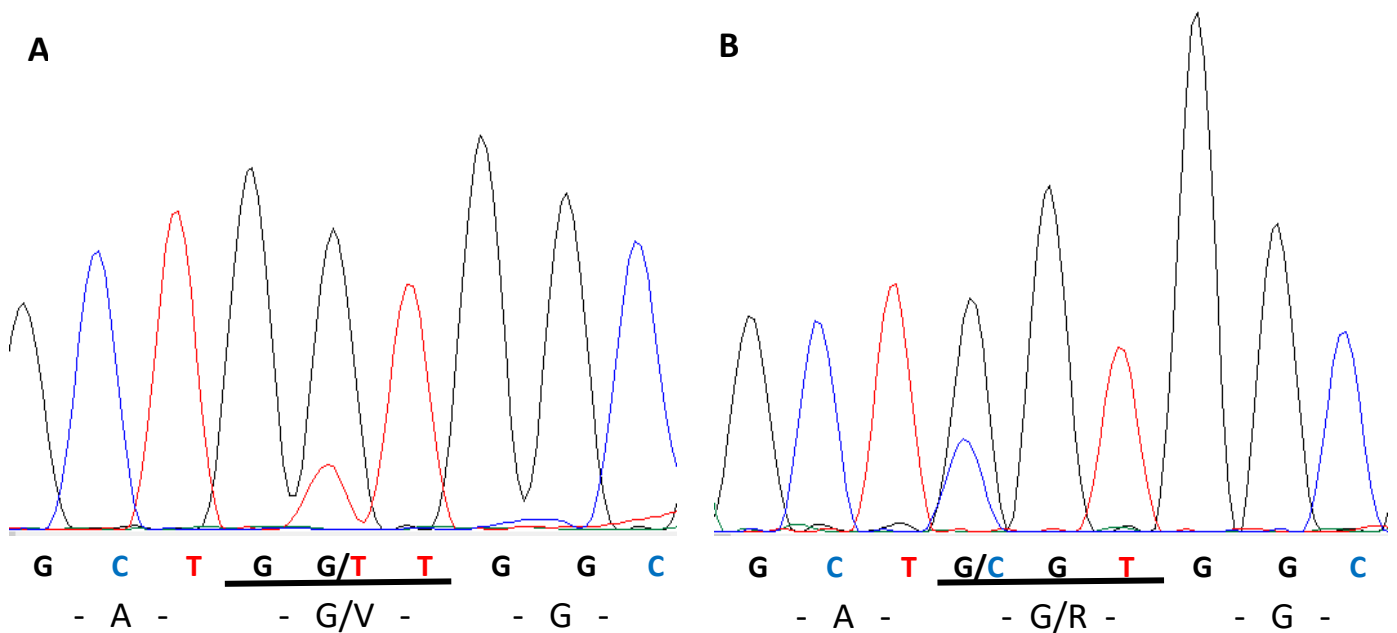


Figura 08: Mutação *KRAS* p.G12 detectada/confirmada pelo sequenciamento de Sanger. (A) Cromatograma do sequenciamento mostrando a troca de G>T, na posição 35, com conseqüente substituição do aminoácido Glicina pelo aminoácido Valina (p.G12V). (B) Troca de G>C, na posição 34, com conseqüente substituição do aminoácido Guanina pelo aminoácido Arginina (p.G12R).

5.3 Análise morfométrica da cápsula fibrosa

Foram feitas de 6 a 41 medições ao longo do material, dependendo da amostra. Os valores em mm das medições da capsula fibrosa estão listados na Tabela 01.

Tabela 01: Valores da análise morfométrica da cápsula fibrosa dos tumores odontogênicos adenomatoide.

Amostra	Medida mínima (mm)	Medida máxima (mm)	Medida média (mm)
1	0,367	3	2,6
2	0,392	2	1,4
3	0,8119	3,6343	2,6
4	0,6973	2,423	1,2
5	0,0692	1,239	0,4
6	0,3333	1,173	0,7
7	0,0987	0,8881	0,4
8	0,1036	3,5748	1,3
9	0,2464	2,5495	1,3
10	0,1831	1,8128	0,7
11	0,6279	1,5924	1,2
12	1,5179	2,0171	1,8
13	0,5113	3,1431	2
14	0,1871	0,6965	0,4
15	0,277095	1,49559	1,1
16	0,0587	1,0468	0,4
17	0,2351	2,7614	1,8
18	1,422987	3,935712	2,3
19	0,083251	1,36848	0,7
20	0,2526	1,565	0,9
21	0,7184	4	2,3
22	0,1055	0,4267	0,2
23	0,044348	0,369199	0,2
24	0,1971	0,6258	0,4
25	1,1117	2,9673	2,2
26	0,677	1,8206	1,3
27	1,5163	2,5636	2,1
28	0,4213	2,0234	1,1
29	0,072	0,5862	0,3
30	0,2348	0,3799	0,3
31	0,1939	1,0198	0,6
32	1,3181	3	2,1
33	na	na	na
34	0,1426	2,9727	1,6
35	0,05955	2,4686	1,4
36	0,2408	1,5925	0,7
37	0,256154	0,864227	0,4
38	0,256154	2,273234	0,6

na= dado não analisado.

5.4 Imuno-histoquímica (IHQ)

Foi observada marcação positiva para proteína ERK1/2 fosforilada em todos os casos analisados, em grupos celulares distintos. No geral, a imunoexpressão ocorreu de forma mais forte principalmente nas estruturas semelhantes a ductos, nos nódulos e nas estruturas semelhantes à rosetas. As células fusiformes também apresentaram marcação, sendo que as camadas dessas células que se encontravam mais próximas aos nódulos estavam fortemente marcadas, enquanto as mais distantes apresentaram marcação mais fraca ou até mesmo marcação negativa. Esse padrão foi observado na maioria dos casos, a não ser em um, em que esse padrão de marcação foi invertido (#23). Em alguns casos, foram encontradas áreas semelhantes a tumor odontogênico epitelial calcificante (8/38) e áreas semelhantes a cisto dentífero (9/38), que também expressaram ERK1/2 fosforilada. Pode-se observar na Figura 09 o padrão de marcação para ERK1/2 fosforilada nos diferentes tipos celulares, e no Quadro 01 pode-se observar essa marcação em parâmetro qualitativo para cada amostra.

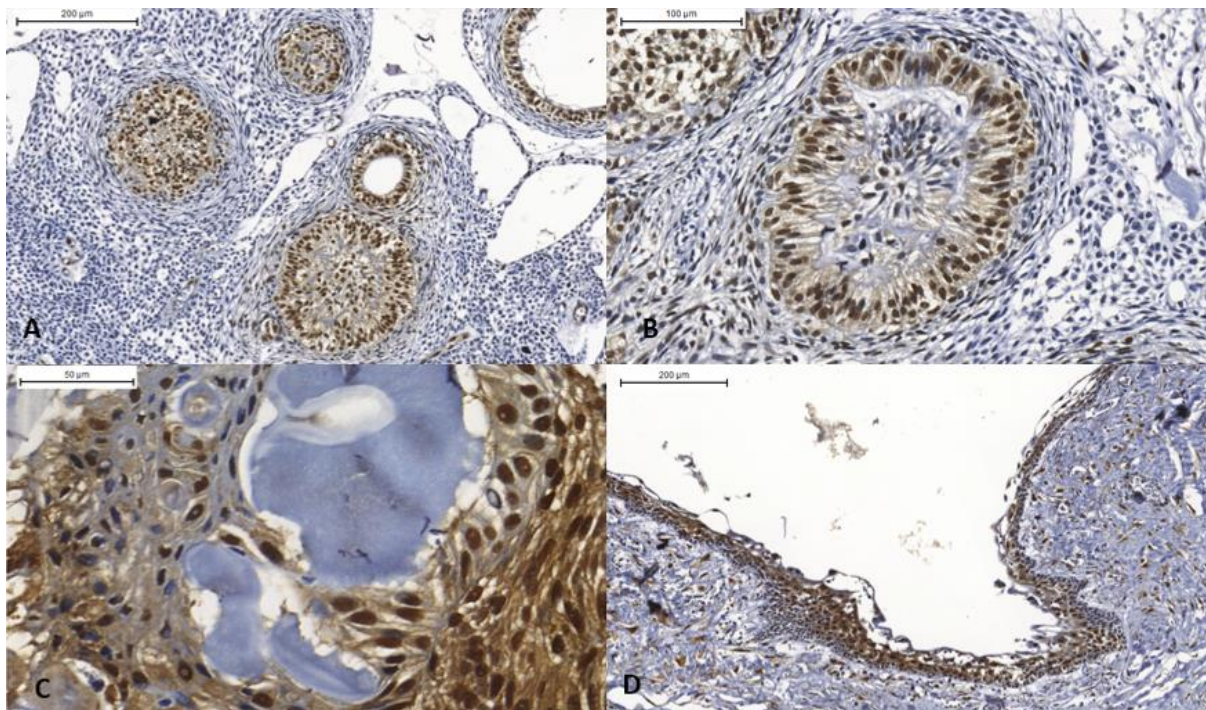


Figura 09: Detecção por imuno-histoquímica da forma fosforilada da proteína ERK1/2. Expressão imuno-histoquímica positiva nuclear e citoplasmática para a ERK1/2 fosforilada em: (A) estruturas semelhantes a ductos, nódulos e estruturas semelhantes a rosetas; (B) estrutura semelhante a roseta em maior aumento; (C) área semelhante a tumor odontogênico epitelial calcificante e; (D) áreas císticas.

Quadro 01: Expressão imuno-histoquímica da proteína ERK1/2 fosforilada.

Amostra	Estruturas semelhantes a ducto	Nódulos	Estruturas semelhantes a rosetas	Células fusiformes	Áreas semelhantes a TOEC	Áreas parcialmente císticas
1	+	+	+	+	na	na
2	+	+	+	+	na	na
3	+	na	+	+	+	+
4	+	+	+	+	na	+
5	+	+	+	+	na	na
6	+	+	na	+	na	na
7	+	+	+	+	+	na
8	+	+	+	+	+	na
10	+	+	+	-	na	na
11	+	+	+	+	+	na
12	+	+	+	+	na	na
13			Tumor	Positivo*		
14	+	+	+	+	na	na
15	na	+	na	+	+	na
17	+	na	+	+	na	+
18	+	+	+	+	na	+
19	+	+	+	+	+	-
20	+	+	+	+	na	na
21	+	+	+	+	na	na
22	+	+	na	+	na	+
23	+	+	+	+	na	+
24			Tumor	Positivo*		
25	+	+	+	+	+	na
26	+	+	+	+	na	na
27	+	+	+	+	na	na
28			Tumor	Positivo*		
29	+	+	+	+	+	na
30	+	+	+	+	na	na
31			Tumor	Positivo*		
32	+	+	+	+	na	+
34	+	+	+	+	na	na
35	+	+	+	+	na	na
36	+	+	+	+	na	na
37	+	+	+	+	na	+
38	+	+	+	+	na	+

na= não apresenta a estrutura; (+)= estrutura ERK 1/2 +; (-)= estrutura ERK 1/2 -; *= nota-se positividade, porém, material insuficiente para maior detalhes.

5.5 Análise estatística

Não houve associação estatística entre os dados clinicopatológicos estudados e os resultados moleculares, como pode-se observar no Quadro 02.

Quadro 02: Resultado análise estatística entre os parâmetros clinicopatológicos e grupo mutado/grupo selvagem.

Teste de normalidade Shapiro-Wilk	Teste t	Tamanho do tumor	Valor de p
		Grupo mutado	0,997
		Grupo selvagem	
Teste de normalidade Shapiro-Wilk	Teste U de Mann-Whitney	Espessura da cápsula(min) mm	Valor de p
		Grupo mutado	0,808
		Grupo selvagem	
Teste de normalidade Shapiro-Wilk	Teste U de Mann-Whitney	Espessura da cápsula(média) mm	Valor de p
		Grupo mutado	0,247
		Grupo selvagem	
Teste de normalidade Shapiro-Wilk	Teste t	Espessura da cápsula(max) mm	Valor de p
		Grupo mutado	0,206
		Grupo selvagem	
Teste de normalidade Shapiro-Wilk	Teste U de Mann-Whitney	Idade	Valor de p
		Grupo mutado	0,493
		Grupo selvagem	
Teste exato de Fisher		Casos mutados	Valor de p
		Maxila	0,737
		Mandíbula	
Teste exato de Fisher		Casos mutados	Valor de p
		Anterior	0,295
		Posterior	
Teste exato de Fisher		Casos mutados	Valor de p
		Folicular	1,000
		Extrafolicular	

Tabela 02: Dados clinicopatológicos e achados moleculares listados por amostras de casos de tumor odontogênico adenomatoide.

Amostra	Informação clínica					Histopatologia		Resultados Moleculares	
	Idade (anos)	Sexo	Localização I (mandíbula ou maxila)	Localização II (anterior ou posterior)	Subclassificação	Tamanho clínico do tumor (maior dimensão em cm)	Espessura da cápsula (média em mm)	pERK1/2 IHQ	Mutação <i>KRAS</i> códon 12
1	07	M	mandíbula	anterior	extrafolicular	na	2,6	positivo	p.G12V
2	22	F	maxila	posterior	folicular	na	1,4	positivo	p.G12V
3	24	M	maxila	posterior	folicular	3	2,6	positivo	p.G12V
4	19	F	maxila	anterior	folicular	1,8	1,2	positivo	p.G12V
5	12	F	mandíbula	anterior	extrafolicular	na	0,4	positivo	p.G12V
6	18	F	mandíbula	posterior	folicular	3	0,7	positivo	p.G12V
7	15	F	mandíbula	anterior	extrafolicular	1,2	0,4	positivo	p.G12V
8	6	F	mandíbula	anterior	folicular	1,5	1,3	positivo	p.G12V
9	17	F	maxila	anterior	extrafolicular	2	1,3	na	p.G12V
10	11	M	mandíbula	anterior	extrafolicular	1	0,7	positivo	p.G12V
11	12	F	maxila	anterior	folicular	2	1,2	positivo	p.G12V

12	12	M	maxila	anterior	folicular	2	1,8	positivo	p.G12V
13	14	M	maxila	posterior	folicular	3,5	2	positivo	p.G12V
14	28	F	maxila	posterior	extrafolicular	4	0,4	positivo	p.G12V
15	25	M	maxila	anterior	folicular	5,5	1,1	positivo	p.G12V
16	17	M	mandíbula	posterior	extrafolicular	1	0,4	na	p.G12R
17	57	F	mandíbula	posterior	extrafolicular	4,5	1,8	positivo	p.G12R
18	15	M	maxila	anterior	folicular	4	2,3	positivo	p.G12R
19	13	F	maxila	posterior	folicular	na	0,7	positivo	p.G12R
20	22	F	maxila	posterior	folicular	5	0,9	positivo	<i>wild-type</i>
21	12	F	maxila	anterior	extrafolicular	4	2,3	positivo	p.G12R
22	29	F	mandíbula	anterior	extrafolicular	1,5	0,2	positivo	p.G12R
23	17	M	maxila	anterior	folicular	na	0,2	positivo	p.G12R
24	14	M	maxila	posterior	folicular	3	0,4	positivo	<i>wild-type</i>
25	14	F	maxila	anterior	folicular	3	2,2	positivo	<i>wild-type</i>
26	17	F	maxila	anterior	folicular	3	1,3	positivo	<i>wild-type</i>
27	13	F	maxila	anterior	folicular	4	2,1	positivo	p.G12R
28	19	F	maxila	anterior	folicular	1	1,1	positivo	<i>wild-type</i>
29	na	F	mandíbula	posterior	extrafolicular	na	0,3	positivo	p.G12R

30	26	M	mandíbula	anterior	na	3	0,3	positivo	<i>wild-type</i>
31	25	F	mandíbula	anterior	extrafolicular	2	0,6	positivo	p.G12R
32	15	M	maxila	anterior	folicular	2	2,1	positivo	<i>wild-type</i>
33	12	F	mandíbula	anterior	extrafolicular	2,5	na	na	<i>wild-type</i>
34	17	F	mandíbula	posterior	folicular	3	1,6	positivo	<i>wild-type</i>
35	13	M	maxila	anterior	folicular	4	1,4	positivo	<i>wild-type</i> *
36	19	F	maxila	anterior	extrafolicular	0,4	0,7	positivo	<i>wild-type</i> *
37	13	F	maxila	anterior	folicular	1	0,4	positivo	p.G12R
38	23	F	maxila	anterior	extrafolicular	2,9	0,6	positivo	p.G12R

na= não disponível; M= sexo masculino; F= sexo feminino; IHQ= imuno-histoquímica; * casos *wild-type* para *KRAS* G12V/R, em que apenas foi analisado o status da mutação por Taqman qPCR alelo-específico.

6. DISCUSSÃO

O TOA já foi reportado como um dos componentes da Síndrome de Schimmelpenning. Esta síndrome é causada por mutações pós-zigóticas autossômicas dominante em *KRAS* e *HRAS* que sobrevive por mosaicismo somático (ERNST *et al.*, 2007; GROESSER *et al.*, 2012). Partindo desse pressuposto, em 2016 foi feita análise de uma amostra de TOA provindo de um paciente com a Síndrome de Schimmelpenning por sequenciamento de nova geração, utilizando um painel de mutações hotspot em 50 oncogenes e genes supressores de tumor, incluindo a família *RAS*. A presença da mutação *KRAS* p.G12V foi confirmada pela primeira vez nesse paciente sindrômico com múltiplos TOAs (GOMES *et al.*, 2016). Em seguida, nesse mesmo estudo, foi feita a validação dessa mutação ativadora no *KRAS* em um pequeno grupo de TOA, em casos esporádicos, e como resultado foi detectada a presença da mutação *KRAS* p.G12V em 77,8% dos casos (GOMES *et al.*, 2016). No presente estudo, a presença da mutação *KRAS* p.G12V foi confirmada em 15/38 casos, além disso foi reportada pela primeira vez a mutação *KRAS* p.G12R em TOA em 12/38 casos, totalizando a presença de mutação no códon 12 do *KRAS* em 71% (27/38) dos casos analisados. O resultado em dois casos considerados como *wild-type* foi obtido apenas através do teste qPCR alelo-específico, devido à baixa qualidade ou quantidade de DNA, portanto é possível que sejam falso negativos, nesse caso a frequência de casos com mutação no códon 12 de *KRAS* poderia ser ainda mais alta.

Estudos recentes demonstraram que *KRAS* é o proto-oncogene mais mutado em neoplasias humanas, e mutações no *KRAS* já foram descritas em cânceres, neoplasias benignas, outras doenças e até em condições pré-malignas (DHILLON *et al.*, 2007; MARINO-ENRIQUEZ & CHRISTOPHER, 2016; MYERS *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017). Os códons com a maior frequência de mutação são os 12, 13 e 61 respectivamente. Sabe-se que a frequência de cada tipo de mutação pode sofrer variações dependendo dos tipos tumorais referentes, porém, o motivo ainda não está elucidado. Como por exemplo, quando se leva em consideração o câncer de células não pequenas de pulmão, a mutação *KRAS* p.G12C ocorre com maior frequência, seguida da p.G12V, já o câncer colorretal e o adenocarcinoma pancreático ductal apresentam maior frequência da mutação *KRAS* p.G12D, e em segundo lugar p.G12V (BOS *et al.*, 1987; SMIT *et al.*, 1988; KARNOUB *et al.*, 2008; HAIGIS, 2017). A mutação *KRAS* p.G12 mais frequentemente encontrada nos casos de TOA segundo no nosso estudo é a segunda mutação mais frequente

nos tumores listados anteriormente. Já a mutação *KRAS* p.G12R, segunda mutação em ordem de frequência no códon 12 nos TOA segundo nosso estudo, é a terceira mutação mais frequente no adenocarcinoma ductal pancreático, no entanto é pouco frequente no câncer colorretal e câncer de células não pequenas de pulmão (revisado por HAIGIS, 2017).

Além disso, a mutação *KRAS* p.G12V em carcinoma colorretal está associada com comportamento agressivo, já nos casos de câncer de células não pequenas de pulmão essa mesma mutação está associada a um melhor prognóstico, comparado a casos com outras possíveis mutações no *KRAS* (ANDREYEV *et al.*, 2001; IZAR *et al.*, 2014; HAIGIS, 2017). Portanto a associação entre a presença das mutações no códon 12 do *KRAS* e o prognóstico da doença pode variar dependendo do tipo tumoral e de qual seria a mutação em questão, sendo considerada então contexto dependente. No entanto, não foi observada associação entre presença das mutações no códon 12 do *KRAS* com parâmetros clinicopatológicos neste estudo.

Até pouco tempo, acreditava-se que muitas dessas mutações “*driver*” (condutoras) fossem marcas específicas de cânceres, e grande parte das pesquisas são voltadas para o estudo de tumores malignos. Porém, hoje em dia sabe-se que mutações como *KRAS* p.G12V, p.G12A, p.G12D também já foram descritas em tumores benignos incluindo os tumores odontogênicos (MARINO-ENRIQUEZ & CHRISTOPHER, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017), em lesões não neoplásicas, como a endometriose (ANGLESIO *et al.*, 2017), e até em tecidos normais (MARTINCORENA *et al.*, 2015; RISQUES *et al.*, 2018). Recentemente, muitos pesquisadores têm estudado oncogenes em neoplasias benignas na tentativa de entender melhor os mecanismos envolvidos na tumorigênese, para aprimorar diagnósticos e tratamentos, e buscar associar esses conhecimentos para compreender melhor a patogênese do câncer. Afinal, como pode-se perceber, as neoplasias malignas compartilham algumas características clínicas e moleculares com os tumores benignos (MARINO-ENRIQUEZ & CHRISTOPHER, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017).

Levando em consideração o fato de que mutações no *KRAS* levam à ativação constitutiva da via das MAPK, e que pode ocorrer interação entre a ativação dessa via e outras vias reguladoras de atividades celulares importantes (como por exemplo a via PI3K-mTOR), investigou-se a imunexpressão de ERK1/2 fosforilada nos casos de TOA. Curiosamente, foi observada imunexpressão forte para a ERK1/2 fosforilada em todos os tipos de células tumorais, mesmo que em algumas tenham apresentado imunexpressão mais forte do que outras, e em todos os casos estudados, mesmo naqueles considerados *wild-type* para a

mutação *KRAS* p.G12, o que demonstra a ativação da via MAPK/ERK em todos os casos. Com isso podemos inferir que podemos não ter detectado a mutação (devido à baixa proporção de células mutadas, por exemplo), ou que teria um outro mecanismo ligado à ativação da via das MAPK nos tumores *wild-type* para as mutações no códon 12 de *KRAS*.

7. CONCLUSÃO

Em conclusão, pode-se sugerir que a frequência de mutação *KRAS* no códon 12 dos TOAs é alta, e que a via MAPK/ERK está ativada em diversos tipos de células tumorais. Não houve associação estatística entre a presença dessas mutações *KRAS* p.G12 e os aspectos clinicopatológicos no grupo de TOAs estudados. Levando em consideração esses achados, a presença da mutação *KRAS* p.G12V ou *KRAS* p.G12R pode ser um fator que favoreça o diagnóstico de tumor odontogênico adenomatoide em casos de dificuldade diagnóstica. Além disso, outros estudos seriam necessários para ajudar na compreensão do comportamento e a detectar se os casos tumorais *wild-type* para essas mutações descritas apresentariam algum outro perfil de mutações em *KRAS* ou outros genes.

REFERÊNCIAS

ANDREYEV HJ, NORMAN AR, CUNNINGHAM D, *et al.* Kirsten ras mutations in patients with colorectal cancer: the 'RASCAL II study'. *Br J Cancer* 2001; 85: 692-696.

ANGLESIO MS, PAPADOPOULOS N, AYHAN A, *et al.* Cancer-Associated Mutations in Endometriosis without Cancer. *N Engl J Med* 2017; 376: 1835-1848.

BARNES L, EVESON JW, REICHART P, *et al.* Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours. 2005.

BOS JL, FEARON ER, HAMILTON SR, *et al.* Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297.

BROWN NA, ROLLAND D, MCHUGH JB, *et al.* Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res* 2014; 20: 5517-5526.

DHILLON AS, HAGAN S, RATH O, *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. *Oncogene* 2007; 26: 3279-3290.

DINIZ MG, GOMES CC, GUIMARÃES BV, *et al.* Assessment of BRAF V600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol* 2015; 36: 5649-5653.

DINIZ MG, GOMES CC, SOUZA SF, XAVIER GM, GOMEZ RS. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol* 2017; 72: 155-173.

ERNST LM, QUINN PD, ALAWI F. Novel oral findings in Schimmelpenning syndrome. *Am J Med Genet A* 2007; 143A: 881-883.

FORRESTER K, ALMOGUERA C, HAN K, GRIZZLE WE, PERUCHO M. Detection of high incidence of K-ras oncogenes during human colon tumorigenesis. *Nature* 1987; 327: 298-303.

GOMES CC, DE SOUSA SF, DE MENEZES GH, *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol* 2016; 56: e3-5.

GROESSER L, HERSCHBERGER E, RUETTEN A, *et al.* Postzygotic *HRAS* and *KRAS* mutations cause nevus sebaceous and Schimmelpenning Syndrome. *Nat Genet* 2012; 44: 783-787.

HAIGIS KM. *KRAS* Alleles: The Devil Is in the Detail. *Trends in Cancer* 2017; 3: 686-697.

IZAR B, ZHOU H, HEIST RS, *et al.* The prognostic impact of *KRAS*, its codon and aminoacid specific mutations, on survival in resected stage I lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol* 2014; 9: 1363-1369.

MARINO-ENRIQUEZ A, FLETCHER CD. Shouldn't we care about the biology of benign tumors? *Nat Rev Cancer* 2014; 14: 901-902.

MARTINCORENA I, ROSHAN A, GERSTUNG M, *et al.* Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science* 2015; 348: 880-886.

MENDONZA MC, ER EE, BLENIS J. The Ras-ERK and PU3K-m TOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci* 2011; 36: 320-328.

MONTAÑO A, FORERO-CASTRO M, MARCHENA-MENDONZA D, BENITO R, HERNÁNDEZ-RIVAS JM. New Challenges in targeting Signaling Pathways in Acute Lymphoblastic Leukemia by NGS Approaches: An Update. *Cancers* 2018; 10: pii: E110.

MYERS MB, BANDA M, MCKIM KL, *et al.* Breast Cancer Heterogeneity Examined by High-Sensitivity Quantification of *PIK3CA*, *KRAS*, *HRAS*, and *BRAF* Mutations in Normal Breast and Ductal Carcinomas. *Neoplasia* 2016; 18: 253-63.

NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, CHI AC. *Patologia Oral &Maxilofacial*. 4^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p664-666p.

NIKIFOROV YE. Thyreoid carcinoma: molecular pathways and therapeutic targets. *Mod pathol* 2008; 21: S37-43.

PEYSSONNAUX C, EYCHÈNE A. The raf/mek/erk pathways: new concepts of activation. *Biol Cell* 2001; 93: 53-62.

PHILIPSEN HP, BIRN H. The adenomatoid odontogenic tumour. Ameloblastic adenomatoid tumour or adeno-ameloblastoma. *Acta Pathol Microbiol Scand* 1969; 75: 375-398.

PHILIPSEN HP, REICHART PA, SLOOTWEN PJ, *et al.* Odontogenic Tumours. World Health Organization Classification of Tumours: Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer 2005; 296-300.

PHILIPSEN HP, REICHART PA. Adenomatoid odontogenic tumour: facts and figures. *Oral Oncol* 1999; 35: 125-131.

PHILIPSEN HP, KHONGKHUNTHIANG P, REICHART PA. The adenomatoid odontogenic tumour: an update of selected issues. *J Oral Phal Med* 2016; 45: 394-398.

POLLOCK PM, HARPER UL, HANSEN KS, *et al.* High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet* 2003; 33: 19-20.

PRIOR IA, LEWIS PD, MATTOS C. A Comprehensive Survey of Ras Mutations in Cancer. *Cancer Res* 2012; 72: 2457-2467.

RISQUES RA, KENNEDY SR. Aging and the rise of somatic cancer-associated mutations in normal tissues. *PLoS Genet* 2018; 14: e1007108.

RODENHUIS S, VAN DE WETERING ML, MOOI WJ, EVERS SG, VAN ZANDWIJK N, BOS JL. Mutational activation of the K-ras oncogene. A possible pathogenetic factor in adenocarcinoma of the lung. *N Engl J Med* 1987; 317: 929-935.

SMIT VT, BOOT AJ, SMITS AM, FLEUREN GJ, CORNELISSE CJ, BOS JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 1988; 16: 7773-7782.

TAKATA T, SLOOTWEG PJ. Introduction. In: El-Naggar A, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon, France: IARC, 2017. p. 205.

ZHOU L, BABA Y, KITANO Y, *et al.* KRAS, BRAF, and PIK3CA mutations, and patient prognosis in 126 pancreatic cancers: pyrosequencing technology and literature review. *Med Oncol* 2016; 33: 32.

WILFINGER WW, MACKEY K, CHOMCZYNSKI P. Effect of pH and ionic strength on the spectrophotometric assessment of nucleic acid purity. *Biotechniques* 1997; 22: 474-476, 478-481.

WRIGHT JM, KUSAMA K. Adenomatoid odontogenic tumour. In: El-Naggar A, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootwed PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon, France: IARC, 2017, p221-222.

KARNOUB AE, WEINBERG AR. Ras oncogenes: split personalities. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008; 9: 517-531.

KATO S, LIPPMAN SM, FLAHERTY KT, KURZROCK R. The Conundrum of Genetic “Drivers” in Benign Conditions. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108: pii: djw036.

KRAMER IRH, PINDBORG JJ. WHO International Histological Classification of Tumour. No. 5. Histological typing of odontogenic tumours, jaw cysts, and allied lesions. Springer Verlag, Berlin 1971.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. *Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7^a edição. Elsevier; 2005. 1568p.

KURPPA KJ, CATÓN J, MORGAN PR, *et al*. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol* 2014; 232: 492-498.

APÊNDICES

Apêndice 01: Artigo científico que apresenta os resultados deste trabalho.

Modern Pathology
<https://doi.org/10.1038/s41379-018-0194-4>



ARTICLE



KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features

Bruna Pizziolo Coura¹ · Vanessa Fátima Bernardes¹ · Sílvia Ferreira de Sousa² · Josiane Alves França¹ · Núbia Braga Pereira¹ · Hélder Antônio Rebelo Pontes³ · Aline Carvalho Batista⁴ · Danyel Elias da Cruz Perez⁵ · Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior⁶ · Lélia Batista de Souza⁷ · Manoela Domingues Martins⁸ · Marina Gonçalves Diniz⁹ · Ricardo Santiago Gomez¹⁰ · Carolina Cavalieri Gomes¹¹

Received: 8 August 2018 / Revised: 22 November 2018 / Accepted: 23 November 2018
© United States & Canadian Academy of Pathology 2019

Abstract

Adenomatoid odontogenic tumor is a benign encapsulated epithelial odontogenic tumor that shows an indolent clinical behavior. We have reported in a few adenomatoid odontogenic tumors mutations in *KRAS*, which is a proto-oncogene frequently mutated in cancer such as lung, pancreas, and colorectal adenocarcinomas. We aimed to assess *KRAS* mutations in the hotspot codons 12, 13, and 61 in a large cohort of adenomatoid odontogenic tumors and to test the association of these mutations with clinical (age, site, tumor size, follicular/extrafollicular subtypes) and histopathological parameters. Thirty eight central cases were studied. *KRAS* codon 12 mutations were assessed by TaqMan allele-specific qPCR (p.G12V/R) and/or Sanger sequencing, and codon 13 and 61 mutations were screened by Sanger. Histological tumor capsule thickness was evaluated by morphometric analysis. Additionally, the phosphorylated form of the MAPK downstream effector ERK1/2 was investigated. Statistical analysis was carried out to test the association of *KRAS* mutations with clinicopathological parameters. *KRAS* c.35 G >T mutation, leading to p.G12V, was detected in 15 cases. A novel mutation in adenomatoid odontogenic tumor, c.34 G >C, leading to p.G12R, was detected in 12 cases and the other 11 were wild-type. Codon 12 mutations were not associated with the clinicopathological parameters tested. *RAS* mutations are known to activate the MAPK pathway, and we show that adenomatoid odontogenic tumors express phosphorylated ERK1/2. In conclusion, a high proportion of adenomatoid odontogenic tumors (27/38, 71%) have *KRAS* codon 12 mutations, which occur independently of the clinicopathological features evaluated. Collectively, these findings indicate that *KRAS* mutations and MAPK pathway activation are the common features of this tumor and some cancer types. Although it is unclear why different codon 12 alleles occur in different disease contexts and the complex interactions between tumor genotype and phenotype need clarification, on the basis of our results the presence of *KRAS* p.G12V/R favors the adenomatoid odontogenic tumor diagnosis in challenging oral neoplasm cases.

ANEXOS

Anexo 01: aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob protocolo CAAE 30405514.5.0000.5149.



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


Projeto: CAAE – 30405514.5.0000.5149

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

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de maio de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de alterações moleculares em Tumores Odontogênicos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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


**Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**