

Universidade Federal de Minas Gerais  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-graduação em Patologia

Elisa Carvalho de Siqueira

**ALTERAÇÕES GENÉTICAS DE CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS**

Belo Horizonte – Minas Gerais

2019

Elisa Carvalho de Siqueira

## **ALTERAÇÕES GENÉTICAS DE CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS**

### **Versão final**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Patologia, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito para obtenção do grau de Doutor em Patologia

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Ferreira de Sousa e Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

Belo Horizonte – Minas Gerais

2019

043 Siqueira, Elisa Carvalho de.  
Alterações genéticas de cistos e tumores odontogênicos [manuscrito] / Elisa  
Carvalho de Siqueira. – 2019.  
76 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes. Coorientadores: Prof. Dra.  
Sílvia Ferreira de Sousa e Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de  
Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Cistos Odontogênicos. 3. Tumores Odontogênicos. 4. Genes  
Supressores de Tumor. 5. Oncogenes. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Sousa,  
Sílvia Ferreira de. III. Gomez, Ricardo Santiago. IV. Universidade Federal de  
Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 616

**ATA DA DEFESA DA TESE DA ALUNA**

**ELISA CARVALHO DE SIQUEIRA**

Realizou-se, no dia 10 de dezembro de 2019, às 14 horas, Bloco G-4º andar – sala 23 - ICB, da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de Tese, intitulada "ALTERAÇÕES GENÉTICAS DE CISTOS E TUMORES ODONTOGÊNICOS", apresentada por ELISA CARVALHO DE SIQUEIRA, número de registro 2016663841, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Profª. Carolina Cavaliéri Gomes - Orientadora (UFMG), Profa. Sílvia Ferreira Sousa – Co-orientadora (UFMG), Prof. Felipe Paiva Fonseca (UFMG), Profª. Luciana Bastos Rodrigues (UFMG), Profª. Soraya de Mattos Carmargo Grossmann Almeida (PUC/MINAS), Profª. Giovanna Ribeiro Souto (PUC MINAS).

A Comissão considerou a Tese:

Aprovada  
 Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 10 de dezembro de 2019.

  
Profª. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes – Orientadora

  
Profª. Dra. Sílvia Ferreira de Sousa – Co-Orientadora

  
Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca

  
Profª. Luciana Bastos Rodrigues

  
Profª. Soraya de Mattos Carmargo Grossmann Almeida

  
Prof. Giovanna Ribeiro Souto

Faculdade de Medicina - UFMG  
Campus Saúde  
Centro de Pós-Graduação  
Av. Professor Alfredo Balena, 190 - 5 andar  
Centro - Cep: 301300100  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-9640 - 3403-9641  
cpg.ppg-patol@gmail.com

Instituto de Ciência Biológicas - UFMG  
Campus Pampulha  
Departamento de Patologia Geral  
Av. Presidente Antônio Carlos, 6627  
Pampulha - Cep: 31270-901  
Belo Horizonte - MG  
Tel: 3409-2878  
dpat@icb.ufmg.br

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, pelas melhores oportunidades oferecidas e abraçadas.

Aos meus pais, pela dedicação, incentivo e amor incondicional.

Ao Marcos, que me acompanha há anos, sempre na torcida, de forma especial e carinhosa.

À minha orientadora e professora Carolina Cavaliéri Gomes, pelos ensinamentos, disponibilidade, dedicação, incentivos e confiança em desenvolver este projeto. Obrigada por tudo!

À professora Sílvia Ferreira de Sousa, por todo tempo dedicado ao projeto, pelo companheirismo, conhecimento compartilhado e pela amizade. Muito obrigada!

Ao professor Ricardo Santiago Gomez, pela bagagem técnica e científica compartilhada ao longo destes anos.

Ao professor Ricardo Alves Mesquita e Josiane Alves França, por terem contribuído, de forma especial, no desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Fernanda Viviane Mariano e Pablo Augustin Vargas, da Universidade Estadual de Campinas, ao professor Rogerio de Oliveira Gondak, da Universidade Federal de Santa Catarina, e aos professores Bruno Augusto Benevenuto de Andrade e Mário José Romañach, da Universidade Federal do Rio de Janeiro, por contribuírem com amostras para o estudo.

Ao Laboratório Multiusuários de Genômica (ICB-UFMG), pelo apoio técnico durante o desenvolvimento dos sequenciamentos de nova geração, em especial ao técnico e doutorando Rennan Garcias Moreira, sempre disposto a ajudar.

Ao Laboratório de Patologia Buco-Maxilo-Facial (FO-UFMG), técnicos Domenico, Daniela e Mara, pela disponibilidade e auxílio técnico.

Ao Centro de Aquisição de Imagens (ICB-UFMG), pela captura de imagens digitais para este estudo.

Aos membros da banca do meu Exame de Qualificação, Professoras Giovanna Ribeiro Souto, Mônica Maria Demas Álvares Cabral e Marina Gonçalves Diniz, pelo tempo despendido na análise criteriosa do meu trabalho, que me possibilitou chegar a este momento.

Aos colegas e amigos do Doutorado, do Laboratório de Patologia Molecular (FO-UFMG) e do Laboratório de Biologia Integrativa do Câncer (ICB-UFMG), pela agradável convivência e conhecimento adquirido.

Aos colegas e professores do Departamento de Patologia Geral (ICB-UFMG), pela receptividade e pela experiência que marcaram minha trajetória acadêmica.

Aos colegas e amigos da Faculdade Sete Lagoas e do Grupo de Pesquisa em Radiologia Diagnóstica e Terapêutica da Santa Casa de Belo Horizonte, que sempre acreditaram no meu trabalho.

As agências de fomento FAPEMIG, CAPES e CNPq, que apoiaram todo o percurso.

A todos os amigos e familiares que estão ao meu lado.

Obrigada a todos que estiveram comigo durante essa trajetória.

## RESUMO

Tumores odontogênicos e cistos odontogênicos do desenvolvimento são lesões raras, muitas delas apresentando patogênese incerta. A utilização de técnicas de sequenciamento de próxima geração (NGS) tem auxiliado na identificação de mutações patogênicas *drivers* (condutoras) que dão origem a diferentes tumores. Pouco se sabe sobre a patogênese molecular do cisto odontogênico glandular (COG), do carcinoma odontogênico com dentinoide (COD) e do mixoma odontogênico (MO). No presente trabalho, buscou-se investigar a patogênese molecular do COG, do COD e MO. O perfil mutacional de quatro amostras de COG e duas de COD foi investigado por meio de NGS, utilizando-se um painel de mutações *hotspot* em 50 oncogenes e genes supressores de tumor comumente alterados em cânceres humanos. A validação das variantes patogênicas detectadas foi realizada por meio do sequenciamento de Sanger. O painel de mutações *hotspot* já foi previamente utilizado em MO, porém não foram identificadas mutações recorrentes. Considerando que o MO mostra semelhanças morfológicas com miofibromas intraósseos e que estes exibem mutações recorrentes em *PDGFRβ*, realizou-se o sequenciamento de Sanger em amostras de MO para avaliar a presença de mutações em *PDGFRβ*. Nos casos de COD, foi realizada a imunohistoquímica para β-catenina para avaliar se as mutações detectadas nos genes *CTNNB1* e *APC* impactavam na localização da proteína β-catenina. Nenhuma mutação patogênica foi detectada no COG. Identificamos, nos COD, mutações patogênicas nos genes *CTNNB1* e *APC*, ambos membros da via de sinalização WNT/β-catenina. Consistente com a ativação dessa via de sinalização, os COD mostraram acúmulo de β-catenina, principalmente no citoplasma das células neoplásicas. As amostras de MO estudadas não apresentam mutações nos éxons 12 ou 14 do *PDGFRβ*. Concluiu-se, após investigações, que mutações patogênicas nos genes supressores de tumores e oncogenes estudados não parecem explicar a patogênese dos COG. Mutações ativadoras da via da β-catenina parecem ser importantes eventos na patogênese do COD. A ausência de mutações em *PDGFRβ* nos MO sugere uma diferença na patogênese desse tumor e miofibroma. Mais estudos com painéis com maior número de genes ou sequenciamento completo do exoma são necessários para investigar se mutações patogênicas recorrentes ocorrem em COG e MO. Além disso, o estudo de novos casos de COD é importante para avaliar se nossos resultados são relevantes.

**Palavras-chave:** Carcinomas odontogênicos. Cistos odontogênicos. Tumores odontogênicos. Sequenciamento de nova geração. Mutações. Oncogenes. Genes supressores de tumor.

## ABSTRACT

Odontogenic tumors and developmental cysts are rare and most of them show uncertain pathogenesis. The use of next generation sequencing techniques (NGS) help to identify pathogenic driver mutations of different tumors. Little is known about the molecular pathogenesis of glandular odontogenic cyst (GOC), odontogenic carcinoma with dentinoid (OCD), and odontogenic myxoma (OM). The present study aimed to investigate the molecular pathogenesis of these three odontogenic lesions. To investigate the mutational profile of GOC, OCD we used a panel of hotspot mutations in 50 oncogenes and tumor suppressor genes, submitted to NGS. The pathogenic variants were validated by Sanger sequencing. This hotspot panel had already been used in OM, but no recurrent pathogenic mutations were identified. Considering that OM shows morphological similarities with intraosseous myofibromas and these lesions exhibit mutations in *PDGFR $\beta$* , Sanger sequencing was performed in OM samples to assess hotspot mutations in *PDGFR $\beta$* . Immunohistochemistry was performed in OCD cases to assess whether mutations detected in the *CTNNB1* and *APC* genes impacted the localization of the  $\beta$ -catenin protein. No pathogenic mutations were detected in GOC. We identified pathogenic mutations in *CTNNB1* and *APC* genes in OCD, both components of the WNT-signaling/ $\beta$ -catenin pathway. Consistent with activation of this signaling pathway, the tumors showed strong  $\beta$ -catenin accumulation mainly in the cytoplasm of neoplastic cells. The OM samples did not show *PDGFR $\beta$*  mutations. Pathogenic mutations in the tumor suppressor genes and oncogenes studied do not seem to explain the pathogenesis of GOC. Activating mutations of the  $\beta$ -catenin pathway appear to be important events in the pathogenesis of OCD. The absence of mutations in *PDGFR $\beta$*  in OM indicates a difference in the pathogenesis of this tumor and myofibroma. Further studies with larger gene panels or whole exome sequencing are needed to investigate whether recurrent pathogenic mutations occur in GOC and OM. In addition, the study of new cases of COD is important to assess whether our results are relevant.

**Keywords:** Odontogenic carcinomas. Odontogenic cysts. Odontogenic tumors. Next generation sequencing. Mutation. Oncogenes. Tumor suppressor genes.



## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** Genes supressores de tumores e oncogenes incluídos no *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2*. Página 29
- Tabela 2** Primers utilizados para as reações em cadeia da polimerase para o gene *PDGFRβ*. Página 33
- Tabela 3** Estudos que reportaram mutações no éxon 12 e no éxon 14 do gene *PDGFRβ* em miofibromas, na língua inglesa. Página 35
- Tabela 4** Dados clínicos e imaginológicos dos casos de cisto odontogênico glandular, carcinoma odontogênico com dentinoide e mixoma odontogênico, incluídos no estudo. Página 37
- Tabela 5** Caracterização das variantes *missense* de um único nucleotídeo detectadas nas amostras de cisto odontogênico glandular. Página 40

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Características microscópicas do cisto odontogênico glandular	Página 39
<b>Figura 2</b>	Exame imaginológico dos casos de carcinoma odontogênico com dentinoide	Página 42
<b>Figura 3</b>	Aspectos microscópicos do caso #1 de carcinoma odontogênico com dentinoide, após recorrência	Página 43
<b>Figura 4</b>	Características microscópicas do caso #1 de carcinoma odontogênico com dentinoide (tumor primário), após enucleação	Página 44
<b>Figura 5</b>	Aspectos microscópicos do caso #2 de carcinoma odontogênico com dentinoide, após recorrência	Página 45
<b>Figura 6</b>	Características microscópicas do tumor primário do caso #1 de carcinoma odontogênico com dentinoide	Página 46
<b>Figura 7</b>	Representação das mutações identificadas nos genes <i>CTNNB1</i> e <i>APC</i> nos carcinomas odontogênicos com dentinoide	Página 47
<b>Figura 8</b>	Via WNT e suas consequências na presença de mutações em <i>APC</i> e <i>CTNNB1</i>	Página 48
<b>Figura 9</b>	Imunoistoquímica para detecção de $\beta$ -catenina nos dois casos de carcinoma odontogênico com dentinoide	Página 49
<b>Figura 10</b>	Fotomicrografia representativa de mixoma odontogênico	Página 50
<b>Figura 11</b>	Mutações <i>hotspot</i> dos éxons 12 e 14 do gene <i>PDGFR<math>\beta</math></i> que foram avaliadas nos mixomas odontogênicos	Página 51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>ABL1</i>	Do inglês <i>Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
<i>AKT1</i>	Do inglês <i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
<i>ALK</i>	Do inglês <i>anaplastic lymphoma kinase</i>
<i>AML</i>	Actina de músculo liso
<i>APC</i>	Do inglês <i>adenomatous polyposis coli</i>
<i>ATM</i>	Do inglês <i>ataxia telangiectasia mutated</i>
<i>BRAF</i>	Do inglês <i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B</i>
<i>CDH1</i>	Do inglês <i>cadherin 1</i>
<i>CDKN2A</i>	Do inglês <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A</i>
<i>CK1<math>\alpha</math></i>	Do inglês <i>casein kinase 1<math>\alpha</math></i>
cm	Centímetros
<i>CME</i>	Carcinoma mucoepidermoide
<i>COC</i>	Cisto odontogênico calcificante
<i>COD</i>	Carcinoma odontogênico com dentinoide
<i>COG</i>	Cisto odontogênico glandular
<i>COSMIC</i>	Do inglês <i>Catalogue of Somatic Mutations in Cancer</i>
<i>CSF1R</i>	Do inglês <i>colony stimulating factor 1 receptor</i>
<i>CTNNB1</i>	Do inglês <i>catenin beta 1</i>
<i>DAB</i>	Diaminobenzidina
<i>dbSNP</i>	Do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism Database of genomic variants</i>
<i>EGFR</i>	Do inglês <i>epidermal growth factor receptor</i>
<i>EMA</i>	Do inglês <i>epithelial membrane antigen</i>
<i>ERBB2</i>	Do inglês <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
<i>ERBB4</i>	Do inglês <i>v-erb-b2 avian erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4</i>
<i>EZH2</i>	Do inglês <i>enhancer of zeste homolog 2 (Drosophila)</i>
<i>FBXW7</i>	Do inglês <i>F-box and WD repeat domain containing 7</i>
<i>FGFR1</i>	Do inglês <i>fibroblast growth factor receptor 1</i>
<i>FGFR2</i>	Do inglês <i>fibroblast growth factor receptor 2</i>
<i>FGFR3</i>	Do inglês <i>fibroblast growth factor receptor 3</i>
<i>FLT3</i>	Do inglês <i>fms-related tyrosine kinase 3</i>
<i>gDNA</i>	Do inglês <i>genomic DNA</i>

<i>GNA11</i>	Do inglês <i>G protein subunit alpha 11</i>
<i>GNAQ</i>	Do inglês <i>G protein subunit alpha q</i>
<i>GSK3</i>	Do <i>glycogen synthase kinase 3</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
<i>Hg19</i>	Do inglês <i>Human Genome version 19</i>
<i>HNF1A</i>	Do inglês <i>hepatic nuclear factor 1</i>
<i>HRAS</i>	Do inglês <i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>IDH1</i>	Do inglês <i>isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 1</i>
<i>IDH2</i>	Do inglês <i>isocitrate dehydrogenase (NADP (+)) 2</i>
<i>IDT</i>	Do inglês <i>Integrated DNA Technology</i>
<i>IGV</i>	Do inglês <i>Integrated Genomics Viewer</i>
<i>INDEL</i>	Do inglês <i>insertion/deletion</i>
<i>JAK2</i>	Do inglês <i>Janus kinase 2</i>
<i>JAK3</i>	Do inglês <i>Janus kinase 3</i>
<i>KDR</i>	Do inglês <i>kinase insert domain receptor</i>
<i>KIT</i>	Do inglês <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>KRAS</i>	Do inglês <i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma 2 viral oncogene homolog</i>
<i>LRP</i>	Do inglês <i>low-density lipoprotein receptor-related protein</i>
µl	Microlitro
<i>MAML2</i>	Do inglês <i>mastermindlike-2</i>
<i>MET</i>	Do inglês <i>met proto-oncogene</i>
<i>MLH1</i>	Do inglês <i>mutL homolog 1</i>
<i>MNV</i>	Do inglês <i>multi-nucleotide variant</i>
MO	Mixoma odontogênico
<i>MPL</i>	Do inglês <i>myeloproliferative leukemia virus oncogene</i>
ng	Nanogramas
<i>NGS</i>	Do inglês <i>next generation sequencing</i>
<i>NOTCH1</i>	Do inglês <i>notch receptor 1</i>
<i>NPM1</i>	Do inglês <i>nucleophosmin 1</i>
<i>NRAS</i>	Do inglês <i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde

<i>P27</i>	Do inglês <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
<i>P53</i>	Do inglês <i>tumor protein p53</i>
<i>PCNA</i>	Do inglês <i>proliferating cell nuclear antigen</i>
<i>PCR</i>	Do inglês <i>polymerase chain reaction</i>
<i>PDGF</i>	Do inglês <i>platelet-derived growth factor</i>
<i>PDGFR</i>	Do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor</i>
<i>PDGFRA</i>	Do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor alfa</i>
<i>PDGFRβ</i>	Do inglês <i>platelet-derived growth factor receptor beta</i>
<i>PIK3CA</i>	Do inglês <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
<i>PKA</i>	Do inglês <i>cAMP-dependent protein kinase A</i>
<i>PLAG1</i>	Do inglês <i>pleomorphic adenoma gene 1</i>
pM	Picomolar
pmol	Picomol
<i>PRKARIA</i>	Do inglês <i>protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha</i>
<i>PolyPhen2</i>	Do inglês <i>Polymorphism Phenotyping v2</i>
<i>PTCH1</i>	Do inglês <i>human patched 1</i>
<i>PTEN</i>	Do inglês <i>phosphatase and tensin homolog</i>
<i>PTPN11</i>	Do inglês <i>protein tyrosine phosphatase non-receptor type 11</i>
<i>Q score</i>	Do inglês <i>Phred quality score</i>
<i>RB1</i>	Do inglês <i>RB transcriptional corepressor 1</i>
<i>RET</i>	Do inglês <i>ret proto-oncogene</i>
<i>SIFT</i>	Do inglês <i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
<i>SMAD4</i>	Do inglês <i>SMAD family member 4</i>
<i>SMARCB1</i>	Do inglês <i>SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1</i>
<i>SMO</i>	Do inglês <i>smoothened, frizzled class receptor</i>
<i>SNV</i>	Do inglês <i>single nucleotide variant</i>
<i>SNP</i>	Do inglês <i>common single nucleotide polymorphisms</i>
<i>SRC</i>	Do inglês <i>SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase</i>
<i>STK11</i>	Do inglês <i>serine/threonine kinase 11</i>

<i>TCF</i>	Do inglês <i>T cell-specific transcription factor</i>
TOA	Tumor odontogênico adenomatoide
<i>TP53</i>	Do inglês <i>tumor protein p53</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFRJ	Universidade Federal do Rio de Janeiro
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
<i>VHL</i>	Do inglês <i>von Hippel-Lindau tumor suppressor</i>
<i>VUS</i>	Do inglês <i>variants of unknown significance</i>
<i>WES</i>	Do inglês <i>whole exome sequencing</i>
<i>WT</i>	Do inglês <i>wild-type</i>

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b>	<b>20</b>
<b>2.1 Cisto odontogênico glandular</b>	<b>21</b>
<b>2.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide</b>	<b>23</b>
<b>2.3 Mixoma odontogênico</b>	<b>24</b>
<b>3 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
<b>3.1 Objetivo geral</b>	<b>26</b>
<b>3.2 Objetivos específicos</b>	<b>26</b>
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>27</b>
<b>4.1 Aspectos éticos</b>	<b>27</b>
<b>4.2 Coleta das amostras, armazenamento e confirmação de diagnóstico</b>	<b>27</b>
<b>4.3 Extração do <i>DNA</i> genômico</b>	<b>27</b>
<b>4.4 Sequenciamento de nova geração</b>	<b>28</b>
<b>4.5 Análise <i>in silico</i> do sequenciamento de nova geração</b>	<b>30</b>
<b>4.6 Sequenciamento de Sanger para validação dos resultados do sequenciamento de nova geração</b>	<b>31</b>
<b>4.7 Imunoistoquímica para Ki-67 e <math>\beta</math>-catenina</b>	<b>32</b>
<b>4.8 Análise em <i>PCR</i> do gene <i>PDGFR<math>\beta</math></i></b>	<b>33</b>
<b>4.9 Sequenciamento de Sanger para análise do gene <i>PDGFR<math>\beta</math></i></b>	<b>34</b>
<b>4.10 Análise dos dados</b>	<b>34</b>
<b>5 RESULTADOS</b>	<b>36</b>
<b>5.1 Caracterização das amostras</b>	<b>36</b>
<b>5.2 Cisto odontogênico glandular</b>	<b>36</b>
<b>5.2.1 Amostra</b>	<b>36</b>
<b>5.2.2 Sequenciamento de nova geração</b>	<b>39</b>
<b>5.3 Carcinoma odontogênico com dentinoide</b>	<b>41</b>
<b>5.3.1 Amostra</b>	<b>41</b>
<b>5.3.2 Relatos dos casos de carcinoma odontogênico com dentinoide</b>	<b>41</b>
<b>5.3.2.1 Carcinoma odontogênico com dentinoide – caso #1</b>	<b>41</b>
<b>5.3.2.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide – caso #2</b>	<b>44</b>
<b>5.3.3 Sequenciamento de nova geração</b>	<b>46</b>
<b>5.3.4 Imunoistoquímica para <math>\beta</math>-catenina</b>	<b>49</b>

<b>5.4 Mixoma odontogênico</b>	<b>50</b>
5.4.1 <i>Amostra</i>	50
5.4.2 <i>Análise molecular do gene PDGFR<math>\beta</math></i>	50
<b>6 DISCUSSÃO</b>	<b>52</b>
6.1 Cisto odontogênico glandular	52
6.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide	54
6.3 Mixoma odontogênico	57
<b>7 CONCLUSÃO</b>	<b>60</b>
7.1 Cisto odontogênico glandular	60
7.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide	60
7.3 Mixoma odontogênico	60
<b>8 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	<b>61</b>
<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>
<b>APÊNDICES</b>	<b>75</b>



# 1 INTRODUÇÃO

Cistos e tumores odontogênicos são lesões oriundas da proliferação de tecidos remanescentes da embriogênese dental que têm características clínicas, radiográficas e histopatológicas distintas (WRIGHT; SOLUK, 2017). Cistos odontogênicos de desenvolvimento e tumores odontogênicos malignos são lesões raras e, portanto, pouco estudadas. A falta de conhecimento dessas lesões pode dificultar o diagnóstico, influenciar no tratamento mais indicado, assim como no prognóstico do paciente (PEACOCK, 2017). No presente trabalho, estudou-se a patogênese molecular de três lesões odontogênicas. Destas, duas são benignas e, embora sejam incomuns, uma não foi submetida a estudos moleculares que tenham contemplado de forma ampla as prováveis mutações genéticas relacionadas a ela e à outra, mesmo diante de um sequenciamento de aproximadamente 2800 mutações, não se conseguiu demonstrar mutações patogênicas correlatas (SANTOS *et al.*, 2017). Entender a biologia molecular de lesões benignas possibilita identificar futuros alvos terapêuticos, principalmente para as lesões consideradas localmente agressivas, e também serve como modelo de identificação de vias de sinalização para tumores benignos que podem estar associados aos tumores malignos (MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER *et al.*, 2014). Condutores genéticos se apresentam com alta frequência em algumas lesões benignas e pré-malignas, bem como em condições da linha germinativa sem aumento da incidência de câncer (KATO *et al.*, 2016). Por último, estudou-se uma lesão odontogênica maligna recém-descrita, que pode apresentar similaridade genética com tumores não gnáticos.

O cisto odontogênico glandular (COG) é um cisto odontogênico do desenvolvimento, incomum, que corresponde a menos de 0,5% de todos os cistos odontogênicos (JONES; FRANKLIN, 2006). É um cisto que acomete frequentemente a mandíbula e tende a ser recorrente (SPEIGHT *et al.*, 2017). Ao exame microscópico, o COG apresenta características epiteliais com diferenciação glandular, podendo surgir dos remanescentes da lâmina dental (SPEIGHT *et al.*, 2017). Critérios específicos para o diagnóstico do COG já foram descritos (FOWLER *et al.*, 2011), no entanto, o aspecto histopatológico é similar ao carcinoma mucoepidermoide (CME) intraósseo, o que torna, muitas vezes, desafiadora a análise histopatológica da biópsia incisiva para diagnóstico. Atualmente, essas duas lesões podem ser diferenciadas devido ao perfil de expressão de citoqueratinas e a ausência de rearranjos genéticos de *MAML2* (do inglês *mastermindlike-2*) no COG (BISHOP *et al.*, 2014; PIRES *et al.*, 2004). Ainda em termos moleculares, mutações no gene *PTCH1* (do inglês *human patched*

1) foram avaliadas, uma vez que ele participa do processo de odontogênese. Entretanto, nenhuma mutação relacionada a esse gene nas amostras de COG avaliadas foi encontrada (BARRETO *et al.*, 2001). Outros marcadores moleculares, como a imunexpressão das proteínas Ki-67 e p53, foram testados como ferramenta diagnóstica a ser utilizada na distinção entre CME de baixo grau de malignidade e COG, mas não se mostraram úteis nessa distinção (KAPLAN *et al.*, 2005). Assim, alterações moleculares no COG foram pouco investigadas, e a patogênese dessa lesão, que mostra uma tendência de agressividade local, mantém-se obscura.

O carcinoma odontogênico com dentinoide (COD) é uma lesão ainda não reconhecida pela classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS) entre os tumores odontogênicos, mas representa uma entidade morfológicamente distinta das outras lesões odontogênicas já descritas, caracterizada, microscopicamente, pela presença de cordões e ninhos de células epiteliais com citoplasma eosinofílico ou claro, por vezes, exibindo pleomorfismo celular e nuclear, associadas com material dentinoide em um estroma mixoide (PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009). Clinicamente, acomete pacientes na quarta década de vida, com maior prevalência na mandíbula (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Até o presente momento, foram relatados apenas nove casos que preenchem os critérios histopatológicos necessários para o diagnóstico, e os relatos existentes sugerem que o perfil clínico do COD seja de um tumor de baixo grau de malignidade (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). No entanto, devido à sua raridade, não há, até o momento, nenhum estudo molecular acerca do COD.

A análise da literatura evidencia que, no contexto atual, o sequenciamento de nova geração (do inglês *next generation sequencing*, *NGS*) pode ser uma ferramenta valiosa na elucidação da patogênese de lesões odontogênicas por possibilitar a análise simultânea de várias mutações genéticas mesmo em amostras restritas de lesões sabidamente incomuns ou raras.

O mixoma odontogênico (MO) é uma neoplasia ectomesenquimal benigna caracterizada pela presença de um tecido frouxo, semelhante à polpa dental que contém células estreladas e/ou fusiformes dispersas em um estroma extracelular mixoide (REGEZI, 2002; TAKATA; SLOOTWEG, 2017). Alguns estudos a fim de caracterizar o perfil molecular do MO foram desenvolvidos, incluindo, até mesmo, uma análise por *NGS*. Entretanto, mutações patogênicas *drivers* (condutoras) relacionadas ao MO não foram encontradas (PERDIGÃO *et al.*, 2005, GOMES *et al.*, 2011, MOREIRA *et al.*, 2011, SOUSA *et al.*, 2015, BEST-ROCHA *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2017). Os trabalhos que visam avaliar a imunexpressão de proteínas ainda predominam e já demonstraram a diferenciação miofibroblástica em alguns casos de MO (MOSHIRI *et al.*, 1992; MARTÍNEZ-MATA *et al.*, 2008; SIVAKUMAR *et al.*, 2008),

possibilitando um questionamento se o MO pode fazer parte do espectro das lesões miofibroblásticas, como miofibromas.

Miofibromas são tumores benignos compostos de células miofibroblásticas que podem se manifestar de maneira única ou múltipla (chamado de miofibromatose) (FOSS; ELLIS, 2000). Recentemente, mutações no gene *PDGFR $\beta$*  (do inglês *platelet-derived growth factor receptor beta*) foram descritas em alguns casos de miofibromas e de miofibromatose (OUDIJK *et al.*, 2012, MARTIGNETTI *et al.*, 2013, AGAIMY *et al.*, 2017, ARTS *et al.*, 2017, FU *et al.*, 2018, POND *et al.*, 2018, DACHY *et al.*, 2019). Com base na análise de mutações em *PDGFR $\beta$* , poderemos compreender se ambas as lesões apresentam uma mesma assinatura molecular.

Diante do exposto, os achados moleculares oriundos do presente estudo podem contribuir para elucidação da patogênese e da biologia molecular associada a estas lesões odontogênicas, podendo auxiliar no futuro, para que alguns casos sejam abordados por meio de terapias alvo-moleculares, contribuindo para um melhor prognóstico do paciente.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

As lesões de origem odontogênicas compõem um grupo de lesões heterogêneas, com características clínicas, radiográficas e histopatológicas distintas (WRIGHT; SOLUK, 2017). Cistos e tumores odontogênicos são lesões oriundas da proliferação de tecidos remanescentes da embriogênese dental. A classificação mais recente da OMS para as lesões odontogênicas maxilofaciais foi expandida devido ao grande número de estudos dedicados a essa temática, em busca de caracterizar melhor os perfis clínicos e moleculares de cada uma das lesões odontogênicas descritas na literatura científica (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). As classificações tanto de tumores como de cistos odontogênicos são constantemente atualizadas, e a mais recente classificação publicada pela OMS em 2017 referindo-se a cistos e tumores odontogênicos foi baseada na reclassificação de algumas lesões odontogênicas e inclusão de novas com base em dados genéticos, moleculares, clínicos e critérios diagnósticos histopatológicos (SOLUK-TEKKESIN; WRIGHT, 2017; TAKATA; SLOOTWEG, 2017).

As lesões odontogênicas podem ser divididas em tumores sólidos de massa celular não necessariamente neoplásicas e cistos odontogênicos (cavidade patológica revestida por tecido epitelial odontogênico) (EL-GEHANI *et al.*, 2009). Os tumores odontogênicos derivam de tecidos de origem ectomesenquimal e/ou epitelial da embriogênese dental e podem ser classificados, de acordo com perfil biológico, como tumores benignos ou malignos (WRIGHT; SOLUK, 2017). Os cistos odontogênicos são classificados como cistos do desenvolvimento e cistos inflamatórios (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). A maior parte das lesões de origem odontogênica são incomuns e, portanto, poucas vezes são alvos de estudos, o que gera dificuldade diagnóstica em razão da falta ou escassez de descrição histopatológica detalhada e de caracterização e definição da etiopatogênese. A ausência de informações acerca da lesão influencia na indicação do tratamento mais adequado e, portanto, pode interferir no prognóstico do paciente (PEACOCK, 2017).

Apesar dos avanços alcançados na elucidação da patogênese molecular de lesões de origem odontogênica, os eventos moleculares que participam na tumorigênese do COG, do COD e do MO permanecem não compreendidos. Portanto, o estudo de lesões incomuns ou raras propicia à comunidade científica o entendimento da biologia tumoral. Além disso, atualmente, devido ao grande impacto das terapias personalizadas no tratamento de lesões, o estudo da biologia molecular dessas lesões odontogênicas que podem provocar mutilação, quando não diagnosticadas precocemente, é de grande valia. Assim sendo, torna-se necessária

a definição de marcadores moleculares que poderão auxiliar no diagnóstico e, posteriormente, no tratamento da lesão. Portanto, alterações moleculares têm sido estudadas a fim de definir esses marcadores diagnósticos, para promover um melhor prognóstico ao paciente, assim como compreender a patogênese molecular dos tumores. Nesse contexto, deseja-se investigar o perfil mutacional do COG, do COD e do MO.

## 2.1 Cisto odontogênico glandular

O COG é um cisto de desenvolvimento de origem odontogênica (remanescentes da lâmina dental), incomum, com prevalência menor que 0,5% entre os cistos odontogênicos (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). O COG pode acometer tanto maxila como mandíbula, com predileção por região anterior desta, e apresenta um comportamento biológico localmente mais agressivo, com taxas de recidiva em torno de 30% dos casos, embora o crescimento seja lento (KAPLAN *et al.*, 2008; MACDONALD-JANKOWSKI, 2010; FAISAL *et al.*, 2015; SHAH *et al.*, 2016). Os COG de menores tamanhos podem ser assintomáticos; contudo, lesões mais extensas podem estar associadas à expansão clínica que, por sua vez, pode estar associada ou não com dor e, raramente, à parestesia (FAISAL *et al.*, 2015).

Essa lesão foi descrita pela primeira vez em 1987 por Padayachee e Van Wyk e, em 1988, foi caracterizada por Gardner como uma lesão com características histopatológicas variáveis e com comportamento clínico distinto dos demais cistos, sendo, então, denominada de COG (PADAYACHEE; VAN WYK, 1987; GARDNER *et al.*, 1988). É um cisto que, até o momento, não apresenta características patognomônicas, o que o faz ser, muitas vezes, confundido histopatologicamente com outras lesões císticas como cisto botrióide, cisto dentígero ou cisto radicular (KAPLAN *et al.*, 2008). Microscopicamente, a cavidade cística tem um revestimento epitelial de espessura variável, aspecto corrugado, exibindo células claras nas camadas basais e parabasais, que mimetiza glândulas salivares ou diferenciação glandular (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). Por isso, um diagnóstico diferencial para essa lesão é o CME intraósseo de baixo grau de malignidade (WALDRON; KOH, 1990; KAPLAN *et al.*, 2008; SHAH *et al.*, 2016). Em 1992, a OMS incluiu uma possível origem odontogênica ao COG, suportada por imunistoquímica, por meio da expressão de citoqueratinas (8, 10, 11, 18 e 19) e ausência de expressão para antígeno epitelial de membrana (do inglês *epithelial membrane antigen*, EMA), que caracterizaria a origem glandular da lesão. (SEMBA *et al.*, 1994). Radiograficamente, as imagens são heterogêneas, abrangendo lesões radiolúcidas uni ou multiloculares com bordas festonadas que podem atravessar a linha média, mimetizando

tumores odontogênicos benignos, como ameloblastoma e MO (SEMBA *et al.*, 1994; FAISAL *et al.*, 2015). Portanto, o diagnóstico é baseado fortemente na análise histopatológica, uma vez que os aspectos clínicos e radiográficos não são característicos da lesão (LUCZAK *et al.*, 2007; FIGUEIREDO *et al.*, 2016). O tratamento para o COG é variável, abrangendo desde técnicas cirúrgicas conservadoras, que incluem a curetagem ou a enucleação, associadas ou não a osteotomia periférica, até técnicas mais radicais como a ressecção cirúrgica (ECONOMOPOULOU; PATRIKIOU, 1995; GURLER *et al.*, 2017).

Em razão da dificuldade de definir o diagnóstico de COG frente a outras lesões odontogênicas e/ou CME intraósseo, Kaplan e colaboradores (2008) consideraram de extrema importância identificar características específicas dessa lesão que pudessem auxiliar no diagnóstico final e, assim, possibilitar um melhor prognóstico ao paciente (KAPLAN *et al.*, 2008; GURLER *et al.*, 2017). Nesse contexto, diferentes estudos foram realizados em busca de investigar a expressão de proteínas como bcl2, Ki-67, p53, PCNA (do inglês *proliferating cell nuclear antigen*), podoplanina, TGF-beta, WNT5a, ciclina D1, moléculas da via *sonic hedgehog*, metaloproteinases de matriz e algumas citoqueratinas, tanto no COG quanto nos possíveis diagnósticos diferenciais, como CME e, ainda, em outros cistos de origem odontogênica (TOSIOS *et al.*, 2000; PIRES *et al.*, 2004; KAPLAN *et al.*, 2005; ZHANG *et al.*, 2010; TAGHAVI *et al.*, 2013; BISHOP *et al.*, 2014; GUIMARÃES *et al.*, 2015; ALAEDDINI *et al.*, 2017). Embora esses estudos tenham caracterizado o perfil de expressão dos COG para algumas proteínas, ainda não foram suficientes para embasar adequadamente o diagnóstico da lesão.

A análise da literatura mostra que alterações moleculares no COG foram pouco estudadas. Até o presente momento, genes associados à tumorigênese como *PTCH1* e *MAML2* foram investigados em COG, porém não mostraram um perfil específico relacionado com a patogênese desse cisto (BARRETO *et al.*, 2001; BISHOP *et al.*, 2014). A ausência de rearranjos de *MAML2* em COG auxilia no diagnóstico diferencial com CME, uma vez que essa neoplasia maligna tem esse rearranjo genético muito bem descrito, e o COG não apresenta esse rearranjo (BISHOP *et al.*, 2014). Quanto à análise molecular de *MAML2*, embora auxilie no diagnóstico diferencial, cabe ressaltar o fato de que a ausência dessa alteração genética não exclui o diagnóstico de CME (GREER *et al.*, 2018). Estudos recentes demonstraram que, embora raro, quando recorrente e agressivo, o COG pode ser precursor de CME (GREER *et al.*, 2018). Em casos de recorrência, a mudança no perfil genético já foi descrita. A lesão primária (COG) não apresentava o rearranjo em *MAML2* enquanto a recorrente (CME) tinha essa alteração genética (NAGASAKI *et al.*, 2018).

## 2.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide

O COD é um carcinoma odontogênico que, histopatologicamente, é caracterizado por presença de cordões e/ou ninhos de células epiteliais que apresentam citoplasma eosinofílico claro. Essas células estão dispostas em um estroma de tecido conjuntivo frouxo associado à deposição de um material dentinoide (PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009). Foi recentemente sugerido como uma entidade distinta de todos os outros carcinomas odontogênicos já descritos na classificação da OMS (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014), embora essa entidade ainda não tenha sido incluída entre os carcinomas odontogênicos na classificação da OMS de 2017. Nesse carcinoma, não são observadas estruturas semelhantes aos órgãos do esmalte nem um ectomesênquima semelhante à papila dentária, sendo, então, caracterizada como uma lesão distinta das relatadas anteriormente, embora tenha uma íntima relação anatômica com o epitélio odontogênico (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Histopatologicamente, observa-se uma neoplasia epitelial maligna composta, predominantemente, por células claras e células basaloides, ocasionalmente, com pleomorfismo que induzem à produção de material dentinoide em um estroma de tecido conjuntivo maduro ou mixoide (PUNNYA *et al.*, 2004; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Clinicamente, o COD acomete mais comumente a mandíbula, em região posterior e apresenta uma baixa taxa de proliferação, porém é uma lesão localmente destrutiva, que pode ter associação com invasão perineural (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Em toda a literatura científica, apenas nove casos foram relatados até o momento e, na maioria deles, os pacientes tiveram como queixa principal um aumento de volume facial. Esses casos apresentaram infiltração tumoral aos tecidos adjacentes e de presença de depósitos de material dentinoide, caracterizando um tumor odontogênico (SAWYER *et al.*, 1986; MIYAUCHI *et al.*, 1998; KUMAMOTO *et al.*, 2000; ARIYOSHI *et al.*, 2002; PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Além do aumento de volume, podem estar associados outros sinais e sintomas como dor, desconforto e reabsorção de raízes dentais (SAWYER *et al.*, 1986; MIYAUCHI *et al.*, 1998; KUMAMOTO *et al.*, 2000; ARIYOSHI *et al.*, 2002; PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). A lesão inicial, radiograficamente, tende a ser radiolúcida bem definida, na maior parte das vezes unilocular, contendo quantidade variável de material calcificado, seja em pequenos focos radiopacos ou em focos maiores e bem definidos (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). O tratamento indicado é a excisão cirúrgica com margem de segurança, com o intuito de reduzir o risco de recorrência (MOSQUEDA-TAYLOR

*et al.*, 2014). O comprometimento linfonodal relacionado ao COD já foi reportado (IDE *et al.*, 2009). Em razão dos poucos relatos até o momento, a caracterização histopatológica dessa lesão e sua biologia precisam ser mais bem detalhadas.

### **2.3 Mixoma odontogênico**

O MO é um tumor odontogênico predominantemente central, com uma das mais altas prevalências entre todas as lesões tumorais odontogênicas, ficando atrás apenas dos odontomas e ameloblastomas (ODELL; ADEBIYI, 2017). A prevalência do MO varia entre 0,5% a 20% de todos os indivíduos adultos com tumores odontogênicos e de 8,5% a 11,6% dos tumores odontogênicos em crianças (SUBRAMANIAM *et al.*, 2016). Embora seja um tumor benigno e de crescimento lento, apresenta padrão de crescimento infiltrativo, não apresentando cápsula fibrosa, provocando a expansão das corticais ósseas e favorecendo as altas taxas de recidivas (SIMON *et al.*, 2004; MEHENDIRATTA *et al.*, 2012). O tratamento mais indicado, portanto, é a técnica cirúrgica baseada em ressecção em bloco. Em casos de menor tamanho, a curetagem pode ser indicada considerando a pouca infiltração marginal (ODELL; ADEBIYI, 2017).

O MO provavelmente deriva do tecido ectomesenquimal presente no desenvolvimento dentário (ODELL; ADEBIYI, 2017; CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019). Histopatologicamente, é caracterizado pela presença de células mesenquimais estreladas e fusiformes dispersas em uma matriz mixoide (ODELL; ADEBIYI, 2017). Na presença de matriz colágena abundante, histologicamente, pode-se usar o termo mixofibroma odontogênico (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). Estudos imunoistoquímicos demonstraram que este tumor pode apresentar diferenciação miofibroblástica, possibilitando um questionamento se o MO pode fazer parte do espectro das lesões miofibroblásticas, como miofibromas. (MOSHIRI *et al.*, 1992; MARTÍNEZ-MATA *et al.*, 2008; SIVAKUMAR *et al.*, 2008).

A patogênese molecular do MO ainda é incerta. Perdigão e colaboradores (2005) demonstraram que mutação ocasional em *PRKARIA* (do inglês *protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha*) contribuem para a patogênese desse tumor odontogênico (PERDIGÃO *et al.*, 2005). Um outro estudo revelou, em um caso de MO, uma microduplicação constitucional em 1q21, relacionado com a sinalização *PKA* (do inglês *cAMP-dependent protein kinase A*) (BEST-ROCHA *et al.*, 2016). Oncogenes e genes supressores de tumor comumente mutados em cânceres humanos foram estudados em casos de MO, via *NGS* (SANTOS *et al.*, 2017). Usando um painel que inclui mutações do tipo *hotspot*, nove amostras desse tumor odontogênico foram avaliadas, mas nenhuma mutação patogênica recorrente foi



identificada (SANTOS *et al.*, 2017). Além desses estudos, a epigenética também tem sido avaliada. A hipometilação dos genes *P27* (do inglês *cyclin-dependent kinase inhibitor 1B*), *P53* (do inglês *tumor protein p53*) e *RBI* (do inglês *RB transcriptional corepressor 1*) já foi reportada em casos de MO (MOREIRA *et al.*, 2011).

Miofibromas são tumores benignos compostos de células miofibroblásticas que podem se apresentar de maneira única ou múltipla (miofibromatose) (FOSS; ELLIS, 2000, ODELL; ADEBIYI, 2017). Pode afetar pacientes adultos ou infantis, mas, independentemente do perfil clínico do paciente, compartilham características histopatológicas semelhantes (OUDIJK *et al.*, 2012). Um terço dessas lesões ocorrem na região de cabeça e pescoço e, ocasionalmente, de maneira intraóssea nos ossos maxilares (SMITH *et al.*, 2017). O miofibroma solitário intraósseo usualmente afeta região posterior de mandíbula de crianças e adolescentes (ALLON *et al.*, 2007). Histopatologicamente, revela um padrão bifásico composto de células fusiformes a poligonais em um estroma fibromixóide interposto por fibras colágenas (FOSS; ELLIS, 2000, NASH *et al.*, 2010). Contudo, o padrão bifásico pode não ser tão evidente em alguns casos (ABRAMOWICZ *et al.*, 2011, ROKOS *et al.*, 2011).

Recentemente, mutações recorrentes nos éxons 12 e 14 no gene *PDGFR $\beta$*  foram reportadas em casos de miofibromas e de miofibromatoses (OUDIJK *et al.*, 2012, MARTIGNETTI *et al.*, 2013, AGAIMY *et al.*, 2017, ARTS *et al.*, 2017, FU *et al.*, 2018, POND *et al.*, 2018, DACHY *et al.*, 2019). *PDGFR $\beta$*  é um receptor que, quando acoplado pelo ligante, favorece a mitose em células de origem mesenquimal, incluindo células musculares lisas (MARTIGNETTI *et al.*, 2013).

Como já dito, estudos moleculares ainda não conseguiram encontrar mutações patogênicas recorrentes associadas ao MO (PERDIGÃO *et al.*, 2005, GOMES *et al.*, 2011, MOREIRA *et al.*, 2011, BEST-ROCHA *et al.*, 2016, SANTOS *et al.*, 2017). Considerando que esse tumor odontogênico apresenta diferenciação miofibroblástica e que áreas mixóides, podem ser eventualmente encontradas em miofibromas, levantamos a hipótese de o MO e os miofibromas poderem compartilhar um mesmo perfil molecular (HARRISON, 1973, MOSHIRI *et al.*, 1992, MARTÍNEZ-MATA *et al.*, 2008, MYNATT *et al.*, 2011, CASTRO *et al.*, 2016). Assim, o presente estudo propõe-se a avaliar, em MO, mutações no gene *PDGFR $\beta$* , previamente detectada em miofibromas.

## 3 OBJETIVOS

### 3.1 Objetivo geral

- Avaliar mutações genéticas em COG, COD e MO.

### 3.2 Objetivos específicos

- Investigar mutações *hotspot* em 50 genes supressores de tumor e oncogenes em COG.
- Investigar mutações *hotspot* em 50 genes supressores de tumor e oncogenes em COD.
- Validar as variantes detectadas no *NGS* por um método ortogonal (sequenciamento de Sanger).
- Avaliar a imunexpressão das proteínas associadas às vias de sinalização de genes com mutação patogênica.
- Caracterizar histopatologicamente as amostras de COD por estudo convencional em coloração em hematoxilina e eosina (H&E) e por estudo imunoistoquímico.
- Contribuir com critérios moleculares que refinarão o diagnóstico de COD.
- Investigar mutações no gene *PDGFR $\beta$*  em MO.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE-30405514.5.0000.5149).

### 4.2 Coleta das amostras, armazenamento e confirmação de diagnóstico

O estudo foi realizado com amostras de conveniência obtidas nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucomaxilo-facial da Faculdade de Odontologia da UFMG, do Departamento de Anatomia Patológica da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) e do Departamento de Patologia Oral da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).

Foram incluídas sete amostras de COG, duas de COD e 11 de MO fixadas em formol e incluídas em blocos de parafina, bem como quatro amostras de tecido fresco de MO. Todos os casos em estudo tiveram o diagnóstico histopatológico revisado por patologistas experientes.

### 4.3 Extração do *DNA* genômico

As amostras fixadas em formol e incluídas em parafina foram cortadas manualmente no micrótomo, e foram feitos 10 cortes de 10µm de espessura cada, que passaram pelo processo de desparafinização. Para amostras de tecido fresco, utilizou-se, aproximadamente, um volume de 10mm<sup>3</sup> de tecido, conforme orientado pelo fabricante. A extração do *DNA* genômico (do inglês *genomic DNA*, *gDNA*) de COG, COD e MO foi feita utilizando-se kit *QIamp DNA FFPE Tissue* (Qiagen Inc., Valencia, CA, EUA), levando-se em conta o fato de as amostras serem incluídas em parafina ou feita com o kit *DNeasy Blood & Tissue* (Qiagen Inc.) para as quatro amostras de tecido fresco de MO, seguindo o protocolo proposto pelo fabricante. Esse processo de extração consiste em uma digestão enzimática por meio do uso de proteinase K e do tampão de lise ATL, usado para purificação de ácido nucléicos.

A quantidade e a qualidade do *gDNA* extraídos foram avaliados conforme a técnica de biologia molecular que seria utilizada. Assim, para os sequenciamentos de Sanger, a quantificação e pureza do *gDNA* foram determinados pelo *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc., Wilmington, DE, EUA). Para a técnica de *NGS*, utilizou-se o *Qubit 3.0*

*Fluorometer* (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA) para avaliar a quantidade e a qualidade do *gDNA* extraído das amostras. Para um *gDNA* ser considerado em boas condições, ele deveria apresentar, na análise pelo *NanoDrop 2000* (Thermo Fisher Scientific Inc.), valores das razões 260/280, variando de 1,8 a 2,0 para proceder ao sequenciamento de Sanger. Quanto à análise realizada pelo *Qubit 3.0 Fluorometer* (Life Technologies), uma concentração  $>0,05\text{ng}/\mu\text{L}$  é considerada uma amostra com alto rendimento e com uma alta concentração de *gDNA*. Concentrações menores que  $0,05\text{ng}/\mu\text{L}$  requerem adaptações no protocolo de amplificação para que essa amostra possa ser incluída, depois, na corrida de sequenciamento, propriamente dita.

#### **4.4 Sequenciamento de nova geração**

O *NGS* compreende um grupo de tecnologias desenvolvidas para que os custos do sequenciamento de *gDNA* fossem drasticamente reduzidos. Desde o lançamento das primeiras inovações metodológicas, ainda no início dos anos 2000, que as tecnologias vêm sendo expressivamente aprimoradas, especialmente na última década. Atualmente, o custo por nucleotídeo sequenciado é o menor já alcançado, tornando o *NGS* acessível a diversos tipos de projetos.

O processo para que o *NGS* possa ser realizado compreende diversas fases, sendo de grande relevância os métodos empregados desde a extração do ácido nucléico até a sua manipulação para a preparação do material genético para o sequenciamento. A preparação do material genético é uma etapa que pode ser bastante variada, tendo em vista o propósito do sequenciamento. Na maioria dos propósitos científicos, busca-se o sequenciamento de um grupo pré-determinado de genes ou regiões do genoma. Nesse caso, o processo passa a ser determinado pelo sequenciamento direcionado (do inglês *target-sequencing*), o qual foi o método escolhido para o presente estudo.

Em resumo, as etapas que compõem o *NGS* da Plataforma de Sequenciamento Ion (Thermo Fisher Scientific Inc.) para o sequenciamento direcionado são as seguintes: construção da biblioteca (fragmentação do *gDNA*, no isolamento das regiões gênicas de interesse e na inserção de sequências de nucleotídeo conhecidas para a identificação de cada amostra separadamente), preparação do *template*, que possibilita criar um *pool* das bibliotecas e, por fim, o sequenciamento propriamente dito.

Essa etapa de preparo das bibliotecas e de sequenciamento baseada no *NGS* foi desenvolvida para todas as amostras de COG e COD. O processo foi realizado, utilizando-se um painel pré-definido *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2* (Cat. no. 4475346, Life

Technologies) que investiga 2.856 mutações identificadas pelo Catálogo de Mutações Somáticas no Câncer (do inglês *Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer, COSMIC*) em 50 genes supressores de tumor e oncogenes frequentemente mutados em câncer (TAB. 1).

**TABELA 1** - Genes supressores de tumores e oncogenes incluídos no *Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2*.

<i>ABL1</i>	<i>BRAF</i>	<i>EGFR</i>	<i>FGFR1</i>	<i>GNAS</i>	<i>IDH2</i>	<i>KRAS</i>	<i>NPM1</i>	<i>PTPN11</i>	<i>SMO</i>
<i>AKT1</i>	<i>CDH1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>FGFR2</i>	<i>GNAQ</i>	<i>JAK2</i>	<i>MET</i>	<i>NRAS</i>	<i>RBI</i>	<i>SRC</i>
<i>ALK</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>ERBB4</i>	<i>FGFR3</i>	<i>HNF1A</i>	<i>JAK3</i>	<i>MLH1</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>RET</i>	<i>STK11</i>
<i>APC</i>	<i>CSF1R</i>	<i>EZH2</i>	<i>FLT3</i>	<i>HRAS</i>	<i>KDR</i>	<i>MPL</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TP53</i>
<i>ATM</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>FBXW7</i>	<i>GNA11</i>	<i>IDH1</i>	<i>KIT</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PTEN</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>VHL</i>

Para o preparo das bibliotecas, foi realizada, inicialmente, uma reação em cadeia da polimerase (do inglês *polymerase chain reaction, PCR*) a fim de amplificar regiões de interesse do *gDNA*, utilizando-se 30ng *gDNA* e os reagentes *Ion AmpliSeq™ HiFi Mix*, *Ion AmpliSeq™ Primer Pool* (Life Technologies). O kit *Ion AmpliSeq™ Library 2.0* (Life Technologies) continha os reagentes utilizados na construção das bibliotecas, tais como a enzima DNA polimerase. Ainda dentro do processo de construção de bibliotecas, cada amostra foi marcada por um conjunto de sequências de bases dentro de adaptadores, que serviu como um código de identificação. Esse processo foi realizado com o uso do kit *IonXpress™ Barcode Adapters 1-16* (Life Technologies). Após a montagem da biblioteca, foi realizada uma digestão parcial das sequências dos *primers*, adicionando-se o reagente *FuPa* e submetendo a outro processo de termociclagem. A etapa seguinte consistiu na ligação dos adaptadores aos amplicons, que possibilitaram identificar cada amostra. Foram utilizados os reagentes *Switch Solution*, *barcode adapter mix* e *DNA Ligase* (Life Technologies), e, em seguida, uma nova termociclagem. Posteriormente, foi realizada a purificação das bibliotecas não amplificadas, utilizando-se o reagente *Agencourt® AMPure® XP* (Beckmancoulter, Beverly, MA, EUA), etanol 70% e uma raque magnética. As bibliotecas, nesse momento, foram quantificadas por *PCR* quantitativo em tempo real, com o *Ion Library TaqMan™ Quantitation Kit* (Life Technologies). Para assegurar a qualidade e o sucesso do experimento, a concentração final de cada biblioteca devia ser de, no mínimo, 100pM. Confirmada essa quantidade de *gDNA* nas bibliotecas, passou-se à preparação do *template*. Foram agrupados 5µL de cada biblioteca para a formação de um *pool*, o qual passou por uma etapa de amplificação clonal em um *PCR* em emulsão, no aparelho *Ion OneTouch 2* (Life Technologies) que compõe o sistema *Ion OneTouch™ 2* (Life Technologies). Em seguida, o enriquecimento do *pool* de amostras foi realizado no *OneTouch™ ES* (Life Technologies), que também compõe o sistema *Ion OneTouch™ 2* (Life Technologies), de

acordo com as instruções do fabricante. Após o preparo do equipamento *Ion Personal Genome Machine® Sequencer (Ion PGM™ System)* (Life Technologies), foi realizado o carregamento do chip *Ion 314™ Chip v2* e iniciado o sequenciamento.

#### **4.5 Análise *in silico* do sequenciamento de nova geração**

Finalizada a corrida de sequenciamento, os dados brutos obtidos pelo servidor *Torrent Suite Software* (Thermo Fisher Scientific Inc.) são processados e disponibilizados no *Ion Reporter Software* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Assim, em um primeiro momento, analisa-se se os dados da corrida apresentaram métricas satisfatórias. Os valores para os parâmetros de cada corrida podem ser extremamente variáveis, e o conjunto desses valores possibilita inferir a qualidade das sequências geradas, o que impactará diretamente na confiabilidade das chamadas de variantes. Individualmente, podemos considerar alguns parâmetros satisfatórios, como o carregamento do chip em 80%, as bases lidas durante o sequenciamento serem próximas da capacidade total do chip (no nosso caso, o chip *Ion 314™ Chip v2* tem uma capacidade entre 30-50Mb) e a policlonalidade ser menor do que 40%.

As leituras realizadas pelo sequenciamento foram alinhadas ao genoma humano de referência *Human Genome version 19 (Hg19)* por meio do *Ion Reporter Software 5.2* (Thermo Fisher Scientific Inc.). As variantes detectadas foram filtradas manualmente quanto ao tipo de variação, como variante de nucleotídeo único (do inglês *single nucleotide variant, SNV*), variante de múltiplos nucleotídeos (do inglês *multi-nucleotide variant, MNV*) e inserção/deleção de nucleotídeos (do inglês *insertion/deletion, INDEL*). Além disso, quanto ao efeito da variação, as variantes também foram filtradas como *nonframeshift, frameshift, missense, nonsense* e *stoploss*. Não filtramos as mutações silenciosas.

As variantes reportadas pelo *Ion Reporter Software 5.2* (Thermo Fisher Scientific Inc.), aplicando-se os filtros acima descritos que apresentaram profundidade maior que 100 vezes (*x100 reads*) e frequência maior que 5%, foram avaliadas com o uso de *Broad Institute's Integrated Genomics Viewer (IGV, versão 2.3)*. Esse programa possibilitou verificar a qualidade dos alinhamentos baseado na presença de regiões de homopolímero e de sequências desalinhadas, assim como na posição da variante em relação ao amplicon. Com base nessa análise, foram excluídas as falsas variantes.

Para avaliar o efeito funcional das variantes para as respectivas proteínas, utilizou-se a predição *in silico* baseada na Classificação Intolerante de Tolerante (do inglês *Sorting Intolerant From Tolerant - SIFT*; acessado pelo <http://sift.jcvi.org/>), que, dependendo do escore

obtido, variável de 0,0 a 1,0, predizem se uma substituição de aminoácido afeta a função da proteína, de maneira benigna (0,85 a 1,0), possivelmente deletéria (0,15 a 0,85) ou certamente deletéria (0,0 a 0,15). Outra predição *in silico* foi feita por meio de Fenotipagem do Polimorfismo versão 2 (do inglês *Polymorphism Phenotyping v2 - PolyPhen2*; acessado pelo <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). Essa ferramenta também prediz o efeito funcional de uma variante em uma proteína, variando de 0,0 a 1,0. Quanto mais próximo de 0,0, mais tolerável é o efeito; quanto mais próximo de 1,0, mais deletério é o efeito.

O *ClinVar* é uma base de dados de acesso livre que agrega informações sobre variações genéticas humanas relacionando-as com os possíveis fenótipos e evidências científicas para as variantes. Assim, ele foi acessado a fim de se obter o significado clínico da variação genômica, bem como identificar o impacto clínico da variante no humano (acessado pelo <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>), sendo, então, classificadas em mutações com repercussões benignas, variando até mutações patogênicas de efeito deletério.

#### **4.6 Sequenciamento de Sanger para validação dos resultados do sequenciamento de nova geração**

As variantes reportadas nas amostras de COD ou COG e preditas *in silico* como tendo efeitos possivelmente patogênica ou patogênica foram selecionadas para validação por sequenciamento de Sanger. Para isso, as variantes deveriam apresentar uma profundidade mínima de 100x e frequência superior a 20%.

Para a reação de *PCR*, foram sintetizados *primers* específicos para amplificar as regiões em que foram encontradas mutações durante o *NGS*, utilizando-se a plataforma *PrimerQuest Tool* (*Integrated DNA Technology, IDT, Skokie, IL, EUA*) (acessado pelo <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Para confirmação da amplificação, foi realizado eletroforese em gel de agarose 1,5% e corante fluorescente *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As reações foram visualizadas em luz ultravioleta. Após confirmação de que os produtos foram amplificados, procedeu-se à purificação dos amplicons com uso do kit *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.). Em seguida, os produtos foram sequenciados pelo método de Sanger, que é o padrão ouro para análise de fragmentos de *gDNA* para determinar a sequência de nucleotídeo. A leitura é baseada na incorporação de dideoxynucleotídeo que finaliza a adição de nucleotídeos pela polimerase e, assim, possibilita determinar a sequência do *gDNA* em

estudo. A corrida foi realizada pelo aparelho *ABI3730* (Applied Biosystems, Foster, CA, EUA), utilizando-se os polímeros *POP7* e *BigDye v3.1* (Thermo Fisher Scientific Inc.).

A sequência obtida no sequenciamento de Sanger foi comparada manualmente com a sequência de referência obtida na base de dados *Ensembl* (NM\_000038.5 *APC:c.2626C>T* (p.Arg876Ter) (acessado pelo <http://www.ensembl.org/>).

#### **4.7 Imunoistoquímica para Ki-67 e $\beta$ -catenina**

As amostras de COD foram submetidas a reações de imunoistoquímica para as proteínas Ki-67 e  $\beta$ -catenina. O anticorpo anti-Ki-67 foi usado com a finalidade de estimar as taxas de proliferação celular tumoral, enquanto a  $\beta$ -catenina foi usada pelo fato de ambos os casos de COD revelarem mutações na via de sinalização WNT, especificamente, associadas com o possível acúmulo dessa proteína.

As amostras foram seccionadas em micrótomo em espessuras de 4 $\mu$ m e foram desparafinadas em xilol e hidratadas com alcoóis de diferente pureza. A recuperação antigênica foi realizada com ácido cítrico (pH=6,0) a 98°C. Para a imunolocalização de Ki-67, utilizou-se o clone MIB-1 (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA), em uma diluição 1:50. As ligações puderam ser visualizadas por meio do sistema à base de polímeros *EnVision EnV+/HRP* (Dako Corporation) com diaminobenzidina (DAB) (Dako Corporation), como cromógeno. Amostras sabidamente positivas (carcinoma de células escamosas orais) e sabidamente negativas (amostras com omissão de anticorpos primários) para Ki-67 foram utilizadas como controle positivo e negativo das reações. Os resultados de imunoexpressão foram avaliados por dois observadores experientes por meio da contagem da positividade da coloração nuclear em células tumorais em oito campos (aumento de 400x). Foi obtido, então, o percentual médio de marcação nos oito campos de maior imunopositividade, por amostra e por examinador, e, posteriormente, a média de positividade entre as contagens dos dois examinadores por amostra e por anticorpo.

Para as reações de imunoistoquímica de  $\beta$ -catenina, a recuperação antigênica foi a base de tampão Tris/EDTA (pH=9,0) em microondas. O anticorpo primário utilizado para a imunolocalização de  $\beta$ -catenina foi o clone 17C2 (Novocastra, Buffalo Grove, IL, EUA) em uma diluição de 1:200. O anticorpo secundário utilizado é marcado com o complexo estreptavidina-biotina conjugado com peroxidase, e, para a visualização, utilizou-se DAB (Dako Corporation) como cromógeno. Os resultados de imunoexpressão foram avaliados de forma qualitativa por dois observadores experientes e classificadas em positiva ou negativa.



Para os casos de positividade, observou-se o perfil de marcação seja ele nuclear ou citoplasmático.

#### 4.8 Análise em *PCR* do gene *PDGFR $\beta$*

A análise da amplificação em *PCR* convencional para o gene *PDGFR $\beta$*  foi realizada nas amostras de MO. Foram incluídos controles positivos (mucosa normal) e negativos (reagentes da reação sem *gDNA*) em todas as reações. Foram sintetizados *primers* específicos para amplificar as regiões de interesse no gene *PDGFR $\beta$*  (éxon 12 e éxon 14), utilizando a plataforma *PrimerQuest Tool* (*IDT*; acessado pelo <https://www.idtdna.com/Primerquest/Home/Index>). Foram utilizados pares de *primers* com cauda M13 para avaliar os éxons 12 e o 14 do gene *PDGFR $\beta$*  (TAB. 2).

**TABELA 2** - Primers utilizados para as reações em cadeia da polimerase para o gene *PDGFR $\beta$* .

Éxon do gene <i>PDGFR<math>\beta</math></i>	Sequência <i>forward</i> (5'→3')	Sequência <i>reverse</i> (5'→3')
Éxon 12	<b>GTAAAACGACGGCCAGTATGTG</b> TCCTAGACGGACGA	<b>CAGGAAACAGCTATGACATAGGG</b> CAGCTGCATGG
Éxon 14	<b>GTAAAACGACGGCCAGTGCCCG</b> CAGCAGTGAGAA	<b>CAGGAAACAGCTATGACGGTGGG</b> CACTTTCCTGAG

Sequência em negrito=sequência M13

Em ambas as reações, a mistura final de reagentes contemplou um volume de 25 $\mu$ L que incluiu 12,5 $\mu$ L do reagente *MyTaq HS Red Mix* (Bioline, Londres, GBR), 10 $\mu$ M de cada par de *primer* em estudo e 200ng do *gDNA*. As condições de termociclagem para as amostras fixadas em formol e incluídas em parafina foi de desnaturação inicial a 95 $^{\circ}$ C por 3min, 45 ciclos de incubação sequencial a 95 $^{\circ}$ C por 15s, 60 $^{\circ}$ C (para éxon 12) ou 62 $^{\circ}$ C (para éxon 14) por 15s e 72 $^{\circ}$ C por 30s, e um período de extensão final a 72 $^{\circ}$ C por 10min. Em casos de amostras frescas, o número de ciclos foram reduzidos para 35. As reações foram realizadas no termociclador *Eppendorf-Master Cycler* (Eppendorf, Hamburgo, GER). Os produtos finais da *PCR* foram analisados em eletroforese com gel de agarose 1,5% e corante fluorescente *SYBR Safe DNA gel stain* (Invitrogen, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). As reações foram visualizadas em luz ultravioleta. Após confirmação de que os produtos foram amplificados, procedeu-se a purificação dos amplicons usando-se o kit *ExoSAP-IT PCR Product Cleanup Reagent* (Thermo Fisher Scientific Inc.).

#### **4.9 Sequenciamento de Sanger para análise do gene *PDGFRβ***

Em seguida, foram sequenciados pelo método de Sanger com uso do polímero *BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* (Applied Biosystems) com 10pmol de *primer* para o gene *PDGFRβ* e 20ng de *gDNA* purificado. O sequenciamento dos nucleotídeos foi realizado no aparelho *ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Os eletroferogramas foram analisados pelo programa *SnapGene Viewer* (GSL Biotech, Chicago, IL, USA), e a sequência do gene humano *PDGFRβ* utilizada para referência foi obtida do *Emsembl* (ENSG00000113721, acessado pelo <http://www.ensembl.org/>). Para análise das amostras sequenciadas, avaliou-se a região das mutações já relatadas em miofibromas, em trabalhos previamente publicados, que descrevem mutações nesse gene, tanto no éxon 12 como no 14, conforme Tabela 3.

#### **4.10 Análise dos dados**

Para cada ensaio realizado, foi aplicada a análise de dados específica, que foi descrita anteriormente, juntamente com os materiais e métodos de cada reação em si. Os dados clínicos e radiográficos coletados, bem como os dados moleculares obtidos, foram armazenados em um banco de dados eletrônico. Métodos de análise descritiva dos dados armazenados foram utilizados para organizar, resumir e descrever os aspectos importantes das características observadas de forma individual e agrupada. Além disso, esses dados foram devidamente utilizados para a avaliação qualitativa e quantitativa, por meio de ferramentas descritivas.

**TABELA 3** - Estudos que reportaram mutações no éxon 12 e no éxon 14 do gene *PDGFRβ* em miofibromas, na língua inglesa.

<b>Lesão estudada</b>	<b>Mutação no gene <i>PDGFRβ</i></b>	<b>Referência</b>
Miofibroma infantil (lesão solitária)	Exon 12 - p.R561C (c.1681C>T) Exon 12 - p.Y562C (c.1685A>G) Exon 12 - p.Y562_V572dup (c.1716_1717insGAGCTGATCCGATGGAAGGTGATTGAGTCTGTG) Exon 12 - p.W566R (c.1696T>G) Exon 12 - p.W566R (c.1696T>A) Exon 12 - p.W566S (c.1697G>C) Exon 12 - p.I569N (c.1706T>A) Exon 12 - p.Y589D (C.1765T>G) Exon 14 - p.N666K (c.1998C>A) Exon 14 - p.N666K (c.1998C>G)	Agaimy <i>et al.</i> (2017), Al Qawahmed <i>et al.</i> (2019), Dachy <i>et al.</i> (2019)* Agaimy <i>et al.</i> (2017) Dachy <i>et al.</i> (2019)* Dachy <i>et al.</i> (2019)* Dachy <i>et al.</i> (2019)* Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017) Dachy <i>et al.</i> (2019)* Agaimy <i>et al.</i> (2017), Zhong <i>et al.</i> (2018), Dachy <i>et al.</i> (2019)* Agaimy <i>et al.</i> (2017)
Miofibromatose infantil (lesões múltiplas)	Exon 12 - p.K559_Y562delinsN (c.1677_1685delGCCACGTTA) Exon 12 - p.P560L (c.1679C>T) Exon 12 - p.R561C (c.1681C>A) Exon 12 - p.R561C (c.1681C>T)  Exon 12 - p.R561_Y562delinsH (c.1682_1684delGTT) Exon 12 - p.Y562_R565del (c.1683_1694delTTACGAGATCCG) Exon 12 - p.Y562D (c.1684T>G) Exon 12 - p.W566R (c.1696T>C) Exon 12 - p.W566_V568delinsL (c.1697_1702delGGAAGG) Exon 12 - p.Lys567Glu (c.1699A>G) Exon 14 - p.P660T (c.1978C>A) Exon 14 - p.N666H (c.1996A>C) Exon 14 - p.N666S (c.1997A>G) Exon 14 - p.N666K (c.1998C>A) Exon 14 - p.N666K (c.1998C>G)	Dachy <i>et al.</i> (2019)* Lepelletier <i>et al.</i> (2017) Mudry <i>et al.</i> (2017)* Cheung <i>et al.</i> (2013), Martignetti <i>et al.</i> (2013), Linhares <i>et al.</i> (2014), Arts <i>et al.</i> (2017)*, Murray <i>et al.</i> (2017)*, Dachy <i>et al.</i> (2019)* Dachy <i>et al.</i> (2019)* Dachy <i>et al.</i> (2019)* Arts <i>et al.</i> (2017)*, Dachy <i>et al.</i> (2019)* Arts <i>et al.</i> (2017)*, Dachy <i>et al.</i> (2019)* Murray <i>et al.</i> (2017)* Martignetti <i>et al.</i> (2013) Pond <i>et al.</i> (2018) Dachy <i>et al.</i> (2019)* Arts <i>et al.</i> (2017)*, Dachy <i>et al.</i> (2019)* Arts <i>et al.</i> (2017)*, Dachy <i>et al.</i> (2019)*
Miofibroma adulto (lesão solitária)	Exon 12 - p.Y562C (c.1685A>G) Exon 12 - p.I564_W566delinsR (c.1691_1696del6) Exon 12 - p.W566_I569delinsC (c.1698_1706del9) Exon 12 - p.I569V (c.1705A>G) Exon 12 - p.Y562D (c.1684T>G) Exon 14 - p.N666K (c.1998C>A) Exon 14 - p.N666K (c.1998C>G)	Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017) Agaimy <i>et al.</i> (2017)
Miofibromatose adulto (lesões múltiplas)	Exon 12 - p.R561C (c.1681C>T)	Weller <i>et al.</i> (2019)*

\*=Estudos que relataram lesões intraósseas

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização das amostras

Os dados clínicos e imaginológicos dos casos de COG, COD e MO encontram-se na Tabela 4.

### 5.2 Cisto odontogênico glandular

Os resultados obtidos no estudo para as amostras de COG já foram redigidos e publicados em um artigo científico no periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*: **Elisa Carvalho de Siqueira**, Silvia Ferreira de Sousa, Josiane Alves França, Marina Gonçalves Diniz, Thaís dos Santos Fontes Pereira, Rennan Garcias Moreira, Pablo Agustin Vargas, Ricardo Santiago Gomez, **Carolina Cavalieri Gomes**. *Targeted next-generation sequencing of glandular odontogenic cyst: a preliminary study*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 2017;124(5):490-494. (SIQUEIRA *et al.*, 2017) (APÊNDICE A).

#### 5.2.1 Amostra

Nosso estudo iniciou-se com sete amostras de COG, mas apenas quatro foram incluídas na análise final, uma vez que três não atenderam aos níveis de controle de qualidade da biblioteca (a concentração final de *gDNA* de cada biblioteca deveria ser de, no mínimo, 100pM). Das quatro amostras incluídas, três delas foram de indivíduos do sexo masculino. A média de idade entre os indivíduos foi de  $54,25 \pm 9,54$  anos, variando de 42 a 65 anos de idade. Para que essas amostras fossem incluídas, o diagnóstico foi confirmado por análise microscópica. Uma fotomicrografia representativa de um dos casos de COG pode ser observada na Figura 1.

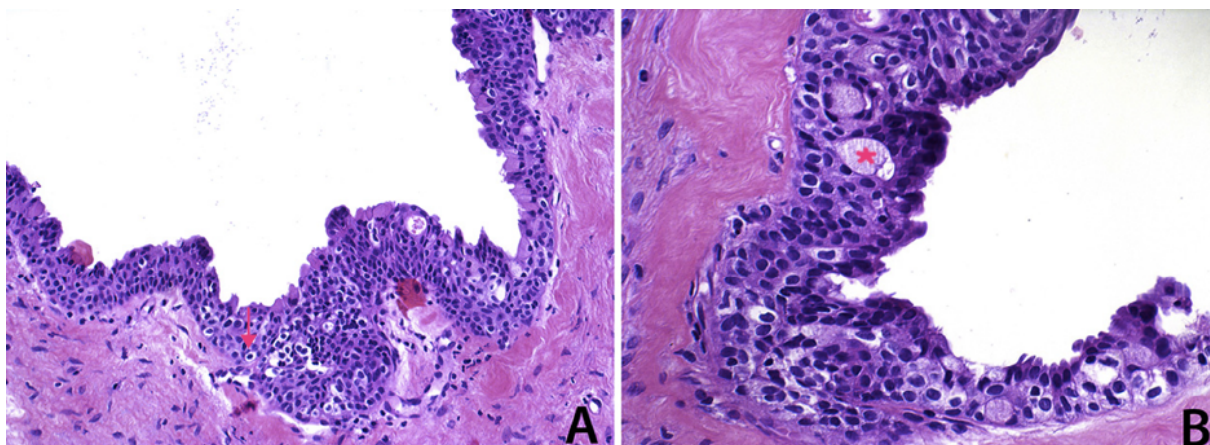
**TABELA 4** - Dados clínicos e imagiológicos dos casos de cisto odontogênico glandular, carcionoma odontogênico com dentinoide e mixoma odontogênico, incluídos no estudo.

Identificação	Sexo	Idade (anos)	Localização	Tempo de evolução (meses)	Apresentação clínica	Tamanho (mm)	Imagem Radiográfica da lesão
<b>Cisto Odontogênico Glandular (COG)</b>							
Caso #1	Feminino	42	Maxila	35	Massa arroxeada	20	Radiolúcida multilocular
Caso #2	Masculino	55	Mandíbula	60	Não disponível	Não disponível	Radiolúcida, única, bordas nítidas, centro radiolúcido, deslocando os dentes adjacentes
Caso #3	Masculino	51	Mandíbula	25	Não disponível	Não disponível	Radiolúcida, única, bordas nítidas, centro radiolúcido, não causando alterações dentárias
Caso #4	Masculino	65	Não disponível	Indeterminado	Massa eritematosa	8	Não disponível
<b>Carcinoma Odontogênico com dentinoide (COD)</b>							
Caso #1	Masculino	41	Maxila	Indeterminado	Aumento de volume associado à sintomatologia dolorosa	Não disponível	Radiolúcida
Caso #2	Feminino	74	Maxila	5	Aumento de volume	Não disponível	Radiopaco associado a canino não erupcionado
<b>Mixoma Odontogênico (MO)</b>							
Caso #1	Masculino	22	Mandíbula	Indeterminado	Aumento de volume associado à sintomatologia dolorosa	Não disponível	Radiolúcida, multilocular com aspecto bolhas de sabão
Caso #2	Feminino	29	Maxila	8	Aumento de volume associado à sintomatologia dolorosa	Não disponível	Mista, bem delimitada com rechaçamento do soalho orbital
Caso #3	Masculino	22	Mandíbula	60	Aumento de volume	150	Multilocular
Caso #4	Feminino	21	Mandíbula	Indeterminado	Aumento de volume	15	Não disponível
Caso #5	Feminino	43	Mandíbula	6	Aumento de volume associado à sintomatologia dolorosa	50	Radiolúcida, unilocular, com borda radiopaca
Caso #6	Masculino	28	Mandíbula	12	Aumento de volume	Não disponível	Radiolúcida com áreas radiopacas
Caso #7	Feminino	23	Maxila	Não disponível	Não disponível	Não disponível	Não disponível
Caso #8	Feminino	32	Mandíbula	Não disponível	Aumento de volume	Não disponível	Radiolúcida, multilocular com aspecto de favo de mel, mal delimitado. Reabsorção radicular do 34, aumento do

Caso #9	Feminino	52	Mandíbula	2	Aumento de volume	Não disponível	ligamento periodontal do 33 e 34, perfuração da cortical lingual e ausência do 35 e 37
Caso #10	Feminino	34	Maxila	Indeterminado	Não disponível	Não disponível	Não disponível
Caso #11	Feminino	30	Mandíbula	Não disponível	Aumento de volume associado à sintomatologia dolorosa	Não disponível	Radiolúcida, multilocular, bem delimitada
Caso #12	Feminino	55	Mandíbula	Não disponível	Aumento de volume	Não disponível	Radiolúcida, unilocular com expansão das corticais vestibular e lingual
Caso #13	Feminino	81	Maxila	8	Aumento de volume	Não disponível	Não disponível
Caso #14	Feminino	21	Maxila	Indeterminado	Não disponível	Não disponível	Radiolúcida, multilocular, bem delimitada, causando deslocamento da raiz do dente 15 e expansão de cortical
Caso #15	Feminino	33	Mandíbula	Não disponível	Não disponível	Não disponível	Não disponível

COG=cisto odontogênico glandular; COD=carcinoma odontogênico com dentinoide; MO=mixoma odontogênico; mm=milímetros

**Figura 1** - Características microscópicas do cisto odontogênico glandular



(A) Histologicamente, o cisto é caracterizado por um revestimento epitelial de espessura variável, com células superficiais cuboidais ou colunares e células claras (seta) localizadas nas camadas basais ou parabasais. Aumento 200X. (B) O epitélio revelou células eosinofílicas na superfície exibindo desembocadura glandular, formações microcísticas intraepitelial e células mucosas (asterisco). Aumento 400X. Coloração em H&E.

Fonte: VARGAS, 2017

### 5.2.2 Sequenciamento de nova geração

O sequenciamento das amostras de COG baseado em *NGS* possibilitou um alto número de bases sequenciadas, variando de 28.700.000 a 70.850.000 com a maioria das bases com *Phred quality score* (*Q score*) em Q20. *Q score* é uma medida de qualidade usada para se ter acesso à acurácia do experimento realizado. Q20 é um parâmetro de qualidade que tem uma acurácia de 99%, ou seja, a cada leitura de sequenciamento das chamadas de variantes de 100 pares de base, uma poderá conter erro. As amostras apresentaram uma alta performance durante o sequenciamento, uma vez que o número de leituras (*reads*) por amostras variaram de 265.000 a 650.000 leituras por amostra.

Os resultados brutos foram criteriosamente analisados conforme descrito anteriormente e, então, foram identificadas seis variantes *missense* do tipo *SNV* com uma leitura acima de x100. Essas variantes estão listadas na Tabela 5. Três dessas variantes (*PIK3CA* p.Glu689Lys, *PIK3CA* p.Ala708Thr e *TP53* p.Leu289Phe) apresentaram uma frequência menor que 5%, inferior ao limite de sensibilidade do aparelho, o que as sugerem como falso-positivas. Nenhuma das variantes filtradas (>x100 e >5% de frequência) foram preditas como patogênica ou possivelmente deletéria, de acordo com *SIFT* e *PolyPhen-2*. Considerando que todas apresentaram *MAF* (do inglês *Minor Allele Frequency*) >0,01, de acordo com o banco de dados *1000 Genomes*, possivelmente representam polimorfismo comum de um único nucleotídeo (do inglês *common single nucleotide polymorphisms*, *SNP*).

**TABELA 5** - Caracterização das variantes *missense* de um único nucleotídeo detectadas nas amostras de cisto odontogênico glandular

Amostra Locus	Genes	Transcrito	Codificação	Mudança de aminoácido	SIFT	PolyPhen-2	dbSNP	MAF	UCSC Common SNPs	ClinVar	Profundidade	Frequência (%)
<b>COG1</b>												
chr17:7579472	<i>TP53</i>	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	tolerável	benigna	rs1042522	0.4571	SIM	benigna significado incerto	639	54,15
<b>COG2</b>												
chr4:55972974	<i>KDR</i>	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	tolerável	benigna	rs1870377	0.2119	SIM	NF	1506	53,25
chr17:7579472	<i>TP53</i>	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	tolerável	benigna	rs1042522	0.4571	SIM	benigna significado incerto	1193	100,00
<b>COG3</b>												
chr3:178938823	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2	c.2065G>A	p.Glu689Lys	deletéria	danosa	ND	ND	NÃO	NF	302	3,31**
chr3:178938880	<i>PIK3CA</i>	NM_006218.2	c.2122G>A	p.Ala708Thr	tolerável	possivelmente danosa	ND	ND	NÃO	NF	105	4,76**
chr17:7579472	<i>TP53</i>	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	tolerável	benigna	rs1042522	0.4571	SIM	benigna significado incerto	1992	54,57
<b>COG4</b>												
chr4:55593464	<i>KIT</i>	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	tolerável	benigna	rs3822214	0.0645	SIM	benigna possivelmente benigna	1817	53,83
chr4:55972974	<i>KDR</i>	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	tolerável	benigna	rs1870377	0.2119	SIM	NF	622	47,91
chr17:7577073	<i>TP53</i>	NM_000546.5	c.865C>T	p.Leu289Phe	tolerável	benigna	ND	ND	NÃO	NF	482	2,28**

*SIFT* (do inglês *Sorting Intolerant From Tolerant*), classificação de tolerado a intolerado, prediz se a substituição do aminoácido afeta a função da proteína. Disponível em: <http://sift.jcvi.org/>. *PolyPhen-2* (do inglês *Polymorphism Phenotyping v2*), fenotipagem do polimorfismo, prediz o efeito funcional da proteína em uma variante, disponível em: <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>. *dbSNP* (do inglês *Single Nucleotide Polymorphism Database of genomic variants*), base de dados de variações genéticas de polimorfismo de um único nucleotídeo, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>. *MAF* (do inglês *Minor Allele Frequency*), frequência com que o segundo alelo mais comum ocorre em uma dada população, de acordo com os dados do *1000 genomes* ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp\\_ref.cgi?rs](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/snp_ref.cgi?rs)). *ClinVar*, avaliação do impacto clínico da variante, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>. ND, não disponível. NF, não fornecido (casos em que os dados não estão disponíveis ou são desconhecidos).

\*\*Frequência da variante menor que 5%.



### 5.3 Carcinoma odontogênico com dentinoide

Os resultados obtidos no estudo para as amostras de COD já foram redigidos e publicados em um artigo científico no periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*: Rogério de Oliveira Gondak, Fernanda Viviane Mariano, Silvia Ferreira de Sousa, **Elisa Carvalho de Siqueira**, Katya Pulido Díaz, Leandro Aurélio Liporoni Martins, Albina Altemani, Adalberto Mosqueda-Taylor, Ricardo Santiago Gomez, **Carolina Cavaliéri Gomes**. *CTNNB1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid*. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*, 2019 (*in press*). (GONDAK *et al.*, 2019) (APÊNDICE B).

#### 5.3.1 Amostra

Foram incluídas no estudo duas amostras de COD: uma obtida de paciente do sexo masculino e uma do sexo feminino (TAB. 4). As amostras foram previamente diagnosticadas considerando o estudo histopatológico em H&E e as características clínicas e radiográficas, que, em seguida, foram reavaliadas e confirmadas por patologistas experientes. As amostras que participaram do estudo molecular foram obtidas das biópsias excisionais. Posteriormente, foram recuperadas as lâminas histológicas dos casos.

#### 5.3.2 Relatos dos casos de carcinoma odontogênico com dentinoide

##### 5.3.2.1 Carcinoma odontogênico com dentinoide – caso #1

O caso #1 de COD ocorreu em um homem de 43 anos de idade que apresentou uma lesão medindo 5x4cm, assintomática, caracterizada por um crescimento lento na região anterior de maxila. O paciente relatou uma história de enucleação tumoral na mesma área dois anos antes. Ao exame imagiológico, observou-se na tomografia computadorizada uma massa tumoral invadindo a cavidade nasal e seio maxilar (FIG. 2A), sem área de deposição de material mineralizado e com limite bem definido. De acordo com o laudo histopatológico da primeira lesão enucleada, o diagnóstico estabelecido pelo serviço que avaliou a biópsia foi de adenoma pleomórfico.

**Figura 2** - Exame imaginológico dos casos de carcinoma odontogênico com dentinoide



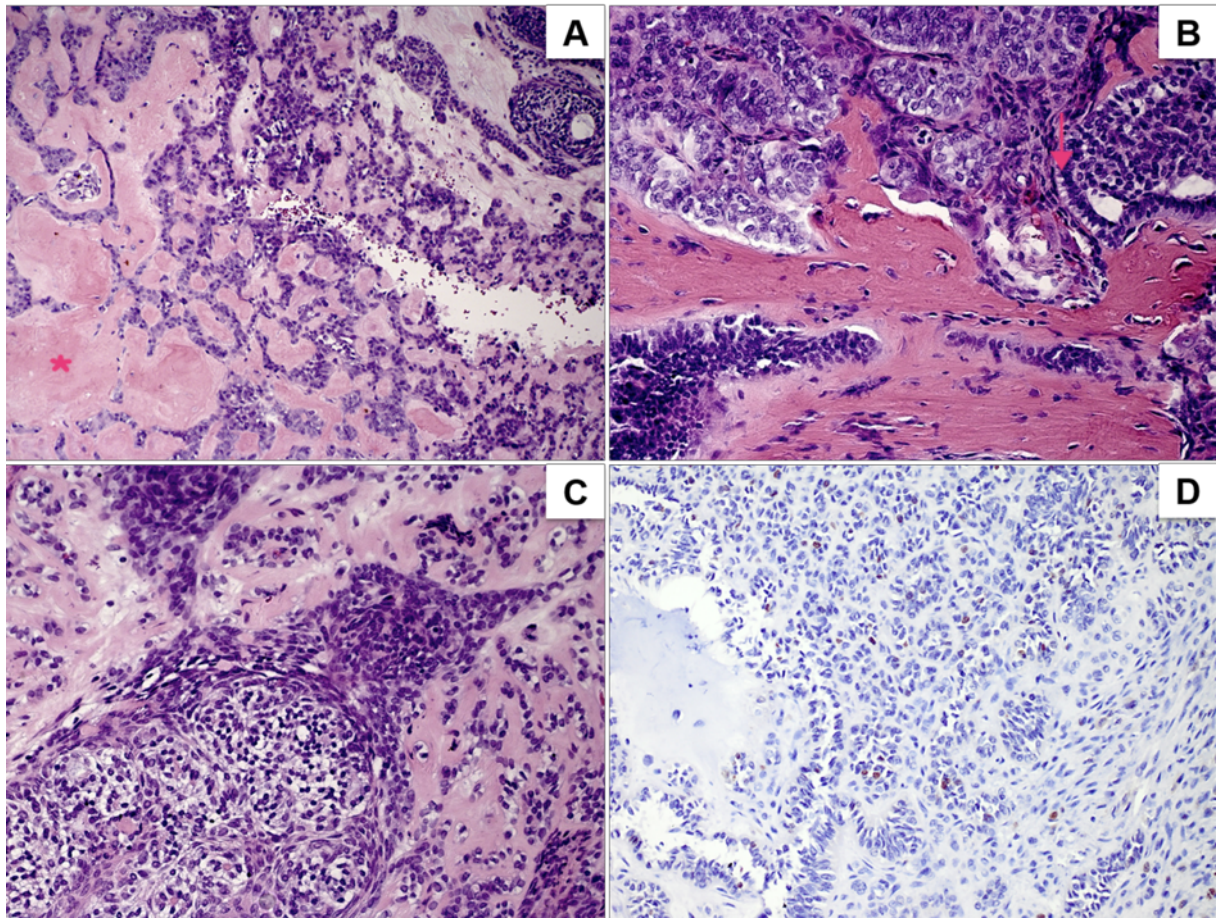
(A) Tomografia computadorizada em corte coronal do caso #1 exibindo o envolvimento da cavidade nasal e seio maxilar pelo tumor recorrente. (B) Radiografia inicial panorâmica do caso #2 exibindo lesão mista e expansiva envolvendo o canino superior incluído e estendendo para região posterior de maxila.

Fonte: GONDAK; MARIANO, 2019

Com o diagnóstico clínico de recorrência de um tumor odontogênico benigno, o paciente foi submetido a uma maxilectomia esquerda. Após a análise microscópica da peça cirúrgica, o diagnóstico histopatológico de tumor odontogênico maligno foi concluído, e o paciente foi referenciado ao serviço oncológico, onde iniciou o tratamento quimioterápico e radioterápico. O paciente foi acompanhado por 24 meses e, até o momento, não apresenta sinais de recorrência.

Após o diagnóstico de tumor odontogênico maligno, o caso foi enviado aos autores deste trabalho para consultoria. A análise microscópica do tumor revelou uma proliferação sólida de células poliédricas, basaloides e claras, formando ninhos e cordões associados a uma abundante matriz dentinoide (FIG. 3A). Algumas células tumorais dispunham-se em paliçada na periferia e ilhas e cordões de células claras foram observadas (FIG. 3B). Observou-se, ainda, células claras em arranjo de roseta ou sólido como ilhotas (FIG. 3C). A lesão revelou leve pleomorfismo celular, com ocasionais figuras de mitose e um índice de proliferação de Ki-67 de 10% (FIG. 3D). Infiltração marginal ao osso adjacente foi observada.

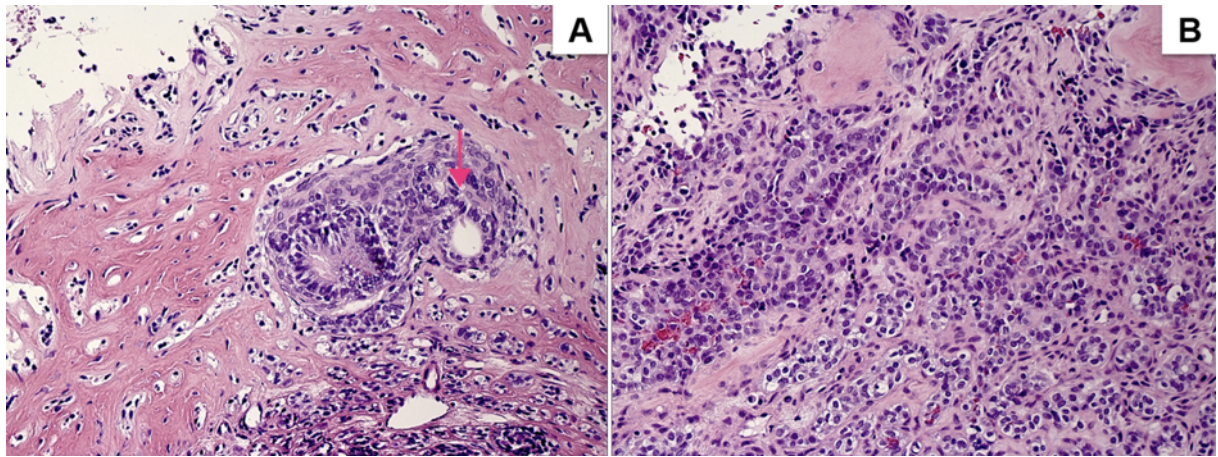
**Figura 3** - Aspectos microscópicos do caso #1 de carcinoma odontogênico com dentinoide, após recorrência



(A) Exame microscópico revelou cordões e ilhas de células basaloides e claras dispersas em um abundante material eosinofílico de matriz dentinoide (asterisco) (H&E, aumento de 100x). (B) Ilhas de células basaloides e claras, dispostas em paliçadas na periferia dispostas e exibindo polaridade reversa (seta) (H&E, aumento de 400x). (C) Ilhas e cordões de células basaloides e claras em uma matriz amorfa (H&E, aumento de 400x). (D) Reação de imunohistoquímica para Ki-67 revelando 10% de índice de proliferação celular (aumento de 200x).  
Fonte: GONDAK; MARIANO, 2019

Em virtude de haver um diagnóstico prévio da primeira cirurgia de adenoma pleomórfico, foi solicitada a revisão das lâminas histopatológicas do tumor primário, após enucleação. As características histopatológicas do tumor primário foram similares ao tumor recorrente com formações de cordões de células poliédricas com citoplasma claro ou eosinofílico, associado com deposição de material dentinoide (FIG. 4A e 4B). Assim, o diagnóstico do COD recorrente foi estabelecido. Durante a revisão da versão final deste trabalho, os autores correspondentes receberam a informação de que esse paciente teve uma recorrência, cujas informações estão disponíveis em um artigo aceito para publicação (MARIANO *et al.*, 2019).

**Figura 4** - Características microscópicas do caso #1 de carcinoma odontogênico com dentinoide (tumor primário), após enucleação



(A e B) Exame microscópico revela cordões e lençóis de células basaloides e claras, estrutura semelhante a ductos (seta) e deposição de uma matriz dentinoide (H&E, aumento de 300x e de 400x).

Fonte: GONDAK; MARIANO, 2019

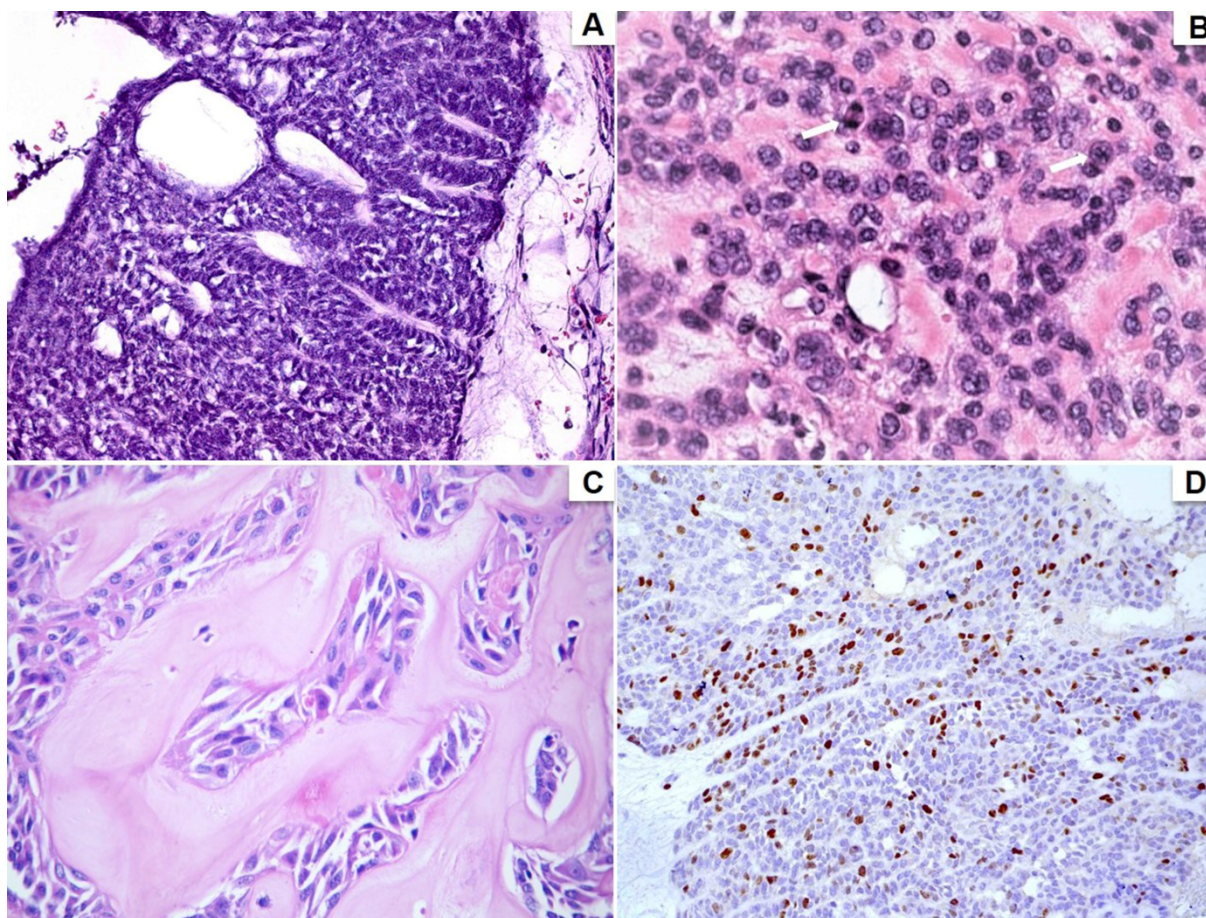
#### 5.3.2.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide – caso #2

O caso #2 de COD ocorreu em uma mulher de 74 anos de idade, que apresentou um aumento de volume assintomático na maxila direita com um tempo de evolução de cinco meses. Radiograficamente, observou-se uma lesão multilocular, radiolúcida com focos radiopacos, conforme demonstrado na Figura 2B. O tumor apresentava limites bem definidos, medindo 4x3cm, com envolvimento com canino superior não erupcionado, estendendo-se para a região posterior direita da maxila.

Com base nas características clínicas, o clínico suspeitou de se tratar de tumor odontogênico, incluindo como diagnóstico diferencial: mixoma, ameloblastoma e tumor odontogênico epitelial calcificante. O exame microscópico da biópsia incisional dessa lesão possibilitou o diagnóstico de tumor odontogênico adenomatoide (TOA). A paciente foi submetida a um tratamento cirúrgico baseado na enucleação da lesão, e o diagnóstico histopatológico de TOA foi confirmado. Dois anos após a enucleação do tumor primário, a paciente apresentou recorrência da lesão com extensa destruição na região da maxila direita. Não foi possível o acesso ao exame de imagem. Foi realizada a ressecção tumoral, e as lâminas histopatológicas foram enviadas a estes autores para consultoria. O exame microscópico revelou tumor odontogênico epitelial maligno com uma grande quantidade de material dentinoide. O tumor era formado por cordões e ninhos de células basaloides e poliédricas com citoplasma eosinofílico ou claro, formando estruturas semelhantes a ductos e uma abundante deposição de matriz dentinoide (FIG. 5A-C). Foram identificados pleomorfismo celular

evidente e algumas figuras de mitose. Entretanto, necrose, invasão perineural e invasão marginal não foram observadas. A reação de imunohistoquímica para Ki-67 revelou um índice de proliferação celular de 17% (FIG. 5D). O diagnóstico de COD foi confirmado, uma ressecção foi realizada e, durante três anos de acompanhamento, a paciente não apresentou recidiva.

**Figura 5** - Aspectos microscópicos do caso #2 de carcinoma odontogênico com dentinoide, após recorrência

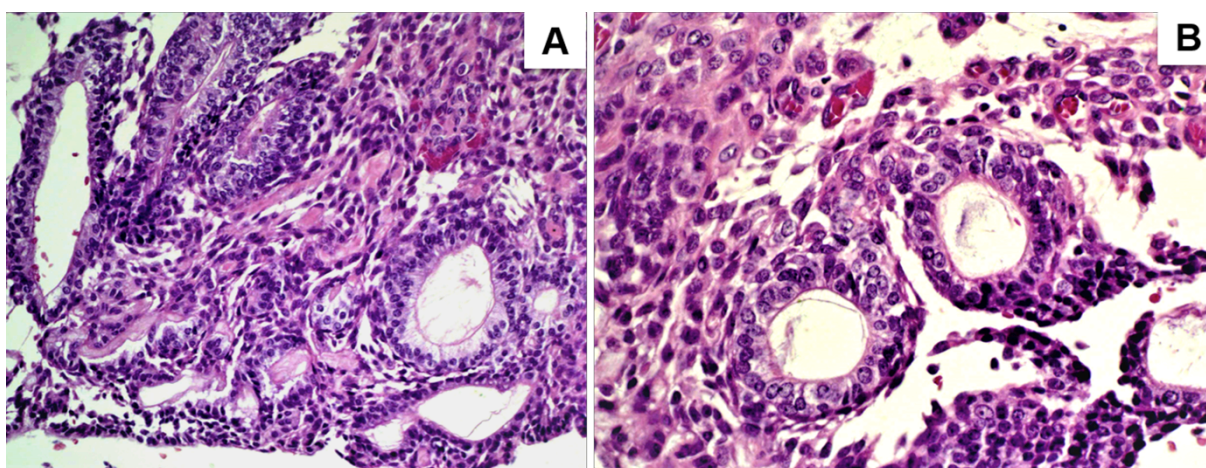


(A) Microscopia revela tumor odontogênico maligno exibindo lençóis e cordões de células basaloides e claras (H&E, aumento de 200x). (B e C) Células tumorais basaloides e claras em uma matriz amorfa de material dentinoide exibindo discreto pleomorfismo e algumas figuras de mitose (setas brancas) (H&E, aumento de 400x). (C) Células tumorais focalmente associadas com um material dentinoide (H&E, aumento de 400x). (D) Reação de imunohistoquímica para marcação de Ki-67 revelando um índice de proliferação celular de 17% (aumento de 200x).  
Fonte: GONDAK; MARIANO, 2019

Levando-se em conta o primeiro diagnóstico de TOA, foram solicitadas as lâminas histopatológicas da biópsia excisional do tumor primário, mas só foi possível o acesso ao material da biópsia incisiva do tumor primário, que exibiu características microscópicas semelhantes ao tumor recorrente (FIG. 6A e 6B). Foram observadas algumas áreas semelhantes

ao tumor odontogênico epitelial calcificante com algumas áreas focais com diferenciação ameloblástica e estruturas semelhantes a ductos. Pleomorfismo e figuras de mitose foram mais evidentes no tumor recorrente. Diante de todas estas características microscópicas do tumor primário, o diagnóstico de COD foi concluído.

**Figura 6** - Características microscópicas do tumor primário do caso #1 de carcinoma odontogênico com dentinoide

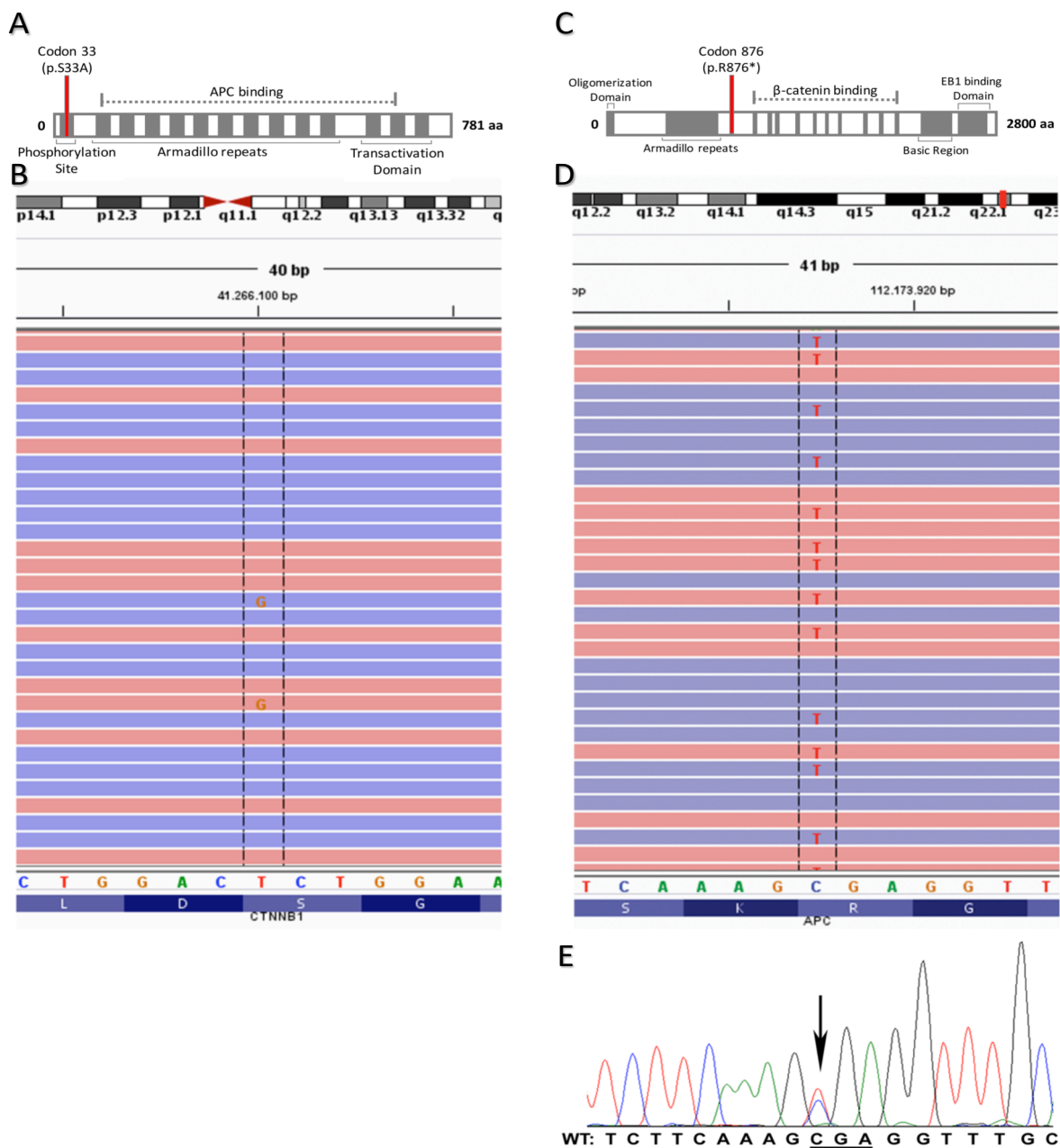


(A e B) Os aspectos microscópicos exibem proliferação de células poligonais, fusiformes e basaloides em um padrão de formação semelhantes a ductos (H&E, aumento de 300x e de 400x).  
Fonte: GONDAK; MARIANO, 2019

### 5.3.3 Sequenciamento de nova geração

Após aplicação dos filtros de análise (>x100 e >5% de frequência), 19 variantes foram identificadas em 13 diferentes genes nos dois casos recorrentes dos COD (caso #1 e caso #2). Foram 15 (79%) variantes do tipo missense e quatro (21%) do tipo nonsense. Das variantes detectadas, 12 não estão listadas nas bases de dados *dbSNP* e *1000 Genomes* e estão reportadas com significado clínico desconhecido, sendo, então, consideradas variantes de significado desconhecido (do inglês *variants of unknown significance, VUS*). As variantes reportadas que têm relação com patogenicidade foram as seguintes: variante *nonsense APC* p.Arg876\* (caso #1) e a variante *missense CTNNB1* p.Ser33Ala (caso #2) (FIG 7A-D). A mutação heterozigota nonsense de CGA>TGA na posição c.2626 do gene *APC*, que codifica um códon de parada p.R876\* foi confirmada pelo sequenciamento de Sanger (FIG. 7E).

**Figura 7** - Representação das mutações identificadas nos genes *CTNNB1* e *APC* nos carcinomas odontogênicos com dentinoide

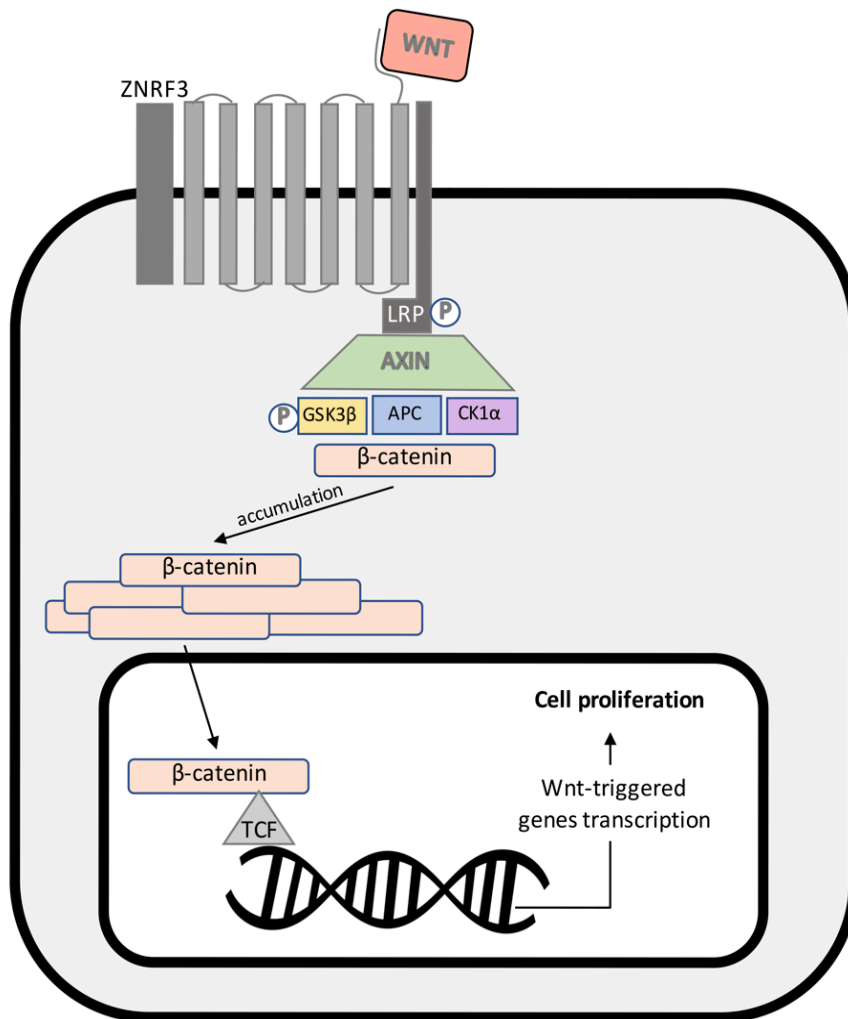


**(A)** mutação em *CTNNB1* e o domínio da proteína afetado; **(B)** captura de tela do *IGV software* revelando mutação *missense CTNNB1* p.S33A, c.97T>G (ENST00000349496.9) no chr3:41266100; **(C)** mutação em *APC* e o domínio da proteína afetado; **(D)** captura de tela do *IGV software* revelando mutação *nonsense APC* p.R876\*, c.2626C>T (ENST00000257430.8) no chr5:112173917; **(E)** eletroferograma do sequenciamento de Sanger confirmando a mutação heterozigota para a mutação *nonsense APC* CGA>TGA a qual altera o códon para um códon de parada p.R876\*.

A variante identificada para o gene *CTNNB1* (c.97T>G) não foi confirmada pelo sequenciamento de Sanger, considerando ser a frequência de leitura da variante (6%) menor que 20%, que é o limite de detecção por este método. Os genes *CTNNB1* e *APC* codificam,

respectivamente, as proteínas  $\beta$ -catenina e APC, que pertencem à via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina (FIG. 8).

**Figura 8** - Via WNT e suas consequências na presença de mutações em *APC* e *CTNNB1*



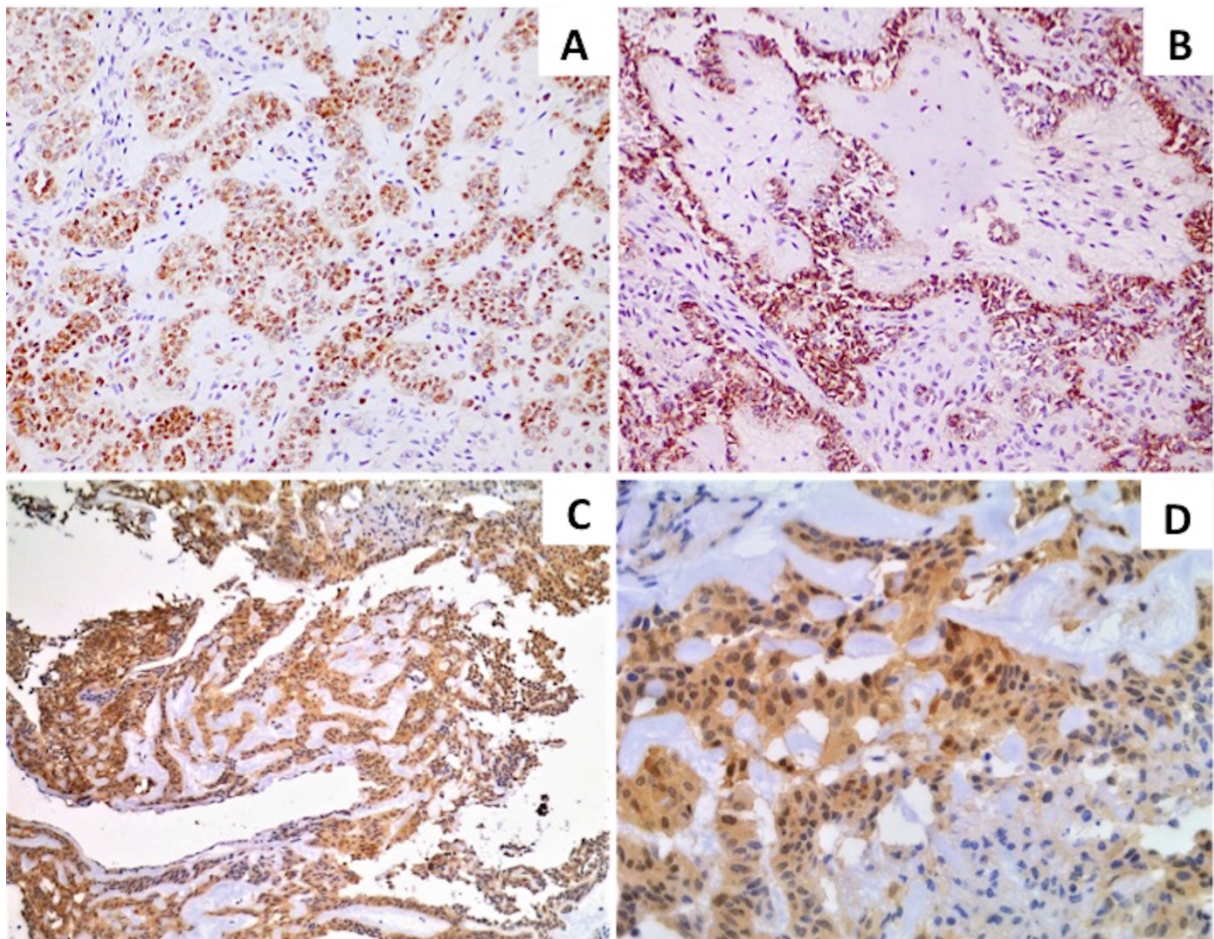
WNT se liga ao receptor *frizzled* e ao co-receptor *LRP* (do inglês *low-density lipoprotein receptor-related protein*), interrompendo a destruição do complexo funcional composto pelas proteínas axin, APC (do inglês *adenomatous polyposis coli*), *GSK3* (do inglês *glycogen synthase kinase 3*) e *CK1α* (do inglês *casein kinase 1α*) por meio da translocação do regulador negativo da via, axin. Assim, o aumento nuclear e citoplasmático de  $\beta$ -catenina aumenta e inicia a transcrição de  $\beta$ -catenina que é co-fator transcrricional de diversos genes que atuam na proliferação celular. Mutações em *CTNNB1* e *APC* podem ativar a proliferação celular, por meio da via de sinalização WNT. A mutação em *CTNNB1* resulta em uma proteína ( $\beta$ -catenina) truncada que acumula no citoplasma, entra no núcleo e forma o complexo com o fator de transcrição *TCF* (do inglês *T cell-specific transcription fator*), ativando a transcrição dos genes alvos da via WNT e, promovendo a proliferação celular. Mutações em *APC* podem manter o complexo funcional, translocando  $\beta$ -catenina para o núcleo e promovendo a superexpressão de genes relacionados com a via de sinalização WNT.



### 5.3.4 Imunoistoquímica para $\beta$ -catenina

Após a identificação das mutações patogênicas em ambos os casos, realizamos reações de imunoistoquímica para  $\beta$ -catenina, considerando que as duas mutações identificadas ocorrem em genes que participam da via de sinalização WNT, e a superativação da via pode resultar em expressão nuclear da  $\beta$ -catenina. As reações revelaram uma marcação no citoplasma e, eventualmente, no núcleo das células tumorais, associadas ou não com material dentinoide (FIG. 9).

**Figura 9** - Imunoistoquímica para detecção de  $\beta$ -catenina nos dois casos de carcinoma odontogênico com dentinoide



(A e B) Imunoexpressão de  $\beta$ -catenina no citoplasma e no núcleo de células tumorais do caso #1 (aumento de 200x). (C e D) Imunoexpressão de  $\beta$ -catenina no citoplasma e no núcleo de células tumorais associadas com material dentinoide, no caso #2 (aumento de 200x e 400x, respectivamente).

Fonte: GONDAK; MARIANO, 2019

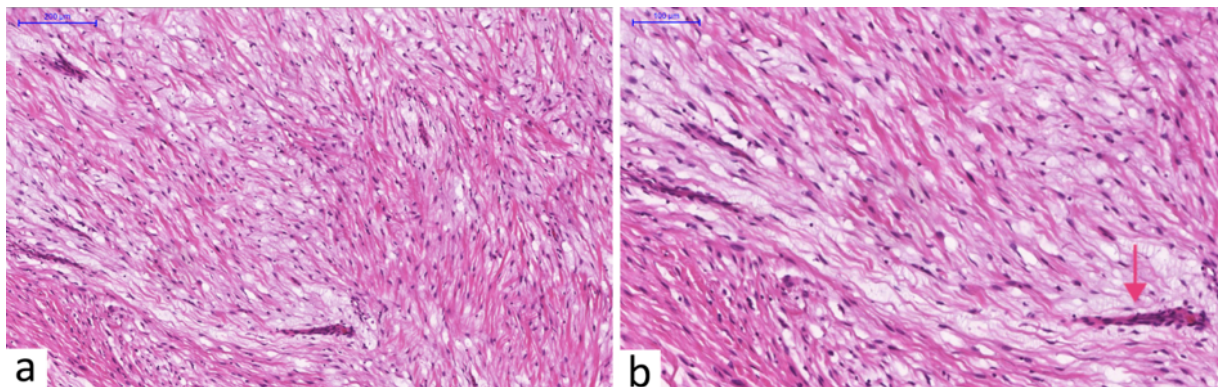
## 5.4 Mixoma odontogênico

Os resultados obtidos do estudo microscópico e molecular das amostras de MO foram escritos na forma de um artigo científico e encontra-se aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*: **Elisa Carvalho de Siqueira**, Silvia Ferreira de Sousa, Roman Carlos, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade, Mário José Romañach, Ricardo Santiago Gomez, **Carolina Cavaliéri Gomes**. *Odontogenic myxomas lack PDGFR $\beta$  mutations reported in myofibromas*. *Journal of Oral Pathology and Medicine*. (APÊNDICE C).

### 5.4.1 Amostra

A maioria dos casos de MO ocorreu em pacientes do sexo feminino (12/15, 80%), e a região mais afetada foi a posterior de mandíbula (TAB. 4). A idade média dos pacientes foi de 30,6 $\pm$ 16,61 anos, variando de 21 a 81 anos de idade. Uma fotomicrografia representativa dos casos de MO pode ser observada na Figura 10.

**Figura 10** - Fotomicrografia representativa de mixoma odontogênico

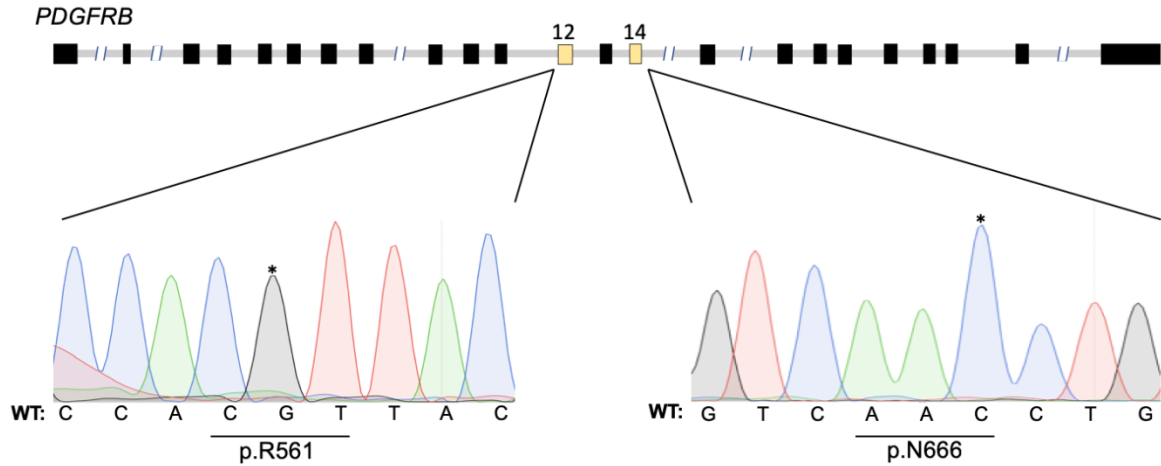


(A) Fotomicrografia exibindo células em um estroma mixoide e colagenoso (H&E, aumento de 100x). (B) Mixoma odontogênico apresentando proliferação de células fusiformes, ovoides e estreladas, com ocasionais restos odontogênicos (seta), os quais encontram-se dispersos em um abundante estroma que contém fibras colágenas (H&E, aumento de 200x).

### 5.4.2 Análise molecular do gene PDGFR $\beta$

Todos os 15 casos de MO foram sequenciados com sucesso e todos apresentaram a sequência selvagem (do inglês *wild-type*, *WT*) para as sequências investigadas do gene PDGFR $\beta$  (FIG. 11).

**Figura 11** - Mutações *hotspot* dos éxons 12 e 14 do gene *PDGFRβ* que foram avaliadas nos mixomas odontogênicos



Os éxons do gene *PDGFRβ* estão representados na parte superior da figura e os cromatogramas representativos dos sequenciamentos para amostras selvagens para as mutações *hotspots* p.R561C (c.1681C>T) e p.N666K (c.1998C>G) são mostradas. A mutação *hotspot* c.1681C>T, corresponde à mutação p.R561C, e a mutação *hotspot* c.1998C>G, corresponde à mutação p.N666K. Estas são as mutações mais comuns reportadas previamente em miofibromas.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 Cisto odontogênico glandular

A base da patogênese molecular do COG ainda é desconhecida. A mutação no gene *PTCH1*, um gene importante no processo de odontogênese e associado com lesões odontogênicas (GOMES *et al.*, 2009; GOMES *et al.*, 2011), foi analisada por meio de sequenciamento nos 23 éxons. Após o sequenciamento direto, foi evidenciada a ausência de mutação na amostra de COG investigada no estudo, sugerindo que esse gene não estaria envolvido na patogênese dessa lesão (BARRETO *et al.*, 2001). Considerando que o CME e COG apresentam similaridades histopatológicas, questiona-se se o COG não seria um CME intraósseo. Como o arranjo genético no gene *MAML2* é comumente encontrado em CME, essa alteração genética foi investigada no COG. Entretanto, ela não foi observada em COG (BISHOP *et al.*, 2014). Apesar de auxiliar no diagnóstico diferencial entre as duas lesões, casos negativos para esse rearranjo não possibilitam a distinção entre eles, uma vez que a ausência do rearranjo em *MAML2* não exclui o diagnóstico de CME (BISHOP *et al.*, 2014; GREER *et al.*, 2018).

Devido a escassez de estudos moleculares sobre COG, utilizou-se, no presente trabalho, o *NGS* para avaliar 50 genes, entre ao quais estão os supressores de tumor ou oncogenes comumente mutados em diferentes tipos de cânceres humanos, nas amostras de COG. Nosso estudo iniciou-se com sete amostras, mas apenas quatro foram incluídas na preparação do *template*, considerando que as outras três não estavam de acordo com a qualidade necessária indicada pelo fabricante para prosseguir às etapas posteriores do sequenciamento. A metodologia utilizada para a análise molecular do COG é vantajosa em estudos de lesões incomuns ou raras com amostras restritas uma vez que possibilita um sequenciamento simultâneo de múltiplos alvos genéticos mesmo por meio de amostras fixadas em formol e incluídas em blocos de parafina. Além disso, essa tecnologia possibilita a identificação de mutações de baixa frequência em razão da alta sensibilidade da técnica *NGS*.

Foram detectados *SNV* do tipo *missense* nas quatro amostras de COG em estudo. Contudo, três das variantes não se enquadram no critério de classificação de *SNP* (pois apresentaram  $MAF > 0,01$ ) e, também, não haviam sido avaliadas quanto ao possível impacto clínico. Essas variantes incluem os genes *TP53* (p.Leu289Phe) e *PIK3CA* (p.Glu689Lys; p.Ala708Thr). Quanto às variantes detectadas em *TP53*, trata-se de uma forma considerada benigna e tolerável, de acordo com as predições *in silico* realizadas no *PolyPhen-2* e *SIFT*,

respectivamente. Já para *PIK3CA*, as duas variantes são reportadas como danosas ou possivelmente danosas, de acordo com *PolyPhen-2*. Essas variantes do gene *PIK3CA* reportadas com uma frequência menor do que 5%, que é o limite de detecção da técnica, não foram avaliadas e exploradas por outros métodos de sequenciamento, como o de Sanger, que tem uma sensibilidade mínima de 20% (CHIM *et al.*, 2013; STROM, 2016). Nenhuma das *SNV* do tipo *missense* com frequência maior do que 5% foram preditas como patogênicas, de acordo com *ClinVar*. De acordo com análises *in silico*, todas as variantes foram descritas como benignas e toleradas em nível de funcionalidade da proteína. O *NGS* que utilizamos é um método com alta sensibilidade, capaz de detectar mutações raras em amostras com “contaminação” por células normais/estromais. Assim, é altamente improvável que a presença de células estromais tenham mascarado a presença de variantes de baixa frequência. Além disso, *SNV* reportadas com uma frequência menor do que 5% e caracterizadas por substituições de G>A ou de C>T podem representar alterações nucleotídicas devido a fixação por formol, que leva a uma agressão no *DNA* e que suporta a hipótese de alterações advindas de artefatos do sequenciamento e, não em uma variante verdadeira (WONG *et al.*, 2014). A presença de subpopulações celulares com biologia molecular distinta em uma mesma lesão já é associada às lesões malignas ou potencialmente malignas (BERMAN *et al.*, 2010; KIM *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2015). Lesões orais já demonstraram associação com heterogeneidade molecular (DIWAKAR *et al.*, 2005; GOMES *et al.*, 2015; LEDGERWOOD *et al.*, 2016) embora, no contexto de lesões odontogênicas, não se tenha evidências. Apesar disso, não se pode deixar de destacar uma possível hipótese da presença dessa condição que pode justificar a não identificação de variantes patogênicas nestas lesões.

As outras três *SNV* reportadas (*TP53* p.Pro72Arg, *KDR* p.Gln472His e *KIT* p.Met541Leu) provavelmente representam *SNP* (*MAF*>0,01). Como não pudemos avaliar se essa *SNV* está presente no tecido normal, não é possível confirmar o tipo da mutação, seja ela somática ou germinativa. Contudo, todas estas *SNV* obtiveram uma frequência de leitura em torno de 50% ou 100%, condizente com *SNP* heterozigotos ou homozigotos, respectivamente. Embora nosso desenho de estudo não nos tenha permitido inferir a participação dessas variantes na tumorigênese do COG, não se pode excluir essa possibilidade. Recentemente, um estudo de revisão reportou como diferentes estudos com *SNP* identificaram *loci* genéticos associados com a susceptibilidade ao câncer, assim como o prognóstico da doença e a resposta à drogas (SRINIVASAN *et al.*, 2016). Interessantemente, *TP53* p.Pro72Arg é um dos *SNP* mais estudados, já que está relacionado com a capacidade diferenciada de apoptose, bem como a resposta à drogas (OLIVIER *et al.*, 2010). Inferir uma associação entre *SNP* e susceptibilidade

a uma determinada lesão requer uma grande amostragem, porém, em se tratando de uma lesão odontogênica com prevalência menor que 0,5% entre todos os cistos odontogênicos (TAKATA; SLOOTWEG, 2017), essa inferência fica difícil de ser feita considerando a raridade desse cisto.

O painel para genes alvos relacionados com câncer utilizado neste estudo inclui 2.856 mutações do tipo *hotspots* em um painel de 50 genes comumente mutados em câncer. Esses painéis pré-definidos são opções com menor custo, confiáveis, rápidas e de fácil abordagem (KAMPS *et al.*, 2017). Embora nosso estudo apresente o maior painel genético investigado em COG, a ausência de mutações patogênicas não exclui a presença de variações genéticas em outros genes. A taxa de caracterização genética das lesões em geral tem crescido rapidamente nos últimos anos (BOYCOTT *et al.*, 2013). Nesse contexto, o sequenciamento completo dos éxons (do inglês *whole exome sequencing*, *WES*) pode oferecer uma melhor cobertura genética. Contudo, as limitações do sequenciamento do exoma incluem o alto custo das reações, a necessidade de uma quantidade grande de material genético de alta qualidade, e, ainda, as dificuldades apresentadas durante a interpretação e divulgação dos dados, em razão da alta complexidade da técnica e o seu pouco uso (XUE *et al.*, 2015).

## 6.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide

Relatamos, neste estudo, dois casos de COD e reportamos mutações patogênicas que mostram alterações na via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina no tumor. Considerando que COD é uma condição debilitante com destruição óssea e deformidade facial resultante do tratamento mais adequado, entender a sua patogênese pode ser de grande utilidade diagnóstica e terapêutica.

De acordo com a literatura e incluindo os casos descritos neste trabalho, existem 11 casos que atendem ao diagnóstico de COD (SAWYER *et al.*, 1986; MIYAUCHI *et al.*, 1998; KUMAMOTO *et al.*, 2000; ARIYOSHI *et al.*, 2002; PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Considerando os nove casos previamente publicados e os dois aqui reportados, não foi observada predileção por sexo (seis homens e cinco mulheres) e a idade variou de 14 a 74 anos, com uma média de 41,8 anos. A mandíbula e a maxila foram igualmente afetadas (seis casos e cinco casos, respectivamente). Os casos acometeram regiões posteriormente aos dentes caninos (SAWYER *et al.*, 1986; MIYAUCHI *et al.*, 1998; KUMAMOTO *et al.*, 2000; ARIYOSHI *et al.*, 2002; PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014) e todos se apresentaram, radiograficamente, como lesões radiolúcidas bem definidas, sendo que em 6/11 casos foi observada a presença de quantidade

variável de material mineralizado (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Neste estudo, os dois casos apresentaram-se com limites bem definidos nos exames de imagem, o que foi sugestivo de serem lesões benignas. Adicionalmente, o caso #2 exibiu uma imagem radiográfica mista. A recorrência de COD foi descrita em 5/11 casos, sendo que nenhum dos casos teve recorrência após ressecção. Uma revisão clínico-patológica sugeriu que o COD se apresenta como uma lesão sem cápsula, de perfil agressivo, localmente infiltrativo e sem potencial metastático (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Assim, o tratamento recomendado para esse tumor aparentemente de baixo grau de malignidade é uma ressecção. Embora não tenha sido possível ter acesso aos protocolos de radioterapia e quimioterapia aplicados no caso #1, não existe evidência de que essas terapias são necessárias adicionalmente ao tratamento cirúrgico.

Microscopicamente, o COD é composto, predominantemente, de cordões, ninhos e lençóis de células basaloideas e claras próximas à deposição de material dentinoide (SAWYER *et al.*, 1986; MIYAUCHI *et al.*, 1998; KUMAMOTO *et al.*, 2000; ARIYOSHI *et al.*, 2002; PUNNYA *et al.*, 2004; IDE *et al.*, 2009; MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Uma discreta atipia celular e uma atividade mitótica celular variável também são relatadas, e 10/11 casos mostraram infiltração tumoral em tecidos adjacentes (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Quanto à invasão perineural, apenas 2/11 casos apresentaram essa característica.

Neste estudo, os casos #1 e #2 apresentaram a maioria das características microscópicas previamente descritas nos casos já publicados de COD (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014). Enquanto o caso #1 exibiu infiltração das margens cirúrgicas, nenhum dos casos relatados aqui apresentaram invasão perineural. Além disso, atipia celular, atividade mitótica e expressão proteica de Ki-67 foram mais evidentes no caso #2 embora os dois casos tenham apresentado pleomorfismo celular. Embora tenha havido a presença de áreas focais com células semelhantes aos ameloblastos nos dois casos, não foram observadas áreas com deposição de material semelhante ao esmalte. Esse aspecto juntamente com atipia celular são importantes para diferenciar o COD com o diagnóstico de fibrodentinoma ameloblástico (TAKATA; SLOOTWEG, 2017). Devido ao fato de o COD apresentar características histopatológicas semelhantes a outros tumores odontogênicos, o diagnóstico dessa neoplasia maligna é difícil de ser alcançado apenas com biópsias incisórias. Os cortes histopatológicos dos COD primários e recorrentes apresentaram similaridades nas características microscópicas. A análise retrospectiva dos cortes dos casos facilitou o diagnóstico. Entretanto, dada a raridade do COD, é fácil entender por que esse diagnóstico não foi considerado pelos patologistas que examinaram as biópsias incisórias ou tumores primários nos dois casos. O adenoma pleomórfico não foi considerado pelo grupo em razão das características da análise

morfológica, porém, estudos moleculares para rearranjo do gene *PLG1* (do inglês *pleomorphic adenoma gene 1*) e reações imunoistoquímicas para marcadores mioepiteliais, como actina de músculo liso (AML), p63 e calponina, podem ser úteis no diagnóstico diferencial.

A via de sinalização WNT participa do desenvolvimento embrionário e é desregulada em diversos tipos de câncer (SARKAR; SHARPE, 1999; ZHAN *et al.*, 2017). A via canônica WNT/ $\beta$ -catenina é  $\beta$ -catenina dependente. Os genes *CTNNB1* e *APC* codificam as proteínas  $\beta$ -catenina e APC, respectivamente, que pertencem à via de sinalização WNT, como demonstrado na Figura 9. Detectamos, no caso COD #2, a mutação *hotspot* p.Ser33Phe no gene *CTNNB1*, localizada no códon 33, um sítio de fosforilação da  $\beta$ -catenina. Essa mesma mutação já foi previamente reportada em cistos odontogênicos calcificantes (COC), pilomatrixoma, meduloblastoma e craniofaringioma (CHAN *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2000; SEKINE *et al.*, 2002; SEKINE *et al.*, 2003; DE SOUSA *et al.*, 2016; GOMES *et al.*, 2019).

Embora o COC tenha a mesma mutação detectada no gene da  $\beta$ -catenina que COD, os parâmetros histopatológicos são essenciais para a distinção das duas lesões (AHN *et al.*, 2008). COC são revestidos com um epitélio de espessura variável consistindo em uma camada basal bem definida, em paliçada, de células colunares, e uma camada adjacente semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte, com diversas células fantasmas (DE ARRUDA *et al.*, 2018). Em contrapartida, COD apresenta, principalmente, proliferação de células claras com quantidades variáveis de pequenas células redondas ou basaloídes e, ainda, um pleomorfismo mais acentuado próximo às áreas de infiltração tumoral aos tecidos adjacentes (MOSQUEDA-TAYLOR *et al.*, 2014).

A estabilização e acúmulo citoplasmático e nuclear de  $\beta$ -catenina pode resultar de mutações que inativam *APC* ou que ativam *CTNNB1* (KIM *et al.*, 2007). A proteína *APC* é necessária para promover a degradação da  $\beta$ -catenina. Portanto, a mutação detectada no gene *APC*, do tipo *nonsense* (p.Arg876\*), no caso #1, culmina em parada prematura da tradução da proteína *APC*, o que também pode interromper a degradação da  $\beta$ -catenina, tornando-a acumulada. A marcação citoplasmática e nuclear observada em ambos os casos de COD incluídos neste estudo sugere que as mutações detectadas em *APC* e *CTNNB1* impedem a degradação de  $\beta$ -catenina (KIM *et al.*, 2007). Se a degradação da  $\beta$ -catenina é prejudicada, como consequência, a proteína é acumulada no citoplasma, podendo ser translocada ao núcleo (EBERHART *et al.*, 2000), como observado em ambos os casos de COD. Coletivamente, os resultados moleculares e imunoistoquímicos deste estudo são consistentes com a ativação da via WNT/ $\beta$ -catenina no COD, e isso pode resultar em novas descobertas no tratamento de COD



agressivos e recorrentes pela adoção de alvos moduladores dessa via de sinalização (SHANG *et al.*, 2017).

Estudos genômicos têm revelado assinaturas genéticas para tumores benignos e malignos (KATO *et al.*, 2016). Mutações recorrentes em genes já associados com câncer já foram relatados em lesões odontogênicas (DINIZ *et al.*, 2017). Nesse contexto, o TOA revelou uma mutação patogênica ativadora *KRASG12V/R* e o ameloblastoma, assim como o carcinoma ameloblástico e de células claras, revelaram mutação em *BRAFV600E* (KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2018). O COD caso #2 foi diagnosticado inicialmente como TOA por causa das similaridades histopatológicas e, por isso, o tratamento escolhido havia sido a cirurgia conservadora. Apenas após a recidiva, a nova biópsia revelou o fenótipo maligno das células associadas a uma grande quantidade de material dentinoide. Interessantemente, o material dentinoide pode estar presente em outros tumores que também mostram mutação na via de sinalização WNT, como tumor dentinogênico de células fantasmas, carcinoma odontogênico de células fantasmas e craniofaringioma adamantinomatoso (BERNSTEIN; BUCHINO, 1983; KIM *et al.*, 2007; LARKIN e ANSORGE, 2013; OHATA *et al.*, 2018). No entanto, infelizmente, o perfil molecular diferencial de tumores odontogênicos ainda não é empregado rotineiramente para fins diagnósticos. Embora esse método de diagnóstico diferencial não seja, ainda, uma realidade, a ausência de mutações *KRASG12V/R* e *BRAFV600E* pode contribuir na diferenciação de COD com tumores associados a mutações nos genes *KRAS* e *BRAF*.

### 6.3 Mixoma odontogênico

Pouco se sabe sobre a patogênese molecular do MO. Recentemente, um estudo foi realizado usando *NGS* para identificar mutações condutoras em uma coorte de MO (SANTOS *et al.*, 2017). Contudo, nenhum dos tumores avaliados apresentaram mutações patogênicas comumente encontradas em cânceres humanos.

Miofibromas podem exibir microscopicamente a presença de áreas mixoides, e as células do MO podem apresentar diferenciação miofibroblástica. Assim, hipotetizamos que ambas as lesões poderiam compartilhar de uma mesma patogênese molecular. Além disso, a natureza odontogênica dos MO não é inequívoca e, quando os miofibromas afetam os maxilares, preferencialmente eles ocorrem na mandíbula, de forma semelhante aos MO. Considerando as recentes evidências da ocorrência de mutações *drivers* no gene *PDGFRβ* em

miofibromas e o fato de que esse gene não está incluído no catálogo de mutações somáticas previamente investigadas em MO por Santos e colaboradores (2017), propusemos buscar essas alterações genéticas em MO.

*PDGF* (do inglês, *platelet-derived growth factor*) é um ligante necessário para o crescimento de células mesenquimais, incluindo células musculares lisas, fibroblastos e células gliais (KOHLENER; LIPTON, 1974, ROSS *et al.*, 1974, WESTERMARK; WASTESON, 1976). Considerando que a sinalização de *PDGF* é fortemente associada com células mesenquimais, o ligante *PDGF* e o receptor *PDGFR $\beta$*  podem estar relacionados com a diferenciação miofibroblástica (ROSKOSKI, 2018). A ligação *PDGF/PDGFR* (do inglês *platelet-derived growth factor receptor*) participam durante estágios precoces do desenvolvimento, especialmente durante desenvolvimento craniofacial e formação de vasos e órgãos (CHEN *et al.*, 2013, MCCARTHY *et al.*, 2016).

O presente estudo demonstra que, diferentemente de miofibromas, os MO avaliados nessa coorte não apresentam as mutações nos éxon 12 e 14 do gene *PDGFR $\beta$* . Agaimy e colaboradores (2017) revelaram que mutações em *PDGFR $\beta$*  são eventos moleculares condutores das lesões esporádicas de miofibromas infantis e adultos (75% e 69%, respectivamente) (AGAIMY *et al.*, 2017). Essas alterações genéticas foram detectadas não apenas em lesões tumorais de tecido mole, mas também em lesões intraósseas, conforme visto na Tabela 3 (ARTS *et al.*, 2017, MUDRY *et al.*, 2017, DACHY *et al.*, 2019). Neste estudo, não foram encontradas mutações nas 15 amostras de MO avaliadas, sugerindo, então, que, mutações associadas aos éxon 12 e 14 do gene *PDGFR $\beta$*  não estão associadas com a tumorigênese dos MO incluídos neste trabalho.

A maioria dos estudos que analisaram as mutações em *PDGFR $\beta$*  em lesões miofibroblásticas únicas ou múltiplas incluiu amostras de pacientes infantis ou recém-nascidos. (LEPELLETIER *et al.*, 2017, MUDRY *et al.*, 2017, AL QAWAHMED *et al.*, 2019, DACHY *et al.*, 2019). Contudo, algumas das mutações foram, também, reportadas em miofibromas de indivíduos adultos (AGAIMY *et al.*, 2017). A idade dos pacientes nesse coorte variou de 21 a 81 anos de idade.

Esses resultados revelam que o MO não compartilha das mesmas mutações recorrentes que ocorrem nos miofibromas de tecidos moles e intraósseos. A patogênese molecular distinta está de acordo com outras disparidades clínicas, como a ocorrência única do MO, em contraste com as lesões multicêntricas descritas em pacientes com miofibromas (LEPELLETIER *et al.*, 2017, MUDRY *et al.*, 2017, CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019, DACHY *et al.*, 2019). Nosso estudo não confirma a hipótese de que o miofibroma de ossos gnáticos e MO representem

diferentes espectros de uma mesma doença. Embora a maioria dos miofibromas apresentem uma histopatologia específica, que é o suficiente para o diagnóstico final, a investigação molecular por mutações em *PDGFRβ* pode auxiliar em casos de miofibroma intraósseo com áreas mixoides, cujo componente bifásico não esteja evidente.

## 7 CONCLUSÃO

### 7.1 Cisto odontogênico glandular

- A análise molecular do COG revelou somente a presença de *SNP* nas amostras estudadas.

### 7.2 Carcinoma odontogênico com dentinoide

- A análise molecular do COD revelou a presença de mutações patogênicas associadas à via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina.
- Os casos de COD com mutação em genes na via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina revelaram acúmulo de  $\beta$ -catenina nuclear e citoplasmática nas células tumorais, indicando que essas mutações provavelmente são ativadoras.
- Os achados moleculares dos COD podem contribuir no diagnóstico da lesão.

### 7.3 Mixoma odontogênico

- As mutações do éxon 12 e 14 do gene *PDGFR $\beta$*  descritas em miofibromas e miofibromatose não estão envolvidas na patogênese dos casos de MO avaliados neste estudo.
- A ausência de mutações em *PDGFR $\beta$*  em MO podem ser úteis na diferenciação desta lesão com miofibromas em casos de difícil diagnóstico.

## **8 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

De acordo com os resultados que obtivemos neste estudo, aventamos que futuros estudos moleculares de sequenciamento com maiores painéis de genes ou, ainda, uma análise completa do exoma em um maior número de amostras de COG e MO possam auxiliar na definição do perfil genético dessas lesões. Nossos resultados do estudo genético do COD se mostraram promissores e, além de auxiliar no diagnóstico da lesão, podem, no futuro, contribuir na identificação de possíveis alvos terapêuticos. Atualmente, a  $\beta$ -catenina já é utilizada como um alvo terapêutico para diversos cânceres humanos. Baseado nisso, futuramente, após estudos experimentais, terapia baseada na modulação da via de sinalização WNT/ $\beta$ -catenina pode vir a ser aplicada em casos agressivos e recorrentes de COD.

## REFERÊNCIAS

ABRAMOWICZ S, Simon LE; KOZAKEWICH HP et al. Myofibromas of the jaws in children. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 70, n. 8, p. 1880-1884, 2011.

AGAIMY, A; BIEG, M; MICHAL, M. *et al.* Recurrent Somatic PDGFRB Mutations in Sporadic Infantile/Solitary Adult Myofibromas But Not in Angioleiomyomas and Myopericytomas. *Am J Surg Pathol*, v.41, n. 2. p. 195-203, 2017.

AHN, SG; KIM, SA; KIM, SG. *et al.* Beta-catenin gene alterations in a variety of so-called calcifying odontogenic cysts. *APMIS*, v. 116, n. 3, p. 206-211, 2008.

ALAEDDINI, M.; ESHGHYAR, N.; ETEMAD-MOGHADAM, S. Expression of podoplanin and TGF-beta in glandular odontogenic cyst and its comparison with developmental and inflammatory odontogenic cystic lesions. *J Oral Pathol Med*, v. 46, n. 1, p. 76-80, 2017.

ALLON, I.; VERED, M; BUCHNER, A. *et al.* Central (intraosseous) myofibroma of the mandible: clinical, radiologic, and histopathological features of a rare lesion. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 103, n. 4, p. 45-53, 2007.

AL QAWAHMED, R; SAWYER, SL; VASSILYADI M. *et al.* Infantile Myofibromatosis With Intracranial Extradural Involvement and PDGFRB Mutation: *A Case Report and Review of the Literature*. *Pediatr Dev Pathol*, v. 22, n. 3, p. 258-264, 2019.

ARIYOSHI, Y., SHIMAHARA, M; MIYAUCHI, M. *et al.* Clear cell odontogenic carcinoma with ghost cells and inductive dentin formation-report of a case in the mandible. *J Oral Pathol Med*, v. 31, n. 3, p. 181-183, 2002.

ARRUDA, JAA.; SCHUCH, LF.; ABREU, LG. *et al.* A multicentre study of 268 cases of calcifying odontogenic cysts and a literature review. *Oral Dis*, v. 27, n. 7, p. 1282-1293, 2018.

ARTS, FA; SCIOT, R; BICHARD, B. *et al.* PDGFRB gain-of-function mutations in sporadic infantile myofibromatosis. *Hum Mol Genet*, v. 26, n. 10, p. 1801-1810, 2017.

BARRETO, DC; DE MARCO, L.; CASTRO, WH. *et al.* Glandular odontogenic cyst: absence of PTCH gene mutation. *J Oral Pathol Med*. v. 30, n. 2, p. 125-128, 2001.

- BERMAN, HK; GAUTHIER, ML; TLSTY, TD. Premalignant breast neoplasia: a paradigm of interlesional and intralesional molecular heterogeneity and its biological and clinical ramifications. *Cancer Prev Res (Phila)*, v. 3, n. 5, p. 579-587, 2010.
- BERNSTEIN, ML.; BUCHINO, JJ. The histologic similarity between craniopharyngioma and odontogenic lesions: A reappraisal. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, v. 56, n. 5, p. 502-511, 1983.
- BEST-ROCHA, A.; PATEL, K.; HICKS, J. *et al.* Novel Association of Odontogenic Myxoma with Constitutional Chromosomal 1q21 Microduplication: Case Report and Review of the Literature. *Pediatr Dev Pathol*, v. 19, n. 2, p. 139-145, 2016.
- BISHOP, JA.; YONESCU, R.; BATISTA, D. *et al.* Glandular odontogenic cysts (GOCs) lack MAML2 rearrangements: a finding to discredit the putative nature of GOC as a precursor to central mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck Pathol*, v. 8, n. 3, p. 287-290, 2014.
- BOYCOTT, KM; VANSTONE, MR; BULMAN DE. *et al.* Rare disease genetics in the era of next-generation sequencing: Discovery to translation. *Nat Rev Genet*, v. 14, n. 10, p. 681-691, 2013.
- BRUNNER, P.; BIHL, M. JUNDT, G. *et al.* BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. *Oral Oncol*, v. 51, n. 10, p. 77-78, 2015.
- CASTRO HHO., GOMES HE., TASSARA LFR. *et al.* Myofibroma of the mandible and Case report. *Pediatr Dent J*, v. 26, n. 1, p. 38-41, 2016.
- CHAN, EF.; GAT, U.; MCNIFF, JM. *et al.* A common human skin tumour is caused by activating mutations in beta-catenin. *Nat Genet*, v. 21, n. 4, p. 410-413, 1999.
- CHEN, P.; CHEN, X.; HE, X. Platelet-derived growth factors and their receptors: structural and functional perspectives. *Biochim Biophys Acta*, v. 1834, n. 10, p. 2176-2186, 2013.
- CHEUNG, YH.; GAYDEN, T.; CAMPEAU, PM. *et al.* A recurrent PDGFRB mutation causes familial infantile myofibromatosis. *Am J Hum Genet*, v. 92, n. 6, p. 996-1000, 2013.

- CHIN, EL.; SILVA, C.; HEGDE, M. Assessment of clinical analytical sensitivity and specificity of next-generation sequencing for detection of simple and complex mutations. *BMC Genet*, v. 19, n. 14, p. 6, 2013.
- CHRCANOVIC, BR.; GOMEZ, RS. Odontogenic myxoma: An updated analysis of 1,692 cases reported in the literature. *Oral Dis*, v. 25, n. 3, p. 676-683, 2019.
- COURA, BP.; BERNARDES, VF.; SOUSA, SF. *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Mod Pathol*, v. 32, n. 6, p. 799-806, 2018.
- DACHY, G.; KRIJGER, RR.; FRAITAG, S. *et al.* Association of PDGFRB Mutations with Pediatric Myofibroma and Myofibromatosis. *JAMA Dermatol*, v. 155, n. 8, p. 946-950, 2019.
- DINIZ, MG.; GOMES, CC.; SOUSA, SF. *et al.* Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol*, n. 72, p. 165-173, 2017.
- DINIZ, MG.; GOMES, CC.; GUIMARÃES, BV. *et al.* Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol*, v. 36, n. 7, p. 5649-5653, 2015.
- DIWAKAR, N.; SPERANDIO, M.; SHERRIFF, M. *et al.* Heterogeneity, histological features and DNA ploidy in oral carcinoma by image-based analysis. *Oral Oncol*, v. 41, n. 4, p. 416-422, 2005.
- EBERHART, CG.; TIHAN, T.; BURGER, PC. Nuclear localization and mutation of beta-catenin in medulloblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol*, v. 59, n. 4, p. 333-337, 2000.
- ECONOMOPOULOU, P.; PATRIKIOU, A. Glandular odontogenic cyst of the maxilla: report of case. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 53, n. 7, p. 834-837, 1995.
- EL-GEHANI, R.; ORAFI, M.; ELARBI, M. *et al.* Benign tumours of orofacial region at Benghazi, Libya: a study of 405 cases. *J Craniomaxillofac Surg*, v. 37, n. 7, p. 370-375, 2009.
- FAISAL, M.; AHMAD, SA.; ANSARIC, U. Glandular odontogenic cyst – Literature review and report of a paediatric case. *J Oral Biol Craniofac Res*, v. 5, n. 3, p. 219-225, 2015.



- FIGUEIREDO, NR.; DINKAR, AD.; KHORATE, MM. Glandular odontogenic cyst of the maxilla: a case report and literature review. *Pan Afr Med J*, v. 25, p.11, 2016.
- FOSS RD., ELLIS GL. Myofibromas and myofibromatosis of the oral region: a clinicopathological analysis of 79 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endo*, v. 89, n. 1, p. 57-65, 2000.
- FOWLER, C.; BRANNON, RB.; KESSLER, HP. *et al.* Glandular odontogenic cyst: analysis of 46 cases with special emphasis on microscopic criteria for diagnosis. *Head Neck Pathol*, v. 5, n. 4, p. 364-375, 2011.
- FU, Y.; GUAN, WY.; WU, HY. *et al.* Myofibroma/myofibromatosis: a clinicopathologic analysis of 9 cases. *Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi*, v. 47, n. 1, p. 45-50, 2018.
- GARDNER, DG.; KESSLER, H.; MORENCY, R. *et al.* The glandular odontogenic cyst: An apparent entity. *J Oral Pathol*, v. 17, n. 8, 359–366, 1988.
- GOMES, CC.; SOUSA, SF de; MENEZES GH. *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol*, v. 56, p. 3-5, 2016.
- GOMES, CC.; SOUSA, SF.; GOMEZ, RS. Craniopharyngiomas and odontogenic tumors mimic normal odontogenesis and share genetic mutations, histopathological features and molecular pathways activation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*; v. 127, n. 3, p. 231-236, 2019.
- GOMES, CC.; DINIZ, MG.; DUARTE, AP. *et al.* Molecular review of odontogenic myxoma. *Oral Oncol*, n. 47, p. 325-328, 2011.
- GOMES, CC.; DINIZ, MG.; GOMEZ RS. Review of the molecular pathogenesis of the odontogenic keratocyst. *Oral Oncol*, v. 45, n. 12, p. 1011-1014, 2009.
- GOMES, CC.; GOMEZ, RS. PTCH1 gene inactivation is not a Keratocystic odontogenic tumor exclusive alteration. *Oral Oncol*, v. 47, n. 3, p. 226-227, 2011.
- GOMES, CC.; FONSECA-SILVA, T. GALVÃO, CF. *et al.* Inter- and intra-lesional molecular heterogeneity of oral leukoplakia. *Oral Oncol*, v. 51, n. 2, p. 178-181, 2015.

GONDAK, RO; MARIANO, FV., SOUSA, SF. *et al.* CTNNB1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 2019, doi: <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.08.017>.

GREER, RO.; ESKENDRI, J.; FREEDMAN P. *et al.* Assessment of biologically aggressive, recurrent glandular odontogenic cysts for mastermind-like 2 (MAML2) rearrangements: histopathologic and fluorescent in situ hybridization (FISH) findings in 11 cases. *J Oral Pathol Med*, v. 47, n. 2, p. 192-197, 2018.

GUIMARÃES, DM.; ANTUNES, DM.; SATURNO, JL. *et al.* Immunohistochemical expression of WNT5A and MMPs in odontogenic epithelial tumors and cysts. *Acta Histochem*, v. 117, n. 8, p. 667-674, 2015.

GURLER, G.; AL-GHAMIAN, H.; AKSAKALLI, N. *et al.* Glandular Odontogenic Cyst: Case Series. *Contemp Clin Dent*, v. 8, n. 4, p. 653-657, 2017.

HARRISON, JD. Odontogenic myxoma: ultrastructural and histochemical studies. *J Clin Pathol*, v. 26, n. 8, p. 570-582, 1973.

HUANG, H.; MAHLER-ARAÚJO, BM.; SANKILA, A. *et al.* APC mutations in sporadic medulloblastomas. *Am J Pathol*, v. 156, n. 2, p. 433-437, 2000.

IDE F.; MISHIMA. K.; SAITO, I. *et al.* Diagnostically challenging epithelial odontogenic tumors: a selective review of 7 jawbone lesions. *Head Neck Pathol*, v. 3, n. 1, p. 18-26, 2009.

JONES, AV.; FRANKLIN, CD. An analysis of oral and maxillofacial pathology found in adults over a 30-year period. *J Oral Pathol Med*, v. 35, n. 7, p. 392-401, 2006.

KAMPS, R.; BRANDÃO, RD.; BOSCH, BJ. *et al.* Next-generation sequencing in oncology: genetic diagnosis, risk prediction and cancer classification. *Int J Mol Sci*, v. 18, n. 2, p. 308, 2017.

KAPLAN, I.; ANAVI, Y.; HIRSHBERG A. Glandular odontogenic cyst: a challenge in diagnosis and treatment. *Oral Dis*, v. 14, p. 575-581, 2008.

KAPLAN, I.; ANAVI, Y.; MANOR, R. *et al.* The use of molecular markers as an aid in the diagnosis of glandular odontogenic cyst. *Oral Oncol*, v. 41, n. 9, p. 895-902, 2005.

- KATO, S; LIPPMAN, SM.; FLAHERTY, KT. *et al.* The conundrum of Genetic “Drivers” in Benign Conditions. *J Natl Cancer Inst*, v. 108, n. 8, p. djw036, 2016.
- KIM, SA.; AHN, SG.; KIM, SG. *et al.* Investigation of the beta-catenin gene in a case of dentinogenic ghost cell tumor. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, v. 103, n. 1, p. 97-101, 2007.
- KIM, TM.; JUNG, SH.; BAEK, IP. *et al.* Regional biases in mutation screening due to intratumoural heterogeneity of prostate cancer. *J Pathol*, v. 233, n. 4, p. 425-435, 2014.
- KOHLER, N.; LIPTON, A. Platelets as a source of fibroblast growth-promoting activity. *Exp Cell Res*, v. 87, n. 2, p. 297-301, 1974.
- KUMAMOTO, H.; YAMAZAKI, S.; SATO, A. *et al.* Clear cell odontogenic tumor in the mandible: report of a case with duct-like appearances and dentinoid induction. *J Oral Pathol Med*, v. 29, n. 1, p. 43-47, 2000.
- KURPPA, KJ.; CATÓN, J.; MORGAN, PR. *et al.* High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol*, v. 232, n. 5, p. 492-498, 2014.
- LARKIN, SJ.; ANSORGE, O. Pathology and pathogenesis of craniopharyngiomas. *Pituitary*, v. 16, n. 1, p. 9-17, 2013.
- LEDGERWOOD, LG.; KUMAR, D.; ETEROVIC, AK. *et al.* The degree of intratumor mutational heterogeneity varies by primary tumor sub-site. *Oncotarget*, v. 7, n. 19, p. 185-198, 2016.
- LEPELLETIER, C.; AL-SARRAJ, Y.; BODEMER, C. *et al.* Heterozygous PDGFRB Mutation in a Three-generation Family with Autosomal Dominant Infantile Myofibromatosis. *Acta Derm Venereol*, v. 97, n. 7, p. 858-859, 2017.
- LINHARES, ND.; FREIRE, MCM.; CARDENAS, RGCCL. *et al.* Modulation of expressivity in PDGFRB-related infantile myofibromatosis: a role for PTPRG? *Genet Mol Res*, v. 13, n. 3, p. 6287-6292, 2014.
- LUCZAK, K.; NOWAK, R.; RZESZUTKO, M. Glandular Odontogenic Cyst of the Mandible Associated with Impacted Tooth - Report of a Case and Review of Literature. *Dent Med Probl*, v. 44, n. 3, p. 403-406, 2007.

- MACDONALD-JANKOWSKI, DS. Glandular odontogenic cyst: systematic review. *Dentomaxillofac Radiol*, v. 39, n.3, p. 127-139, 2010.
- MARIANO, FV.; GONDAK, RO; SCARINI, JF. *et al.* Odontogenic Carcinoma With Dentinoid in Long-Term Follow-up With 2 Recurrences. *Int J Surg Pathol*, 2019, doi: 10.1177/1066896919871662.
- MARINO-ENRIQUEZ, A.; FLETCHER, CDM. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nat Rev Cancer*, v. 14, n. 11, p. 701–702, 2014.
- MARTIGNETTI, JA.; TIAN, L.; LI, D. *et al.* Mutations in PDGFRB cause autosomaldominant infantile myofibromatosis. *Am J Hum Genet*, v. 92, n. 6, p. 1001-1007, 2013.
- MARTÍNEZ-MATA, G.; MOSQUEDA-TAYLOR, A.; CARLOS-BREGNI, R. *et al.* Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. *Oral Oncol*, v. 44, n. 6, p. 601-607, 2008.
- MCCARTHY, N.; LIU, JS.; RICHARTE, AM. *et al.* Pdgfra and Pdgfrb genetically interact during craniofacial development. *Dev dyn*, v. 245, n. 6, p. 641-642, 2016.
- MEHENDIRATTA, M.; REHANI, S; SOLOMON, MC. The histological spectrum of myxoma, myxofibroma/fibromyxoma and odontogenic fibroma – “Chicken and Egg situation”. *IOSR J Dent Med Sci*, v. 1, n. 1, p. 3-5, 2012.
- MIYAUCHI, M.; OGAWA, I.; TAKATA, T. *et al.* Clear cell odontogenic tumour: a case with induction of dentin-like structures? *J Oral Pathol Med*, v. 27, n. 5, p. 220-224, 1998.
- MOSQUEDA-TAYLOR, A.; NEVILLE BW., TATEMOTO Y. *et al.* Odontogenic carcinoma with dentinoid: a new odontogenic carcinoma. *Head Neck Pathol*, v. 8, n. 4, p. 421-431, 2014.
- MOREIRA, PR.; CARDOSO, FP.; BRITO, JA. *et al.* Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. *Braz Dent J*, v. 22, n. 5, p. 422-427, 2011.
- MOSHIRI, S.; ODA, D.; WORTHINGTON, P. *et al.* Odontogenic myxoma: histochemical and ultrastructural study. *J Oral Pathol Med*, v. 21, n. 9, p. 401-403, 1992.
- MUDRY, P.; SLABY, O.; NERADIL, J. *et al.* Case report: rapid and durable response to

PDGFR targeted therapy in a child with refractory multiple infantile myofibromatosis and a heterozygous germline mutation of the PDGFRB gene. *BMC Cancer*, v. 17, n. 1, p. 119-125, 2017.

MURRAY, N.; HANNA, B.; GRAF, N. *et al.* The spectrum of infantile myofibromatosis includes both non-penetrance and adult recurrence. *Eur J Med Genet*, v. 60, n. 7, p. 353-358, 2017.

MYNATT, CJ.; FELDMAN, KA.; THOMPSON, LDR. Orbital Infantile Myofibroma: a Case Report and Clinicopathologic Review of 24 Cases from the Literature. *Head Neck Pathol*, v. 5, n. 3, p. 205-215, 2011.

NAGASAKI, A.; OGAWA, I.; SATO, Y. *et al.* Central mucoepidermoid carcinoma arising from glandular odontogenic cyst confirmed by analysis of MAML2 rearrangement: A case report. *Pathol Int*, v. 68, n. 1, p. 31-35, 2018.

NASH, JW.; HESSEL, AC.; VIGNESWARAN, N. *et al.* Collagenous Myofibroblastic Tumor of the Mandible: Case Report of a Unique Locally Aggressive Neoplasm. *Head and Neck Pathol*, v. 4, n. 1, p. 44-48, 2010.

ODELL, EW.; ADEBIYI, K. Odontogenic myxoma/myxofibroma. In: EL-NAGGAR, AK; CHAN, JKC; GRANDIS, JR. *et al.*, eds. *World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors*. Lyon: IARC Press; 2017, p. 229-230.

OHATA, Y.; KAYAMORI, K.; YUKIMORI, A. *et al.* A lesion categorized between ghost cell odontogenic carcinoma and dentinogenic ghost cell tumor with CTNNB1 mutation. *Pathol Int*, v. 68, n. 5, p. 307-312, 2018.

OLIVIER, M.; HOLLSTEIN, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations in human cancers: origins, consequences, and clinical use. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 2, n. 1, p. a001008, 2010.

OUDIJK, L. DEN BAKKERM, MA.; HOPM, WC. *et al.* Solitary, multifocal and generalized myofibromas: clinicopathological and immunohistochemical features of 114 cases. *Histopathology*, v. 60, n. 6B, p. E1-11, 2012.

- PADAYACHEE, A.; VAN WYK, CW. Two cystic lesions with features of both the botryoid odontogenic cyst and the central mucoepidermoid tumour: Sialo-odontogenic cyst? *J Oral Pathol*, v. 16, n. 10, p. 499-504, 1987.
- PEACOCK, ZS. Controversies in Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, v. 29, n. 4, p. 475-486, 2017.
- PERDIGÃO, PF.; STERGIPOULOS, SG.; DE MARCO, L. *et al.* Molecular and immunohistochemical investigation of protein kinase a regulatory subunit type 1A (PRKAR1A) in odontogenic myxomas. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 44, n. 2, p. 204-211, 2005.
- PEREIRA, NB.; PEREIRA, KM.; COURA, BP. *et al.* BRAFV600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*, v. 45, n. 10, p. 780-785, 2016.
- PIRES, FR.; CHEN, SY.; DA CRUZ, PEREZ DE. *et al.* Cytokeratin expression in central mucoepidermoid carcinoma and glandular odontogenic cyst. *Oral Oncol*, v. 40, n. 5, p. 545-551, 2004.
- POND, D.; ARTS, FA.; MENDELSON, NJ. *et al.* A patient with germ-line gain-of function PDGFRB p.N666H mutation and marked clinical response to imatinib. *Genet Med*, v. 20, n. 1, p. 142-150, 2018.
- PUNNYA, A.; KUMAR, GS.; REKHA, K. *et al.* Primary intraosseousodontogenic carcinoma with osteoid/dentinoid formation. *J Oral Pathol Med*, v. 33, n. 2, p. 121-124, 2004.
- REGEZI, JA. Odontogenic cysts, odontogenic tumors, fibrous, and giant cell lesions of the jaws. *Mod Pathol*, v. 15, n. 3, p. 331-341, 2002.
- ROKOS, J. CARLOS, R.; ROMANACH, MJ. Clinical pathologic conference case 6: infantile myofibroma. *Head Neck Pathol*, v. 5, n. 3, p. 292-295, 2011.
- ROSKOSKI, R. The role of small molecule platelet-derived growth factor receptor (PDGFR) inhibitors in the treatment of neoplastic disorders. *Pharmacol Res*, v. 129, p. 65-83, 2018.
- ROSS, R.; GLOMSET, J.; KARIYA, B. *et al.* A platelet-dependent serum factor that stimulates the proliferation of arterial smooth muscle cells in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, v. 71, n. 4, p. 1207-1210, 1974.

- SANTOS, JN.; SOUSA, ES.; FRANÇA JA. *et al.* Next-generation sequencing of oncogenes and tumor suppressor genes in odontogenic myxomas. *J Oral Pathol Med*, v. 46, n. 10, p. 1036-1039, 2017.
- SARKAR, L.; SHARPE, PT. Expression of Wnt signalling pathway genes during tooth development. *Mech Dev*, v. 85, n. 1-2, p. 197-200, 1999.
- SAWYER, DR.; NWOKU, AL.; MOSADOMI, A. *et al.* Odontogenic carcinoma with dentinoid. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 15, n. 1, p. 105-107, 1986.
- SEMBA, I.; KITANO, M.; MIMURA, T. *et al.* Glandular odontogenic cyst: analysis of cytokeratin expression and clinicopathological features. *J Oral Pathol Med*, v. 23, n. 8, p. 377-382, 1994.
- SEKINE, S.; SATO, S.; TAKATA, T. *et al.* Beta-catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cysts, but rare in ameloblastomas. *Am J Pathol*, v. 163, n. 5, p. 1707-1712, 2003.
- SEKINE, S.; SHIBATA, T.; KOKUBU, A. *et al.* Craniopharyngiomas of adamantinomatous type harbor  $\beta$ -catenin gene mutations. *Am J Pathol*, v. 161, n. 6, p. 1997-2001, 2002.
- SIVAKUMAR, G.; KAVITHA, B.; SARASWATHI, TR. *et al.* Odontogenic myxoma of the maxilla. *Indian J Dent Res*, v. 19, n. 1, p. 62-65, 2008.
- SHAH, AA.; SANGLE, A.; BUSSARI, S. *et al.* Glandular odontogenic cyst: A diagnostic dilemma. *Indian J Dent*, v. 7, n. 1, p. 38-43, 2016.
- SHANG, S.; HUA, F.; HU, ZW. The regulation of  $\beta$ -catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget*, v. 8, n. 20, p. 33972-33989, 2017.
- SIMON, EN.; MERKX, MA, VUHAHULA, E. *et al.* Odontogenic myxoma: a clinicopathological study of 33 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 33, n. 4, p. 333-337, 2004.
- SIQUEIRA, EC.; SOUSA, SF.; FRANÇA, JA. *et al.* Targeted next-generation sequencing of glandular odontogenic cyst: a preliminary study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, v. 124, n. 5, p. 490-494, 2017.

SMITH, MH.; REITH, JD.; COHEN, DM. *et al.* An update on myofibromas and myofibromatosis affecting the oral region with report of 24 new cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, v. 124, n. 1, p. 62-75, 2017.

SOLUK-TEKKEŞİN, M.; WRIGHT, JM. The World Health Organization Classification of Odontogenic Lesions: A Summary of the Changes of the 2017 (4th) Edition. *Turk Patoloji Derg*, v. 34, n. 1, p. 1-18, 2018.

SOUSA, SF.; GOMEZ, RS.; DINIZ, MG. *et al.* Defects of the Carney complex gene (PRKAR1A) in odontogenic tumors. *Endocr Relat Cancer*, v. 22, n. 3, p. 399-408, 2015.

SOUSA, SF.; MOREIRA, RG.; GOMEZ RS. *et al.* Interrogation of cancer hotspot mutations in 50 tumour suppressor genes and oncogenes in calcifying cystic odontogenic tumour. *Oral Oncol*, v. 57, p. e1-3, 2016.

SPEIGHT, P.; FOWLER, CB.; KESSLER, H. Glandular odontogenic cyst. In: *World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours*. 4th ed. Lyon, France: WHO; 2017.

STROM, SP. Current practices and guidelines for clinical next generation sequencing oncology testing. *Cancer Biol Med*, v. 13, n. 1, p. 3-11, 2016.

SRINIVASAN, S.; CLEMENTS, JA.; BATRA, J. Single nucleotide polymorphisms in clinics: fantasy or reality for cancer? *Crit Rev Clin Lab Sci*, v. 53, n. 1, p. 29-39, 2016.

SUBRAMANIAM, SS.; HEGGIE, AA.; KUMAR, R. *et al.* Odontogenic myxoma in the paediatric patient: a review of eight cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 45, n. 12, p. 1614-1617, 2016.

SWEENEY, RT.; MCCLARY, AC.; MYERS, BR. *et al.* Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet*, v. 46, n. 7, p. 722-725, 2014.

TAGHAVI, N.; MODABBERNIA, S.; AKBARZADEH, A. *et al.* Cyclin d1 expression in odontogenic cysts. *Turk Patoloji Derg*, v. 29, n. 2, p. 101-107, 2013.

TAKATA, T.; SLOOTWEG, PJ. Odontogenic and maxillofacial bone tumours. In: EL-NAGGAR, AK.; CHAN, JKC; GRANDIS, JR, TAKATA T, Slootweg PJ, eds. *Who Classification of Head and Neck Tumours*. Lyon: IARC Press; 2017:204-260.



TOSIOS, KI.; KAKARANTZA-ANGELOPOULOU, E.; KAPRANOS, N. Immunohistochemical study of bcl-2 protein, Ki-67 antigen and p53 protein in epithelium of glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. *J Oral Pathol Med*, v. 29, n. 3, p. 139-144, 2000.

XUE, Y.; ANKALA, A.; WILCOX, WR. *et al.* Solving the molecular diagnostic testing conundrum for Mendelian disorders in the era of next-generation sequencing: single-gene, gene panel, or exome/genome sequencing. *Genet Med*, v. 17, n. 6, p. 444-451, 2015.

WALDRON, CA.; KOH, ML. Central mucoepidermoid carcinoma of the jaws: report of four cases with analysis of the literature and discussion of the relationship to mucoepidermoid, sialodontogenic, and glandular odontogenic cysts. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 48, n. 8, p. 871-877, 1990.

WELLER, JM.; KEIL, VC.; GIELEN, GH. *et al.* PDGFRB mutation-associated myofibromatosis: Response to targeted therapy with imatinib. *Am J Med Genet A*, v. 179, n. 9, p. 1895-1897, 2019.

WESTERMARK, B.; WASTESON, A. A platelet factor stimulating human normal glial cells. *Exp Cell Res*, v. 98, n. 1, p. 170-174, 1976.

WRIGHT, JM.; SOLUK, MT. Odontogenic tumors: where are we in 2017? *J Istanbul Univ Fac Dent*, v. 51, n. 3 Suppl 1, p. S10-S30, 2017.

WONG, SQ.; LI, J.; TAN, AY. *et al.* Sequence artefacts in a prospective series of formalin-fixed tumours tested for mutations in hotspot regions by massively parallel sequencing. *BMC Med Genomics*, v. 13, n. 7, p. 23, 2014.

ZHAN, T.; RINDTORF, N.; BOUTROS, M. Wnt signaling in cancer. *Oncogene*, v. 36, n. 11, p. 1461-1473, 2017.

ZHANG, L.; SUN, ZJ.; CHEN, XM. *et al.* Immunohistochemical expression of SHH, PTC, SMO and GLI1 in glandular odontogenic cysts and dentigerous cysts. *Oral Dis*, v. 16, n. 8, p. 818-822, 2010.

ZHONG, C.; SONG, H.; WEISS, A. *et al.* Myofibromatosis presenting as reticulated vascular changes and subcutaneous atrophy in patient with somatic mosaicism of PDGFRB mutation. *Br J Dermatol*, v. 179, p. 1408-1409, 2018.

# APÊNDICES

APÊNDICE A – Artigo científico com os resultados da análise molecular do cisto odontogênico glandular publicado no periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology*

Vol. 124 No. 5 November 2017

## Targeted next-generation sequencing of glandular odontogenic cyst: a preliminary study

Elisa Carvalho de Siqueira, DDS, MSc,<sup>a</sup> Silvia Ferreira de Sousa, DDS, MSc, PhD,<sup>b</sup> Josiane Alves França, BMSc, MSc,<sup>a</sup> Marina Gonçalves Diniz, BSc, MSc, PhD,<sup>c</sup> Thaís dos Santos Fontes Pereira, DDS, MSc, PhD,<sup>c</sup> Rennan Garcias Moreira, BSc, MSc,<sup>d</sup> Pablo Agustin Vargas, DDS, PhD,<sup>e</sup> Ricardo Santiago Gomez, DDS, MSc, PhD,<sup>c</sup> and Carolina Cavalieri Gomes, DDS, MSc, PhD<sup>a</sup>

**Objective.** Glandular odontogenic cyst (GOC) is an uncommon developmental cyst. Its molecular pathogenesis is unclear, and deep sequencing may help identify causative low-frequency variants in tumors. We investigated in GOC mutations in 50 genes commonly altered in human cancers.

**Study Design.** Targeted next-generation sequencing was used to interrogate a panel of approximately 2800 mutations in GOC. **Results.** Six missense single nucleotide variations (SNVs) were reported. Three SNVs (*TP53* rs1042522, *KDR* rs1870377, and *KIT* rs3822214) are listed as “common single-nucleotide polymorphisms” at the UCSC Genome Browser. The other SNVs (*PIK3CA* p.Glu689Lys, *PIK3CA* p.Ala708Thr, and *TP53* p.Leu289Phe) are predicted to have deleterious or damaging effects on proteins, but they showed very low frequency in our samples and could not be further validated by orthogonal methods.

**Conclusions.** No pathogenic SNV was detected in this cohort of GOCs. Further studies with larger gene panels or whole exome sequencing are needed to find the genetic basis of GOC. (*Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2017;124:490–494)

Glandular odontogenic cyst (GOC) is an uncommon developmental cyst, which accounts for less than 0.5% of all odontogenic cysts.<sup>1</sup> It was first reported in 1987, and in 1988, the term *glandular odontogenic cyst* was suggested for the first time.<sup>2,3</sup> GOC occurs more frequently in the mandible, and it has a marked propensity to recur.<sup>4,5</sup>

GOC shows epithelial features with glandular differentiation and is thought to arise from the remnants of the dental lamina.<sup>4</sup> Specific microscopic criteria for the diagnosis of GOC have been reported.<sup>6</sup> GOC shares microscopic similarities with intraosseous mucoepidermoid carcinoma, making the diagnosis by incisional biopsy challenging. Currently, these 2 entities are regarded as different lesions, considering the differences in cytokeratin expression profiles, as well as the lack of the *MAML2* gene rearrangements in GOC.<sup>7,8</sup>

Other molecular markers, such as ki67 and p53 immunohistochemical positivity, have been tested as diagnostic tools to distinguish low-grade mucoepidermoid carcinoma and GOC, but this approach did not prove to be very effective.<sup>9</sup>

Molecular alterations in GOC are rarely investigated, and its molecular pathogenesis remains unclear. No *PTCH* gene mutation has been found in GOC, in contrast to odontogenic keratocyst.<sup>10</sup> In this context, next-generation sequencing (NGS) is a valuable tool to simultaneously interrogate several genetic mutations in rare samples, and we used this technology to investigate hundreds of cancer hotspot mutations in GOC. We used a panel to target cancer hotspot mutations, including 2856 previously described somatic mutations in 50 oncogenes and tumor suppressor genes.

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brazil; and Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil. R.S.G., C.C.G., S.F.S., and J.A.F. are research fellows at CNPq, Brazil. E.C.S. is a research fellow at Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Brazil.

<sup>a</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais—UFMG, Belo Horizonte, Brazil

<sup>b</sup>Department of Dentistry, Health, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Sergipe—UFS, Aracaju, Brazil

<sup>c</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais—UFMG, Belo Horizonte, Brazil

<sup>d</sup>Genomics Laboratory, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais—UFMG, Belo Horizonte, Brazil

<sup>e</sup>Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, Universidade Estadual de Campinas—Unicamp, Piracicaba, Brazil.

Received for publication Jun 6, 2017; returned for revision Jul 5, 2017; accepted for publication Jul 13, 2017.

© 2017 Elsevier Inc. All rights reserved.

2212-4403/\$ - see front matter

<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2017.07.001>

## MATERIALS AND METHODS

### Samples selection and DNA isolation

A convenience sample of 7 formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) specimens of GOC, with sufficient lesional material, were retrieved from the files of the oral pathology service of the authors' institutions. All the samples fulfilled the criteria for GOC diagnosis.<sup>6</sup> The study was approved by the university ethics committee

## Statement of Clinical Relevance

A panel of 50 oncogenes and tumor suppressor genes in glandular odontogenic cysts were subjected to deep sequencing, revealing six missense single nucleotide variants. None of these variants is a known pathogenic variant.

## **CTNNB1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid**

Rogério Oliveira Gondak, DDS, PhD,<sup>a</sup> Fernanda Viviane Mariano, DDS, PhD,<sup>b</sup> Sílvia Ferreira de Sousa, DDS, PhD,<sup>c</sup> Elisa Carvalho de Siqueira, DDS, MSc,<sup>d</sup> Katya Pulido Díaz, DDS, PhD,<sup>e</sup> Leandro Aurélio Liporoni Martins, DDS, PhD,<sup>f</sup> Albina Altemani, DDS, PhD,<sup>b</sup> Adalberto Mosqueda-Taylor, DDS, PhD,<sup>g</sup> Ricardo Santiago Gomez, DDS, PhD,<sup>c</sup> and Carolina Cavalieri Gomes, DDS, PhD<sup>d</sup>

The purpose of the present study is to report 2 cases of odontogenic carcinoma with dentinoid, a rare low-grade odontogenic carcinoma associated with facial deformity and bone loss, and to investigate the presence of pathogenic mutations in these samples. By using a next-generation sequencing approach, we sequenced a panel of 50 oncogenes and tumor suppressor genes commonly mutated in human cancer. Microscopic features of both cases revealed solid areas of malignant odontogenic tumor with a large amount of dentinoid material. We identified pathogenic mutations in the genes *CTNNB1* and *APC*, both of which are part of the Wnt-signaling pathway. Consistent with Wnt-signaling activation, both tumors showed strong  $\beta$ -catenin accumulation in the cytoplasm and in the nuclei. The molecular profile of odontogenic carcinoma with dentinoid may help in its diagnosis, as well as in the identification of potential molecular targets for therapy in the future. (Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol 2019;000:e1–e8)

Odontogenic carcinoma with dentinoid (OCD) is a rare low-grade odontogenic carcinoma that is histopathologically characterized by the presence of cords and sheets of epithelial cells with eosinophilic, pale, or clear cytoplasm associated with dentinoid material in a slightly or mature myxoid connective stroma.<sup>1,2</sup> OCD has variable proliferative index but is locally destructive and may exhibit perineural invasion.<sup>3</sup>

The epithelium in OCD does not produce buds or enamel organ-like structures, such as those found in ameloblastic fibrodentinoma, and this tumor does not contain a mesenchymal-like connective tissue

resembling dental papilla, as observed in several mixed odontogenic tumors.<sup>3</sup> We identified 9 reported cases fitting the OCD histopathologic criteria, and mean age at diagnosis was the fourth decade of life, with 6 cases reported in the mandible and 6 in the maxilla.<sup>3</sup> All cases showed evidence of tumor infiltration into adjacent tissues and deposits of dentinoid material.<sup>1,7</sup>

In 2017, the World Health Organization classification of odontogenic and maxillofacial bone tumors included 5 types of odontogenic carcinomas, 1 odontogenic carcinosarcoma, and 1 odontogenic sarcoma.<sup>8</sup> However, this classification did not recognize other malignant odontogenic tumors that may produce dentinoid.

Here, we report 2 cases of OCD that we received for consultation. All data from these cases were retrospectively retrieved. In addition to reporting the cases, we discuss their molecular profile, as revealed by next-generation sequencing (NGS) of a panel of cancer-associated genes.

### **CASE REPORT**

#### **Case 1**

A 43-year-old man presented with a painless slow growing mass in the anterior part of the left maxilla, measuring 5 × 4 cm. The patient had a previous history of tumor resection in the same area 2 years earlier. Computed tomography scan revealed that the tumor had invaded the nasal cavity and the maxillary sinus (Figure 1A) and had well-defined limits with no mineralized tissue deposition. According to the pathologic report of the first surgery, the diagnosis was of pleomorphic adenoma. With the clinical diagnosis of recurrent benign tumor, the patient underwent left maxillectomy. A histopathologic diagnosis of malignant odontogenic tumor was reached, and the patient was referred to an

This work was supported by grants from the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) in Brazil, the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES; grant number 1) in Brazil, and the Foundation for Research Support of the State of São Paulo (FAPESP) and of the State of Minas Gerais (FAPEMIG). C.C.G. and R.S.G. are research fellows at CNPq.

<sup>a</sup>Department of Pathology, Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), Santa Catarina, Brazil.

<sup>b</sup>Department of Pathological Anatomy, University Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil.

<sup>c</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

<sup>d</sup>Department of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

<sup>e</sup>Universidad Autónoma de Baja California, Tijuana, Baja California, Mexico.

<sup>f</sup>Department of Pathological Anatomy, Universidade de São Paulo (USP), São Paulo, Brazil.

<sup>g</sup>Department of Health Care, Metropolitan Autonomous University, Mexico City, Mexico.

Received for publication Mar 14, 2019; returned for revision Jul 30, 2019; accepted for publication Aug 25, 2019.

© 2019 Elsevier Inc. All rights reserved.

2212-4403/\$-see front matter

<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.08.017>

APÊNDICE C – Artigo científico com os resultados da análise molecular do mixoma odontogênico aceito para publicação no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*

**Odontogenic myxomas lack *PDGFRB* mutations reported in myofibromas**

**Running title: Odontogenic myxomas lack PDGFRB mutations**

Elisa Carvalho de Siqueira<sup>1</sup>

Silvia Ferreira de Sousa<sup>2</sup>

Roman Carlos<sup>3</sup>

Bruno Augusto Benevenuto de Andrade<sup>4</sup>

Mário José Romãnach<sup>4</sup>

Ricardo Santiago Gomez<sup>\*2</sup>

Carolina Cavaliéri Gomes<sup>\*1</sup>

<sup>1</sup>Departament of Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

<sup>2</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

<sup>3</sup>Departament of Pathology, Hospital Herrera-Llerandi/AMEDESGUA, Guatemala City, Guatemala.

<sup>4</sup>Departament of Oral Diagnosis and Pathology, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil.

**Corresponding authors:**

\*Carolina Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte - MG, Brazil. CEP: 31270-901 Phone: +55 31 3409.2895

Email: [carolinacgomes@ufmg.br](mailto:carolinacgomes@ufmg.br)