

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

Juliana Cristina de Souza

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE MIXOMA ODONTOGÊNICO**

Belo Horizonte  
2021

Juliana Cristina de Souza

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO *IN VIVO* E *IN VITRO* DE MIXOMA ODONTOGÊNICO**

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

Orientadora: Prof. Dra. Carolina Cavaliéri Gomes

Coorientadora: Dra. Núbia Braga Pereira

Belo Horizonte

2021

Souza, Juliana Cristina de.

SO729e Estabelecimento e caracterização de um modelo in vivo e in vitro de mixoma odontogênico [manuscrito]. / Juliana Cristina de Souza. -- Belo Horizonte: 2021. 68f. il.

Orientador (a): Carolina Cavaliéri Gomes.

Coorientador (a): Núbia Braga Pereira.

Área de concentração: Medicina Molecular.

Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina.

1. Mixoma. 2. Assunto. 3. Quinases de Proteína Quinase Ativadas por Mitógeno. 4. Terapia de Alvo Molecular. 5. Xenoenxertos. 6. Técnicas de Cultura de Células. 7. Dissertação Acadêmica. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Pereira, Núbia Braga. III. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. IV. Título.

NLM: QZ 340

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



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

### FOLHA DE APROVAÇÃO

#### ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE UM MODELO IN VIVO E IN VITRO DE MIXOMA ODONTOGÊNICO

**JULIANA CRISTINA DE SOUZA**

Dissertação de Mestrado defendida e aprovada, no dia três de maio de dois mil e vinte e um, pela Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Molecular da Universidade Federal de Minas Gerais constituída pelas seguintes professoras:

**Carolina Cavaliéri Gomes - Orientadora**  
UFMG

**Nubia Braga Pereira - Coorientadora**  
UFMG

**Adriana Abalen Martins Dias**  
UFMG

**Karuzza Maria Alves Pereira**  
UFC

Belo Horizonte, 03 de maio de 2021.



Documento assinado eletronicamente por **Karuzza Maria Alves Pereira, Usuário Externo**, em 03/05/2021, às 18:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Adriana Abalen Martins Dias, Professora do Magistério Superior**, em 03/05/2021, às 21:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavaliéri Gomes, Professora do Magistério Superior**, em 04/05/2021, às 10:57, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Nubia Braga Pereira Lourenco, Membro**, em 04/05/2021, às 19:03, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **0700803** e o código CRC **6E132CEC**.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me abençoar e me dar forças.

Ao meu pai Márcio (*in memoriam*), por ser um referencial de ser humano justo e honesto, pelos valores ensinados e por investir na minha educação.

À minha mãe Doralice, por não medir esforços para que eu pudesse dar conta de tudo e pelo apoio essencial nas minhas decisões.

Ao meu namorado e melhor amigo Rogério, por todo carinho e amparo ofertado e por sempre acreditar em mim.

Aos meus sogros, Sandra e Rogério, por me acolherem como uma segunda filha.

A todos os amigos e familiares, pela torcida.

À minha orientadora Carolina Cavaliéri Gomes, por ser fonte de inspiração de como ser uma excelente professora e pesquisadora.

À minha co-orientadora Núbia Braga Pereira, por ser uma “mãe científica” para mim e por todos os ensinamentos fornecidos.

À professora Adriana Abalen e à professora Gleide Avelar, pela colaboração e por serem referência na área de experimentação animal para mim.

Ao Victor Coutinho, pelos ensinamentos sobre a cultura celular e por sanar minhas dúvidas de forma solícita.

À professora Marina Diniz, que auxiliou nos ensaios com os inibidores de MEK utilizado nesse estudo e no *western blot*.

À Jéssica Gardone, pela ajuda com a execução da técnica de *western blot*.

Ao professor Ricardo Gomez, que dedicou seu tempo para ajudar com as análises imunohistoquímicas e histopatológicas.

Ao professor Gregory Kitten, por fornecer gentilmente a solução de colágeno para os *scaffolds* de colágeno tipo I.

Aos colegas e professores do Laboratório de Biologia Integrativa (Instituto de Ciências Biológicas - UFMG) e do Laboratório de Patologia Molecular (Faculdade de Odontologia - UFMG), pela troca de conhecimentos e pelos momentos de descontração.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Buco-Maxilofacial (FaO-UFMG), pela ajuda com a montagem das lâminas.

Ao Centro de Aquisição de Imagens (CAPI-ICB/UFMG), pela digitalização das lâminas e agilidade no serviço.

Às agências de fomento CAPES, CNPq e FAPEMIG, pelos recursos fornecidos para a realização e conclusão desse projeto. Em especial, ao CNPq pela concessão de uma bolsa de estudos para que eu me dedicasse exclusivamente ao mestrado.

## RESUMO

O mixoma odontogênico (MO) é uma neoplasia intraóssea benigna rara que apesar de ser benigna, possui comportamento biológico agressivo e é localmente infiltrativa, o que pode causar deformidades faciais e impactar a qualidade de vida dos pacientes. Além disso, apesar de inúmeros estudos terem sido realizados, a patogênese desse tumor ainda não foi completamente elucidada. Os tratamentos cirúrgicos conservadores para o MO estão associados ao aumento da probabilidade de recidivas. Coletivamente, todas essas questões fazem com que novas terapias alternativas aos tratamentos convencionais sejam necessárias. A via de sinalização MAPK/ERK regula processos celulares como proliferação, diferenciação e sobrevivência das células e está constitutivamente ativada em várias neoplasias, inclusive nas de origem odontogênica. Com isso, pretendeu-se avaliar se essa via estava ativada em amostras de MO por meio de reações de imunohistoquímica direcionadas à pERK1/2. Como todas as amostras mostraram forte imunoexpressão de pERK1/2, foi proposto o estabelecimento de um modelo de cultura organotípica 3D e de xenoenxerto derivado de paciente (do inglês *patient-derived xenograft model, PDX*) de MO, a fim de testar os efeitos de inibição da via por meio do inibidor de MEK, U0126. Houve diminuição no *fold-change* de pERK1/2/ERK1/2 nas amostras *in vitro* tratadas com o inibidor de MEK U0126, indicando inibição da ativação da via MAPK/ERK com o fármaco. Consistente com os resultados da cultura celular, houve redução do volume tumoral no modelo *in vivo* tratado com o U0126 quando comparado com o grupo controle. Constatou-se a manutenção da histologia do tumor primário nas amostras de MO, tratadas e não tratadas, que foram utilizadas para estabelecer os modelos em questão. Os tumores mantidos no modelo de PDX mostraram, microscopicamente, a presença de capilares sanguíneos permeando as células neoplásicas. Levantou-se então, a hipótese de que eles seriam provenientes do camundongo utilizado no modelo de PDX, pois macroscopicamente observou-se um aumento da vascularização ao redor dos fragmentos de MO. Porém, reações de imunohistoquímica para o complexo principal de histocompatibilidade de classe 1 (do inglês *major histocompatibility complex class 1, MHC 1*) humano (HLA ABC) e murino (H2Db) mostraram imunoexpressão apenas para o MHC humano (do paciente). Conclui-se que os modelos *in vitro* e *in vivo* estabelecidos são bons modelos para o estudo do MO, por demonstrarem boa reprodutibilidade das características histológicas primárias do tumor e, que os resultados obtidos são promissores para a terapia alternativa pré-clínica direcionada ao MO.

**Palavras-chave:** Mixoma odontogênico. Via das MAPKs. Inibição de MEK. Terapia alvo. Modelo de xenoenxerto derivado de paciente. Cultura celular 3D.

## ABSTRACT

Odontogenic myxoma (OM) is a rare intraosseous neoplasm. Despite being benign, OM has an aggressive behavior and is locally infiltrative, which can cause facial deformities and impact patient's quality of life. In addition, although many studies have been carried out, the pathogenesis of this tumor has not yet been fully elucidated. Conservative surgical treatments are associated with an increased probability of recurrences. Collectively, all these facts make new therapies options necessary. The MAPK/ERK pathway regulates cellular processes such as cell proliferation, differentiation and survival and it is constitutively activated in several neoplasms, including those of odontogenic origin. Thus, we aimed to assess whether this pathway is activated in OM samples; for this purpose, immunohistochemistry reactions were performed for pERK1/2. As all samples evaluated showed strong pERK1/2 immunoexpression, it was proposed to establish a 3D organotypic culture model and a patient-derived xenograft model for OM to test the effects of MAPK/ERK pathway inhibition by means of the MEK inhibitor, U0126. There was a decrease in *perk1/2/ERK1/2 fold-change* in samples *in vitro* treated with MEK inhibitor U0126, indicating that occurred the inhibition of MAPK pathway activation. Consistent with the cell culture results, there was a shrinkage of the tumor volume in the *in vivo* model treated with U0126 when compared to the control group. The histology of the primary tumor was maintained in the treated and untreated OM samples that were used to establish both models. The tumors maintained in the PDX model showed, microscopically, the presence of blood capillaries between neoplastic cells. Then, it was hypothesized that they were derived from the mouse used in the PDX model, as, macroscopically, an increase in vascularization around the OM fragments was observed. However, immunohistochemistry reactions for the major histocompatibility complex class 1 (MHC 1) of human (HLA ABC) and mouse (H2Db) showed immunoexpression only for the patient's MHC 1. In conclusion, the *in vitro* and *in vivo* models established are good models for the study of OM, as they demonstrate good reproducibility of the primary features of the tumor and, the results obtained are promising for a preclinical frame for OM-targeted therapy.

**Keywords:** Odontogenic myxomas. MAPK pathway. MEK inhibition. Targeted therapy. Patient-derived xenograft model. 3D cell culture.



## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Bcl-x	Do inglês <i>B-cell lymphoma extra large</i>
Bcl-2	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i>
<i>BRAF</i>	Do inglês <i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CD34	Do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i>
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
cm	Centímetros
DAB	Diaminobenzidina
DMEM	Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimetilsufóxido
DNMTs	Do inglês <i>DNA methyltransferases</i>
EPI	Equipamento de Proteção Individual
ERK1/2	Do inglês <i>extracellular-signal-regulated kinase</i>
FaO	Faculdade de Odontologia
FFPE	Do inglês <i>formalin-fixed paraffin-embedded</i>
<i>Foxn1</i>	Do inglês <i>Forkhead Box N1</i>
<i>GNAS</i>	Do inglês <i>GNAS complex locus</i>
HE	Hematoxilina-eosina
<i>HMGA2</i>	Do inglês <i>High Mobility Group AT-Hook 2</i>
<i>HRAS</i>	Do inglês <i>HRas proto-oncogene, GTPase</i>
ICB	Instituto de Ciências Biológicas

<i>KRAS</i>	Do inglês <i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
M	Molar
mA	miliampère
MAPK	Do inglês <i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MEC	Matriz extracelular
MEK	Do inglês <i>mitogen-activated protein kinase kinase</i>
mg	Miligrama
µg	Micrograma
MHC 1	Do inglês <i>Major Histocompatibility Complex class 1</i>
mL	Mililitro
µL	Microlitro
mm	Milímetro
µm	Micrômetro
µmol	Micromol
mM	Micromolar
MMPs	Metaloproteinases
MO	Mixoma odontogênico
nm	Nanômetro
<i>NRAS</i>	Do inglês <i>NRAS proto-oncogene, GTPase</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPG	Osteoprotegerina
ORM-1	Do inglês <i>orosomuroid-1 protein</i>

PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i>
<i>PDGFRB</i>	Do inglês <i>platelet derived growth fator receptor beta</i>
PDX	Do inglês <i>patient-derived xenograft</i>
PKA	Do inglês <i>cAMP-dependent protein kinase A</i>
<i>PRKARIA</i>	Do inglês <i>protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha</i>
<i>P27</i>	Do inglês <i>cyclin-dependent kinase inhibitor 1B</i>
<i>P53</i>	Do inglês <i>tumor protein p53</i>
RANK	Do inglês <i>receptor activator of nuclear fator kappa B</i>
RANKL	Do inglês <i>receptor activator of nuclear fator kappa B ligand</i>
<i>RB1</i>	Do inglês <i>RB transcriptional corepressor 1</i>
SFB	Soro Fetal Bovino
Sirpa	Do inglês <i>signal-regulatory protein alpha</i>
SPF	Do inglês <i>Specific-Pathogen Free</i>
TCL	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TOA	Tumor Odontogênico Adenomatoide
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V	Volt
VEGF-A	Do inglês <i>Vascular Endothelial Growth Factor A</i>

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	16
	<b>2.1 Mixoma Odontogênico</b> .....	16
	2.1.1 – <i>Características clínicas, radiográficas e microscópicas</i> .....	17
	2.1.2 <i>Comportamento biológico</i> .....	18
	2.1.3 <i>Patogênese e alterações moleculares</i> .....	19
	<b>2.2 Via de sinalização das MAPK</b> .....	21
	<b>2.3 Modelo de cultura organotípica 3D</b> .....	23
	<b>2.4 Modelo de xenoenxerto derivado de paciente</b> .....	24
3	OBJETIVOS .....	27
	<b>3.1 Objetivo geral</b> .....	27
	<b>3.2 Objetivos específicos</b> .....	27
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
	<b>4.1 Aspectos éticos</b> .....	29
	<b>4.2 Seleção das amostras</b> .....	29
	<b>4.3 Avaliação da pERK1/2 por imunohistoquímica</b> .....	29
	<b>4.4 Coleta da amostra fresca</b> .....	30
	<b>4.5 Camundongos NUDE</b> .....	31
	<b>4.5 Estabelecimento do PDX e inibição da MEK</b> .....	31
	<b>4.6 Estabelecimento da cultura celular tridimensional e inibição da MEK</b> .....	33
	<b>4.7 Avaliação da inibição de MEK por U0126 na cultura 3D</b> .....	34
	4.7.1 <i>Incubação com LIVE/DEAD®</i> .....	34
	4.7.2 <i>Western blot</i> .....	34
	<b>4.8 Imunohistoquímica para imunocomplexo humano (HLA ABC) e murino (H2Db)</b> .....	36
5	RESULTADOS .....	37
	<b>5.1 Caracterização das amostras</b> .....	37
	<b>5.2 Avaliação de pERK 1/2 por imunohistoquímica</b> .....	39
	<b>5.3 Estabelecimento do PDX e inibição da MEK</b> .....	39
	<b>5.4 Estabelecimento da cultura organotípica 3D e inibição da MEK</b> .....	41
	<b>5.5 Avaliação do imunocomplexo humano (HLA) e murino (H2Db) por imunohistoquímica</b> .....	42

6 DISCUSSÃO .....	43
CONCLUSÃO .....	47
REFERÊNCIAS .....	48
APÊNDICES .....	61
<b>Apêndice A</b> – Artigo científico de revisão publicado no periódico <i>Experimental and Molecular Pathology</i> englobando diversos tipos de neoplasias benignas para as quais já foram gerados modelos de PDX .....	61
<b>Apêndice B</b> – Parecer N° 1.295.542 .....	62
<b>Apêndice C</b> – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE).....	63
<b>Apêndice C.1</b> – TALE para menores de idade .....	63
<b>Apêndice C.2</b> – TCLE destinado ao responsável por menor de idade (inferior a 6 anos) .....	64
<b>Apêndice C.3</b> – TCLE destinado ao responsável por menor de idade (7 a 12 anos)...	65
<b>Apêndice C.4</b> – TCLE destinado ao responsável por adolescentes (14 a 18 anos) .....	66
<b>Apêndice C.5</b> – TCLE destinado a indivíduos maiores de 18 anos.....	67
<b>Apêndice D</b> – Artigo científico publicado no periódico <i>Clinical Oral Investigations</i> com os resultados obtidos nesse projeto. ....	68

## 1 INTRODUÇÃO

O mixoma odontogênico (MO) é uma neoplasia intraóssea benigna rara, que corresponde de 0,5 a 17,7% de todos os tumores odontogênicos e que acomete as regiões da maxila e mandíbula, sendo esta última o local mais comum de ocorrência (BANASSER *et al.*, 2020; ODELL; ADEBIYI, 2017). Apesar de ser benigno e possuir crescimento lento, o MO é localmente agressivo e infiltrativo, com capacidade de causar a expansão das tábuas corticais, mobilidade dos dentes e reabsorção da raiz dentária, o que pode causar deformidades faciais. Além disso, o tumor pode recidivar, sendo que a modalidade de tratamento pode influenciar nas taxas de recidiva da lesão (CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019). O MO acomete indivíduos principalmente entre a segunda e a quarta década de vida e a sua origem está relacionada ao ectomesênquima de um dente em desenvolvimento, possuindo similaridade histológica com a polpa dental (ODELL; ADEBIYI, 2017; CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019). Histopatologicamente, essa lesão é caracterizada pela proliferação de células fusiformes e de arranjo estrelado dispersas em uma matriz mixoide frouxa (ODELL; ADEBIYI, 2017).

Do ponto de vista molecular, alguns estudos envolvendo o MO foram desenvolvidos, porém a patogênese completa desse tumor não foi completamente elucidada. A presença de mutações no gene *PRKARIA* (inglês *protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha*), além de microduplicações no cromossomo 1q21 foram relatadas em 2/17 e em 1/1 casos, respectivamente (PERDIGÃO *et al.*, 2005, BEST-ROCHA *et al.*, 2016). Em relação aos mecanismos de invasão tumoral, teorias foram propostas baseadas em expressão de metaloproteinases (MMPs) e de proteínas antiapoptóticas nos MO (GOMES *et al.*, 2011). Recentemente, utilizando-se sequenciamento de nova geração, foi avaliado em amostras de MO, um painel de 2.800 mutações em genes supressores de tumor e oncogenes comumente encontradas em câncer humano, porém nenhuma mutação recorrente foi reportada (SANTOS *et al.*, 2017).

Diante desse cenário, e considerando que o tratamento cirúrgico do MO em indivíduos que, por vezes, são tão jovens, pode trazer consigo comprometimento funcional para os pacientes, o estabelecimento de modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* são importantes para desenvolver ensaios pré-clínicos. Tais modelos fornecem condições semelhantes ao microambiente tumoral do tumor primário, além de favorecer a compreensão da patogênese molecular das lesões (PRIOLO *et al.*, 2010, BASTOS *et al.*, 2019, PEREIRA *et al.*, 2019).

Sabe-se que a via de sinalização MAPK/ERK (do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases*) tem um papel importante na regulação da proliferação celular e é comumente ativada em algumas neoplasias, incluindo outros tumores odontogênicos, como ameloblastomas e tumor odontogênico adenomatóide (TOA) (DINIZ *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019). Essa cascata de sinalização pode ser indiretamente ativada por outros genes. Além disso, a ativação de ERK1/2 por fosforilação (do inglês *extracellular-signal-regulated kinase*), é necessária para a progressão do ciclo celular da fase G1-S, foi descrita em tumores em que não havia mutação de genes da via MAPK/ERK (MELOCHE; POUYSSÉGUR, 2007; PLOTNIKOV *et al.*, 2011).

Pôde-se observar macroscopicamente, por meio do modelo xenotransplantável de MO, um aumento da vascularização ao redor do xenoenxerto. Ademais, os vasos sanguíneos estavam hiperemiados. Após a remoção do tumor e processamento para uma análise microscópica, observou-se a presença de capilares sanguíneos permeando as células neoplásicas. Seriam as células que formam esses capilares provenientes do camundongo? Ou seriam do próprio tumor primário? Para responder essas questões, foram feitas reações imunohistoquímicas envolvendo anticorpos anti-complexo principal de histocompatibilidade classe I (do inglês *Major Histocompatibility Complex class I*, MHC I) humano (HLA ABC) e murino (H2Db).

Diante do exposto nos parágrafos acima, o presente trabalho teve como objetivo o estabelecimento de um modelo de xenoenxerto (do inglês *patient-derived xenograft model*, PDX) e de cultura celular tridimensional de MO. Além disso, pretendeu-se testar se a via de sinalização MAPK/ERK estava ativada em amostras desse tumor e, em caso positivo, sugerir uma potencial terapia-alvo alternativa para os casos mais agressivos e recorrentes.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 *Mixoma Odontogênico*

Os tumores odontogênicos constituem um grupo heterogêneo de lesões de comportamento clínico e histopatológico diversos, variando em natureza de hamartomas à lesões malignas. Eles desenvolvem-se dentro dos ossos gnáticos (tumores centrais) ou próximos ao periodonto (tumores periféricos) (WRIGHT; SOLUK, 2017). De acordo com a última classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2017, os tumores odontogênicos são categorizados, primeiramente, em duas categorias, são elas: lesões benignas e malignas. Em seguida, eles são classificados de acordo com a sua origem tecidual em: tumores odontogênicos epiteliais, mesênquimais ou mistos (SIVAPATHASUNDHARAM *et al.*, 2019).

O MO é uma neoplasia intraóssea benigna rara e, dentre os tumores odontogênicos, é a terceira lesão mais frequente depois de odontomas e ameloblastomas (ODELL; ADEBIYI, 2017). A estimativa de prevalência desse tumor varia de 0,5 a 17,7% dentre todos os tumores odontogênicos (BANASSER *et al.*, 2020), com uma incidência de aproximadamente 0.07 novos casos por milhão de pessoas por ano na população da Tanzânia (SIMON *et al.*, 2004). Chrcanovic e Gomez (2019) realizaram uma análise sistemática de 1.692 casos de MO reportados na literatura e chegaram à conclusão de que a lesão é mais prevalente em mulheres do que em homens em uma proporção de 1,36:1. Além disso, eles inferiram que o MO é mais prevalente na mandíbula em comparação com a maxila, e na região posterior em detrimento da anterior (CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019).

A provável origem do MO são células do mesênquima odontogênico, como fibroblastos e miofibroblastos. Levando isso em consideração, Fujita e colaboradores (2006) realizaram estudos imunohistoquímicos com um anticorpo anti-nestina, que é um marcador de células tronco neurais, em 9 amostras de MO. A hipótese a ser testada era a seguinte: se a origem do MO estivesse relacionada às células mesênquimais, haveria reatividade positiva, uma vez que o tecido mesênquimal odontogênico deriva da crista neural. Como consequência, a expressão de nestina foi reportada em quase metade das amostras (FUJITA *et al.*, 2006). A ausência de imunexpressão nas outras amostras pode estar relacionada a fatores pré-analíticos da técnica como a má fixação e processamento inadequado do material.

Embora o MO possa apresentar-se em qualquer idade, ele é mais frequentemente diagnosticado entre a segunda e a quarta década de vida (KAFFE *et al.*, 1997, CHRCANOVIC;



GOMEZ, 2019), sendo ocasionalmente identificado em exames radiográficos de rotina, frequentemente como achados incidentais (JOHNSON *et al.*, 2014).

### 2.1.1 – Características clínicas, radiográficas e microscópicas

Radiograficamente, o MO exhibe aparência radiolúcida uni ou multilocular. As margens podem variar de bordas definidas e corticadas à mal definidas com margens recortadas (BANASSER *et al.*, 2020). Sendo assim, seus limites clínico-radiológicos podem, aparentemente, não representar os verdadeiros limites do tumor (SIMON *et al.*, 2004). Uma característica radiográfica do MO é a presença de trabéculas finas de ossos residuais que dão a aparência típica de “raquete de tênis”. Além disso, o tumor pode exibir formas que lembram “bolhas de sabão” e “favos de mel” (TAKATA; SLOOTWEG, 2017; BANASSER *et al.*, 2020), porém essas características não são muito comuns (CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019).

Clinicamente, o MO demonstra ser uma lesão assintomática de crescimento lento e progressão expansiva, porém quando os sintomas existem, eles variam de desconforto e dor até parestesia (SIMON *et al.*, 2004; BANASSER *et al.*, 2020).

A examinação macroscópica do MO revela um tumor de aparência branca-acinzentada ou branca opalescente e sua textura é de consistência variável, com uma superfície de corte gelatinosa (BATSAKIS, 1987; SHIVASHANKARA *et al.*, 2017).

O MO possui similaridade histológica com a polpa dentária, mas a ausência de odontoblastos na periferia da lesão juntamente com as características radiográficas do tumor fornecem um diagnóstico diferencial (GODISHALA SWAMY *et al.*, 2018).

Histopatologicamente, o MO é caracterizado pela presença de células estreladas e fusiformes, sendo elas de origem fibroblástica-histiocítica, dispersas em uma matriz extracelular mixoide composta por glicosaminoglicanos, como o sulfato de condroitina e o ácido hialurônico, e por proteoglicanos, como o versicano. Quando uma quantidade maior de colágeno é evidente, o termo “mixofibroma odontogênico” pode ser usado (ODELL; ADEBIYI, 2017, TAKAHASHI *et al.*, 1991, ZHAO *et al.*, 1999). Além disso, pequenas ilhas de remanescentes de epitélio odontogênico inativo podem ser observados nas lâminas histológicas (TAKATA; SLOOTWEG, 2017), porém a presença delas não é necessária para o diagnóstico (TAKAHASHI *et al.*, 1991). A detecção de sulfato de heparano, um inibidor da síntese de DNA, foi observada nessas ilhas, confirmando o fato de que essas células estão na sua forma inativa (ZHAO *et al.*, 1999).

Segundo Bologna-Molina e colaboradores (2015), a viscosidade estrutural do MO pode estar associada à presença da proteína de fase aguda ORM-1 (do inglês *orosomuroid-1 protein*).

Ademais, os resultados desse estudo sugerem uma associação estatisticamente significativa entre o fator de crescimento VEGF-A (do inglês *Vascular Endothelial Growth Factor A*) e a ORM-1, que pode influenciar o crescimento tumoral através da angiogênese (BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2015).

O tratamento de escolha do MO varia de excisão conservativa à ressecção cirúrgica, dependendo do tamanho da lesão (SIMON *et al.*, 2004), o que influencia significativamente a taxa de recidiva (BANASSER *et al.*, 2020). Após a excisão cirúrgica é recomendado um acompanhamento a longo prazo (KANSY *et al.*, 2012).

### 2.1.2 Comportamento biológico

Apesar de ser benigno, o MO é localmente agressivo e infiltrativo. A maioria dos casos apresenta perfuração das tábuas corticais e mobilidade e/ou não erupção dos dentes devido ao crescimento do tumor. Além disso, há a possibilidade de ocorrer reabsorção da raiz dentária de um dente adjacente (CHRCANOVIC; GOMEZ, 2019). Tais características clínicas podem causar deformidades faciais e prejuízos funcionais e estéticos para os pacientes. Não há consenso em relação aos mecanismos de invasividade do MO (GOMES *et al.*, 2011), porém alguns estudos imunohistoquímicos foram realizados a fim de indicar possíveis candidatos envolvidos no comportamento agressivo dessa lesão.

A invasão dos tecidos ósseos adjacentes por neoplasias benignas afeta o equilíbrio entre a reabsorção e aposição de matriz óssea. Nesse sentido, Andrade e colaboradores (2008) avaliaram a ativação da atividade osteoclástica por meio da imunexpressão do sistema RANK/RANKL/OPG em amostras de MO e constataram que a maioria delas exibiu uma maior quantidade de RANKL do que OPG. Esse resultado pode explicar a natureza infiltrativa do MO (ANDRADE *et al.*, 2008). Paralelamente, um outro estudo verificou que tumores de até 3cm expressaram menos OPG e RANKL e sugeriram que a medida que o tamanho da lesão aumenta, a atividade osteoclástica tende a aumentar também (GONZÁLEZ-GALVÁN *et al.*, 2018).

Metaloproteinases (MMPs) são enzimas dependente de zinco que podem degradar componentes estruturais da matriz extracelular (MEC), o que facilita a invasão das células tumorais através de tecidos “normais” (MIYAGI *et al.*, 2008). De acordo com essa constatação, estudos inferiram que as MMPs 1, 2 e 9 podem estar relacionadas ao comportamento agressivo do MO (BAST *et al.*, 2003; MIYAGI *et al.*, 2008; NONAKA *et al.*, 2009). Além de avaliar a expressão de MMPS, Bast e colaboradores (2003) revelaram o aumento da positividade celular para proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2 e a Bcl-X, através de estudos imunohistoquímicos e

sugeriram que os resultados encontrados são um possível mecanismo de progressão tumoral (BAST *et al.*, 2003).

### 2.1.3 Patogênese e alterações moleculares

A patogênese do MO ainda é objeto de debate, porém a teoria mais aceita postula uma origem celular odontogênica (FRIEDRICH *et al.*, 2016), que é suportada por diversas constatações, como a similaridade histológica entre o MO e o ectomesênquima da polpa dentária, a localização tumoral próxima ao periodonto, sua associação periódica com um dente incluso, a presença ocasional de epitélio odontogênico inativo e sua ocorrência incomum em outras partes do sistema esquelético (NOFFKE *et al.*, 2007).

O MO é majoritariamente reportado na literatura como relato de casos e sua patogênese molecular permanece não elucidada (MOREIRA *et al.*, 2011). No entanto, desde a sua primeira descrição em 1947 por Thoma e Goldman, alguns trabalhos já foram feitos a fim de melhor compreender os possíveis mecanismos envolvidos na iniciação e progressão dessa neoplasia.

Mutações no gene *PRKARIA* (do inglês *protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha*) foram identificadas em mixomas cardíacos (MC) associados ao complexo de Carney, uma síndrome neoplásica associada com o desenvolvimento de vários tipos de mixoma. Como o MO é histologicamente similar ao MC, investigou-se a presença de mutações nesse gene em amostras de MO de pacientes não sindrômicos (PERDIGÃO *et al.*, 2005). Diante desse cenário, Perdigão e colaboradores (2005) descreveram pela primeira vez duas mutações na região codificadora do gene *PRKARIA* em 2/17 amostras de MO, sendo uma mutação missense (c.725C>A) e a outra uma mutação por deleção de par de base (774delC) (PERDIGÃO *et al.*, 2005). Tais achados suportam a possibilidade do gene *PRKARIA* participar da patogênese molecular de casos esporádicos de MO (PERDIGÃO *et al.*, 2005).

Consta na literatura científica um relato de caso envolvendo microduplicação constitutiva na região 1q21 do cromossomo 1, sendo que essa região apresenta vários genes que codificam componentes da via PKA (do inglês *cAMP-dependent protein kinase A*), levantando a possibilidade de que alterações genéticas nesta via desempenhem algum papel no desenvolvimento do mixoma odontogênico (BEST-ROCHA *et al.*, 2016).

Apesar de alguns estudos não mostrarem associação de mutações no gene *GNAS* (do inglês *GNAS complex locus*) com o surgimento de MO e MC (BOSON *et al.*, 1998; DE MARCO *et al.*, 1996), Delaney e colaboradores (2009) demonstraram que mutações nesse gene são, aparentemente, mais prevalentes do que se imaginava, sendo reportadas em 61% dos mixomas

intramusculares (DELANEY *et al.*, 2009). Considerando esse último estudo e o compartilhamento de características histopatológicas entre os mixomas, Friedrich e colaboradores (2012) decidiram reexaminar a associação entre MO e mutações putativas no gene em questão, porém nenhuma alteração genética foi encontrada nas 7 amostras de MO analisadas (FRIEDRICH *et al.*, 2012).

Devido à similaridade histológica, o mixofibroma odontogênico é considerado uma variante do MO. Tendo isso em mente, foi observado o rearranjo do gene *HMGA2* (do inglês *High Mobility Group AT-Hook 2*) e a superexpressão da proteína codificada por ele em uma amostra de mixofibroma derivada uma paciente de 40 anos, sugerindo que esses fenômenos poderiam estar associados à tumorigênese dessas lesões (SATO *et al.*, 2010).

Por meio do Sequenciamento de Nova Geração, Santos e colaboradores (2017) investigaram quase 3.000 mutações em 50 oncogenes e genes supressores de tumor comumente mutados em cânceres, mas nenhuma mutação patogênica recorrente foi reportada no MO (SANTOS *et al.*, 2017).

Estudos apontaram mutações *drivers* recorrentes no gene *PDGFRB* (do inglês *platelet derived growth factor receptor beta*) em miofibromas. Tendo em vista que as células do MO podem mostrar diferenciação miofibroblástica e que ambos os tumores apresentam áreas mixoides, Siqueira e colaboradores (2020) levantaram a hipótese de que o MO também poderia ter esse mesmo perfil molecular, contudo nenhuma das 15 amostras de MO sequenciadas apresentaram mutação no gene em questão (DE SIQUEIRA *et al.*, 2020).

Alterações epigenéticas, como a hipometilação, podem causar instabilidade cromossômica e aumentar a quantidade de eventos mutacionais. Levando isso em consideração, um estudo constatou hipometilação nos genes supressores de tumor *P27*, *P53* e *RBI* em amostras de MO (MOREIRA *et al.*, 2011). Por meio de reações imunohistoquímicas, Guimarães e colaboradores (2015) corroboraram esses resultados mediante a ausência de imunodeteção de DNMTs (do inglês *DNA methyltransferases*) 3A e 3B (GUIMARÃES *et al.*, 2015).

Considerando o comportamento agressivo do MO, o acometimento de indivíduos jovens por ele e o fato de sua patogênese ainda não ter sido completamente elucidada, o estabelecimento de modelos de estudo *in vivo* e *in vitro* fornecem bases para propor novas terapias alternativas aos tratamentos cirúrgicos tradicionais, que muitas vezes trazem prejuízos estéticos para a autoestima dos pacientes e enormes prejuízos funcionais.

## 2.2 Via de sinalização das MAPK

A cascata prototípica Ras/RAF/MERK/ERK faz parte da via de sinalização MAPK (do inglês, *mitogen-activated protein kinase*), que é uma das principais vias no ciclo celular que regula processos de proliferação, diferenciação e sobrevivência das células e sua hiperativação já foi reportada em várias neoplasias humanas, incluindo as de origem odontogênica (DINIZ *et al.*, 2017; GOMES *et al.*, 2016). A via será referida no restante do trabalho como via de sinalização MAPK/ERK. Quando essa via está alterada, ela conduz a carcinogênese por ativar genes que promovem a proliferação celular ao mesmo tempo que permite que as células sobrevivam ao estresse metabólico por inativar outras vias de sinalização (YUAN *et al.*, 2020) (Figura 1).

Mutações nos genes da via de sinalização MAPK/ERK culminam na hiperativação dessa via, que é responsável por uma parcela significativa de todos os tipos de câncer (MONTAGUT; SETTLEMAN, 2009; YUAN *et al.*, 2020). Essas alterações genéticas, como mutações ativadoras *KRAS* p.G12V e p.G12R e *BRAF* p.V600E, foram reportadas em altas frequências em neoplasias odontogênicas benignas, como TOA e ameloblastomas, respectivamente. (GOMES *et al.*, 2016; KURPPA *et al.*, 2014; COURA *et al.*, 2019). Como exposto na seção 2.1.3, em relação ao MO, nenhuma mutação nos genes da via MAPK/ERK, como *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* e *BRAF*, foi encontrada ao utilizar o sequenciamento de nova geração para investigação de um painel de 50 genes comumente mutados em neoplasias malignas humanas (SANTOS *et al.*, 2017).

No entanto, devido aos *crossstalks* entre as vias de sinalização celular, a cascata pode ser indiretamente ativada por outros genes e, quinases terminais ativadas, especificamente ERK1/2, foram identificadas em tumores em que os genes da cascata de sinalização não estavam mutados (PLOTNIKOV *et al.*, 2011).

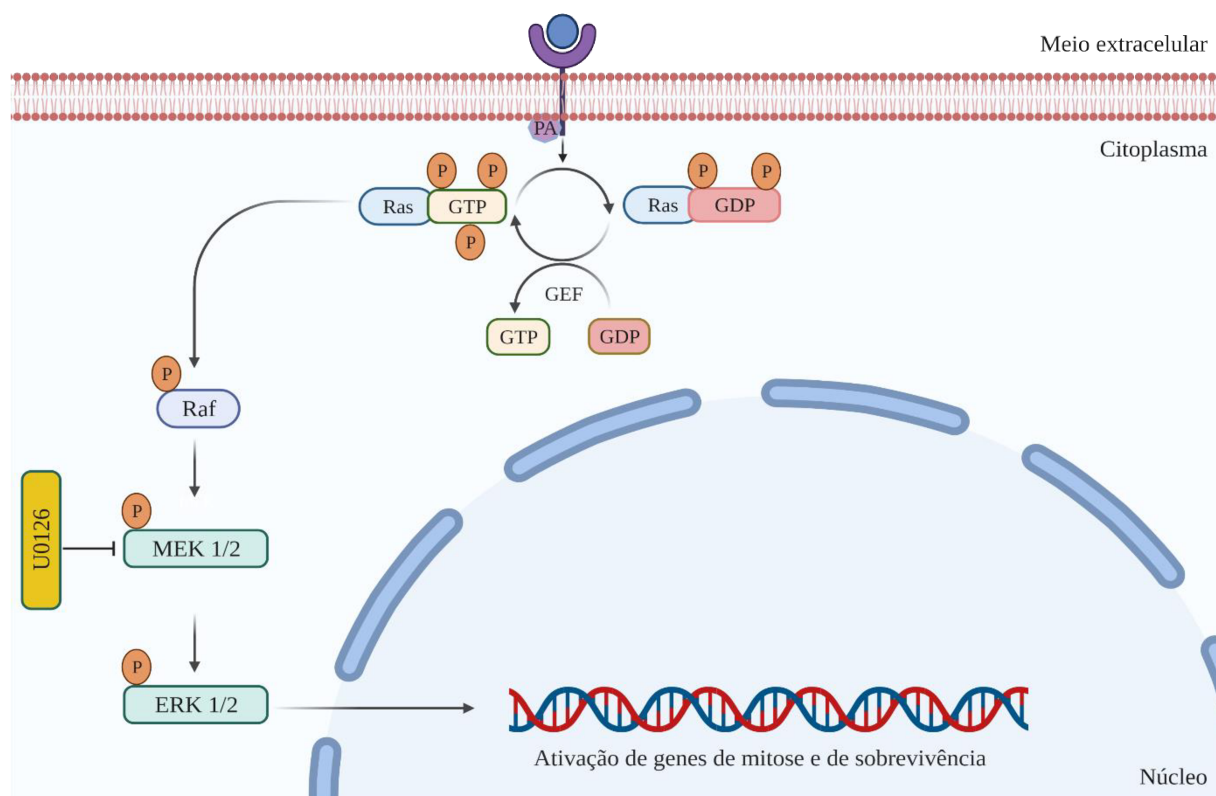
Diante do exposto acima, apesar de não ter sido reportada nenhuma mutação nos genes da via MAPK/ERK em MO, será que, ainda assim, a via poderia estar ativada nesse tumor? Para responder essa pergunta, realizou-se reações de imunohistoquímica para avaliar a imunexpressão de pERK1/2.

O fato da cascata Ras/Raf/MEK/ERK participar da regulação de processos de proliferação e de sobrevivência celular, bem como o fato dela estar desregulada em várias neoplasias humanas, faz com que ela seja um alvo em potencial para o desenvolvimento de novas terapias moleculares (MONTAGUT; SETTLEMAN, 2009). O composto U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4bis[2-aminophenylthio] butadiene) é um inibidor direto de MEK (do inglês *mitogen-activated protein kinase kinase*) (Figura 1). A inibição é seletiva para MEK1/2, sendo que U0126 tem pouco ou nenhum efeito sobre as atividades das outras proteínas quinases (FAVATA *et al.*, 1998).

Experimentos *in vitro* e *in vivo* envolvendo esse inibidor já foram realizados em rabdomyosarcomas embrionários, onde U0126 demonstrou reduzir o tamanho do tumor em quase 50%, além de diminuir a fosforilação de ERK e ERK total (MARAMPON *et al.*, 2009). Os efeitos do U0126 também já foram testados em linhagens celulares provenientes de neoplasias malignas, como câncer de pâncreas (GUO *et al.*, 2015), de pulmão (SONG *et al.*, 2017), de próstata (CICCARELLI *et al.*, 2018) e câncer cervical (YE *et al.*, 2017). No que diz respeito aos tumores odontogênicos benignos, esse inibidor de MEK demonstrou inibir a fosforilação ERK e proliferação de células epiteliais de ameloblastomas (NAKAO *et al.*, 2013).

Após a constatação de que a via em questão encontrava-se ativada nas amostras de MO, pretendeu-se avaliar os efeitos do inibidor U0126 em modelos *in vivo* e *in vitro*.

**Figura 1.** Esquema representativo da ativação da via de sinalização MAPK/ERK (Criado e modificado com Biorender.com)



Resumidamente, a ativação da via ocorre pela ligação de fatores de crescimento aos receptores de superfície celular, como os receptores tirosina-quinase, que por sua vez acionam proteínas de adaptação e o fator de troca do nucleotídeo guanina (do inglês *GTP/GDP exchange factor*, GEF). A ativação de RAS pela ligação RAS-GTP fosforila e ativa sequencialmente RAF/MEK/ERK. ERK ativada é então translocada para o núcleo, onde fosforila vários substratos e ativa genes de mitose e de sobrevivência. O inibidor de MEK U0126 impede a fosforilação de ERK1/2 por MEK1/2.

### 2.3 Modelo de cultura organotípica 3D

A avaliação de novas terapias alternativas ao tratamento cirúrgico convencional para as neoplasias requer um bom entendimento dos mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese tumoral, bem como o desenvolvimento de modelos clinicamente relevantes que sejam capazes de mimetizar a real complexidade do que é observado nos pacientes (CONTARTESE *et al.*, 2020). Nesse sentido, o estabelecimento de modelos *in vitro* e *in vivo* fornece bases para questões biológicas básicas e para estudos oncológicos translacionais, favorecendo a elucidação da tumorigênese e a elaboração de novas terapias moleculares anti-tumorais.

A manutenção do fenótipo celular é produto das interações complexas entre as células e entre elas e a MEC (BISSEL; LABARGE, 2005). Diante do exposto acima, e considerando que o microambiente tumoral são fatores importantes para a progressão das neoplasias por participar de processos celulares, como os de proliferação e diferenciação, modelos de cultura tridimensionais (3D) têm sido propostos com o intuito de preservar as interações tumor-estroma (RODRIGUES *et al.*, 2020), além de superar as limitações dos sistemas tradicionais de cultura em monocamadas (BASTOS *et al.*, 2019), principalmente no sentido de prover um ambiente parecido com o que é encontrado *in vivo* (HAYDEN; HARBELL, 2020).

Os modelos de cultura 3D são também chamados de cultura organotípica ou organoide e permitem que os tecidos derivados de paciente sejam cultivados na forma de explantes, de forma íntegra e intacta (SHAMIR; EWALD, 2014), preservando o microambiente nativo dos tecidos tumorais (CONTARTESE *et al.*, 2020; MEIJET *et al.*, 2017; MERZ *et al.*, 2013; MILANI *et al.*, 2010). Tais modelos são considerados uma alternativa à utilização de células isoladas, que podem perder rapidamente seus fenótipos em cultura e não refletir adequadamente sua função anterior (RODRIGUES *et al.*, 2020).

O desenvolvimento de construção desses modelos geralmente requer uma matriz ou substrato diferente do poliestireno rígido das placas plásticas usadas na cultura em monocamada. Essa matriz também deve fornecer substratos essenciais para a expressão do fenótipo organotípico. (HAYDEN; HARBELL, 2020). Considerando que o tecido ósseo é composto por uma MEC com presença abundante de colágeno tipo I (ZHANG *et al.*, 2017) e que o MO é uma lesão intraóssea, *scaffolds* com polímeros naturais de colágeno tipo I fornecem um ambiente adequado para mimetizar a MEC do tumor primário.

O primeiro estudo envolvendo culturas 3D primárias de tumores odontogênicos mantidas por longo prazo, incluindo o MO, foi realizado por Bastos e colaboradores (2019). Os resultados obtidos mostraram que esse modelo teve boa reprodução do padrão de crescimento observado *ex*

*vivo*; além disso, a avaliação macroscópica mostrou a viabilidade celular dos explantes por mais de 30 dias sem a presença de áreas sugestivas de processos degenerativos (BASTOS *et al.*, 2019).

A partir desta abordagem da literatura científica, um dos objetivos desse trabalho é estabelecer um modelo *in vitro* para o MO, assim como servir de subsídio para terapias moleculares envolvendo a inibição da via MAPK/ERK no presente estudo ou futuras terapias que possam contribuir para um melhor prognóstico dos pacientes. O modelo 3D proposto foi estabelecido de acordo com os fatores descritos nessa secção, que são importantes no contexto do microambiente e do estroma tumoral, e com base na reprodutibilidade da metodologia abordada por Bastos e colaboradores (2019). Levando isso em consideração, o estabelecimento da cultura 3D consistiu em cultivo dos explantes teciduais de MO em *scaffolds* compostos por colágeno tipo I. *Scaffolds* fornecem um ambiente adequado para mimetização da MEC em cultura de células, recapitulando pontos bioquímicos e estruturais importantes, o que os torna aplicáveis à maioria dos modelos 3D *in vitro* atuais (RIJAL; LI, 2016).

#### **2.4 Modelo de xenoenxerto derivado de paciente**

O uso de modelos animais é importante para a oncologia por permitir o desenvolvimento de estudos pré-clínicos (OKADA *et al.*, 2019; RICHMOND; SU, 2008). As vantagens de usar camundongos na pesquisa devem-se ao fato deles compartilharem similaridades genéticas e fisiológicas com os humanos; eles terem tamanhos pequenos, o que facilita o manuseio desses animais; e seu ciclo de vida e reprodutivo serem curtos, resultando em uma redução de tempo para conduzir pesquisas *in vivo*. (KOHNKEN *et al.*, 2017).

Modelos de xenoenxerto derivados de paciente (do inglês *patient-derived xenograft, PDX*) são um dos mais avançados modelos pré-clínicos (JUNG *et al.*, 2018) para estudo das neoplasias. Modelos de PDX são estabelecidos por meio do implante de fragmentos de tumor minimamente processados e/ou suspensão de células do tumor primário em camundongos imunodeficientes, a fim de superar a rejeição imunológica (Rygaard & Povlsen, 1969). Eles são capazes de preservar o fenótipo dos tumores derivados de paciente, como mostrado em estudos que verificaram a manutenção das características histológicas do tumor primário nos camundongos (HIDALGO *et al.*, 2014; APARICIO *et al.*, 2018; ZHANG *et al.*, 2013; PEREIRA *et al.*, 2019). Uma outra vantagem é que eles preservam o perfil genômico do tumor dos pacientes (YOSHIDA, 2020; REYAL *et al.*, 2012; ZHAO *et al.*, 2012; MISALE *et al.*, 2015; EVANS *et al.*, 2017; GARCIA *et al.*, 2018). Além disso, eles permitem que as células tumorais cresçam em um microambiente com



suprimentos essenciais para seu crescimento. Coletivamente, todas essas vantagens são valiosas para a pesquisa básica e pré-clínica, contribuindo para a caracterização de alvos terapêuticos, além de prover um sistema eficaz para a triagem de fármacos (JUNG *et al.*, 2018; TENTLER *et al.*, 2012; LAI *et al.*, 2017)

O primeiro modelo de PDX foi desenvolvido em 1969 por Rygaard e Povlsen, que xenotransplantaram amostras de adenocarcinoma de colon sigmoide de uma paciente de 74 anos de idade em um camundongo NUDE (RYGAARD; POVLSEN, 1969).

O camundongo NUDE é portador de uma mutação recessiva no gene *Foxn1* (NEHLS *et al.*, 1994) que leva ao desenvolvimento de um timo rudimentar, com conseqüente redução do número de linfócitos T, o que diminui a rejeição aos enxertos tumorais (NEHLS *et al.*, 1994; BELIZARIO, 2009; VAN VLIET *et al.*, 1985). Além do mais, esses animais não possuem pelos (FLANAGAN, 1966). Considerando que a atividade de linfócitos T aumenta com a idade, o uso de camundongos entre 5-10 semanas é o ideal para aumentar a taxa de sucesso do xenoenxerto. Apesar da ausência parcial do sistema imune adaptativo, camundongos NUDE possuem o sistema imune inato, mais especificamente a presença de células NK (do inglês *natural killer*), granulócitos, células dendríticas e linfócitos B, que podem eventualmente interferir no sucesso do estabelecimento do xenoenxerto (SZADVARI *et al.*, 2016; GIOVANELLA; FOGH, 1985; PACAK *et al.*, 2012; SHULTZ *et al.*, 2005; SHULTZ *et al.*, 2014; KOHKEN *et al.*, 2017). Camundongos NUDE Balb/C têm polimorfismo para a proteína sirpa (do inglês *signal-regulatory protein alpha*) que adquirem afinidade por células humanas CD47 positivas, fazendo com que ocorra menor fagocitose de células humanas mediada por macrófagos, tornando-os receptores úteis para transplante de células e tecidos humanos (OKADA *et al.*, 2019; OKADA *et al.*, 2018; IWAMOTO *et al.*, 2014).

Desde o primeiro modelo de PDX desenvolvido, vários esforços para gerar esses animais para o estudo de câncer têm sido feitos, os quais são bem descritos na literatura (HIDALGO *et al.*, 2014; CALLES *et al.*, 2013; KIM *et al.*, 2009). Com relação às neoplasias benignas, no tocante dos tumores odontogênico benignos, raros estudos foram realizados, sendo reportado o desenvolvimento desse modelo apenas para o fibrodentinoma ameloblástico (PEREIRA *et al.*, 2019) e para o ameloblastoma (ZHANG *et al.*, 2009). Contudo, sob o ponto de vista biológico, o estudo das neoplasias benignas é igualmente importante ao estudo das malignas (MARINO-ENRIQUEZ; FLETCHER, 2014), já que elas podem compartilhar algumas características, como mutações em genes supressores de tumor e oncogenes, alguns deles considerados *hallmarks* de câncer (KATO *et al.*, 2016). Conforme descrito na seção 2.2, essas alterações genéticas, como

mutações *KRAS* p.G12V e p.G12R e *BRAF* p.V600E, já foram reportadas, respectivamente, em tumores benignos como TOA e ameloblastomas (COURA *et al.*, 2019; KURPPA *et al.*, 2014). Encontra-se anexado ao apêndice A desse documento, um artigo científico englobando vários tipos de tumores benignos para os quais já foram desenvolvidos modelos de PDX. Até o presente momento, esse é o primeiro artigo de revisão para neoplasias benignas nessa área (**Apêndice A**).

Diante do que foi explanado nessa seção, propôs-se o estabelecimento de um modelo de PDX para o MO utilizando fragmentos tumorais minimamente processados como “fonte material” na região subcutânea de camundongos NUDE Balb/C com 8 semanas de idade.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo geral**

- Estabelecer um modelo de PDX e um modelo de cultura celular 3D para o MO.

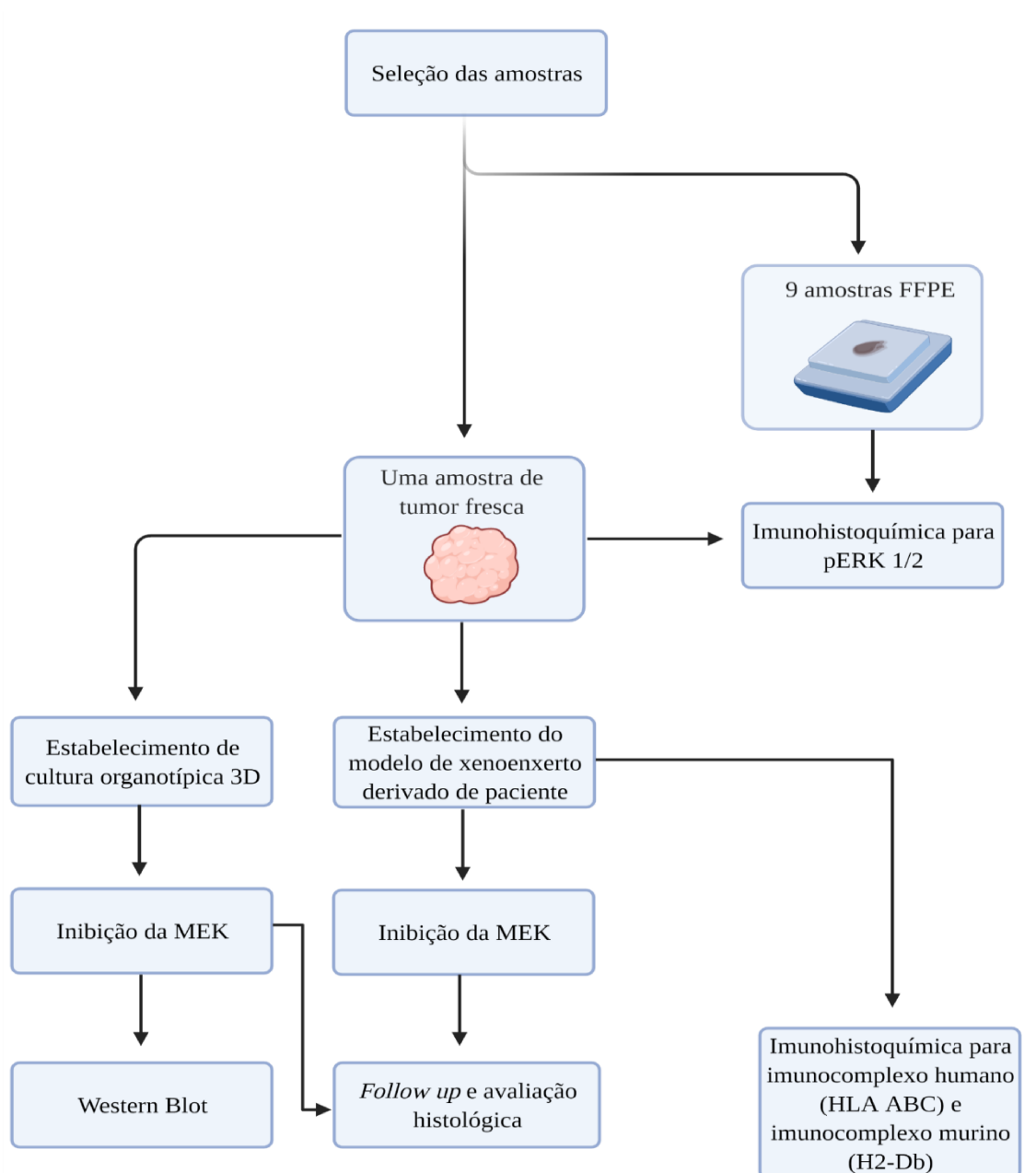
#### **3.2 Objetivos específicos**

- Investigar a imunexpressão da forma fosforilada de ERK1/2 (pERK1/2), um marcador da ativação via de sinalização MAPK/ERK, em amostras de MO.
- Testar os efeitos da inibição da ERK1/2 fosforilada usando o inibidor de MEK U0126.
- Investigar se a origem das células dos vasos sanguíneos em meio às células neoplásicas do MO é murina ou humana.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A metodologia empregada nesse estudo está detalhada nas secções desse tópico e esquematizada conforme a figura abaixo (Figura 2):

**Figura 2.** Esquema representativo de como foi feito o delineamento experimental (Criado com Biorender.com)



\*FFPE (do inglês *formalin-fixed paraffin-embedded*).

\*\* Uma parcela da amostra de tumor fresca foi fixada em formol e incluída em parafina (FFPE) para que pudessem ser realizadas reações de imunohistoquímica direcionadas à pERK1/2, totalizando 9 amostras FFPE.

#### **4.1 Aspectos éticos**

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) (Protocolo CAAE 48121415.2.0000.5149), sob o parecer N° 1.295.542 (**Apêndice B**) e pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) (Protocolo 201/2015) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Após aceitarem fazer parte dessa pesquisa, os participantes maiores de 18 anos e, plenamente capazes de manifestar seus interesses, assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e o Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE) foi assinado pelos pais ou responsáveis dos pacientes menores de 18 anos (**Apêndice C**).

#### **4.2 Seleção das amostras**

Oito amostras de conveniência fixadas em formol e embebidas em parafina (FFPE) foram extraídas dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucomaxilo-facial da Faculdade de Odontologia (FaO) da UFMG. Uma amostra de tecido fresco foi coletada durante uma excisão cirúrgica na Clínica de Semiologia e Patologia da FaO UFMG. O critério de inclusão dos casos foi a presença microscópica de células fusiformes e estreladas, dispersas em uma matriz extacelular mixoide, que é a característica histológica usual do MO. O critério de exclusão foi quantidade insuficiente de tumor nas amostras FFPE e informações clínicas insuficientes. O diagnóstico dos casos de MO foi revisado e confirmado por dois patologistas experientes (C.C.G e R.S.G).

#### **4.3 Avaliação da pERK1/2 por imunohistoquímica**

A fim de avaliar se a via MAPK/ERK estava ativada nas 9 amostras FFPE de MO (sendo um correspondente a tumor fresco coletado), foram realizadas reações de imuno-histoquímica direcionada para pERK1/2.

Por meio de um micrótomo, as amostras FFPE foram seccionadas em cortes de 4µm de espessura e colocadas em lâminas silanizadas *StarFrost advanced adhesive* (Waldemar Knittel Braunschweig, Alemanha). Em seguida, elas foram desparafinizadas em xilol (Merck, Darmstadt, Alemanha) e hidratadas em concentrações decrescentes de álcool: 100%, 90%, 70% (EMFAL, Minas Gerais, Brasil). A recuperação antigênica foi feita com Tris/EDTA (pH 8.0) (Biosolve, Dieuze, França), por 30 minutos à partir do momento em que a temperatura atingiu 90°C, utilizando-se um steamer (Conair Corporation, Stamford, EUA). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com metanol (Neon, São Paulo, Brasil) e peróxido de hidrogênio à 10% (FARMAX, Minas Gerais, Brasil) na proporção de 1:1. As lâminas foram incubadas com anticorpo

primário monoclonal de coelho anti-pERK1/2 (Thr202/Tyr204, clone 20G11, nº de catálogo CST 4376, Cell Signaling Technology) em câmara úmida (EasyPath, São Paulo, Brasil), em uma diluição de 1:100, à 4°C por 18 horas. A reação foi visualizada usando o sistema à base de polímeros *EnVision EnV+/HRP* (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) e revelada utilizando DAB (diaminobenzidina) (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) como cromógeno. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo. Considerou-se a marcação dos vasos sanguíneos como controle positivo interno da reação. As lâminas foram observadas em um microscópio óptico e a imunoposição avaliada por dois pesquisadores.

As imagens provenientes das reações de imunohistoquímica foram capturadas e digitalizadas por meio de microscópios e equipamentos do Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/UFMG) e visualizadas através do software *CaseViewer* [CaseViewer 2.4 (64-bit version) for Windows]. A imunoreatividade foi avaliada qualitativamente em positiva ou negativa. Em caso de positividade, classificou-a de acordo com o seu perfil marcação em nuclear ou citoplasmática.

#### 4.4 Coleta da amostra fresca

Foi coletada uma amostra fresca de MO durante uma excisão cirúrgica para estabelecer um modelo de PDX e para instituir um modelo de cultura organotípica 3D.

A amostra foi transportada em meio de cultura DMEM refrigerado (do inglês *Dulbecco's Modified Eagle Medium*), suplementado com 10% de soro fetal bovino, penicilina (100 µg/mL), estreptomicina (100 µg/mL) e anfotericina B (1.25 µg/mL). O provedor, a origem e o número de catálogo dessas soluções estão sistematizados na **tabela 1**.

**Tabela 1.** Reagentes utilizados no preparo da solução para transporte da amostra

Nome/Sigla	Provedor	Nº de catálogo	Origem
DMEM	<i>ThermoFischer</i>	12100046	Carlsbad, CA, EUA
Soro fetal bovino	<i>ThermoFischer</i>	12657029	Carlsbad, CA, EUA
Penicilina/Estreptomicina	<i>ThermoFischer</i>	15140122	Carlsbad, CA, EUA
Anfotericina B	<i>ThermoFischer</i>	15290018	Carlsbad, CA, EUA

Para o cultivo celular, uma parcela da amostra foi seccionada em explantes (fragmentos) de 1,5 a 2 mm, utilizando-se lâminas de bisturi (Wuxi Xinda, Jiangsu, China). Por meio de um *punch* de biópsia (Golgran, São Paulo, Brasil), a outra parcela foi segmentada em fragmentos de 5x5 mm para o estabelecimento do modelo de PDX.

Em seguida, todos os fragmentos foram lavados com solução salina tamponada (do inglês *phosphate-buffered saline*, PBS) (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementada com penicilina (200 U/mL), estreptomicina (200 µg/mL) e anfotericina B (25 µg/mL).

#### **4.5 Camundongos NUDE**

Foram utilizados três camundongos NUDE Balb/C, pesando 25g e acondicionados em micro-isoladores de 316x215x207 (Alesco, São Paulo, Brasil), que foram acoplados em uma rack com sistema de ventilação individual de 20 a 70 trocas de ar por hora (Alesco, São Paulo, Brasil). Os animais foram mantidos em condições livres de patógenos (do inglês *Specific-Pathogen Free*, SPF), no Biotério de Experimentação do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. Todos os materiais utilizados para a manutenção dos animais, incluindo gaiolas, mamadeiras e ração peletizada foram devidamente autoclavados. Nesse mesmo local, uma capela de fluxo laminar do tipo 2, previamente desinfetada e esterilizada, foi utilizada para o preparo dos tumores e para a cirurgia de xenoenxerto.

Maravalhas de pinus foram utilizadas como forração dos microisoladores. Como enriquecimento ambiental, a fim de reduzir o nível de estresse dos animais e permitir a visualização comportamental diária, sem incomodá-los, tocas vermelhas transparentes confeccionadas em material acrílico (Alesco, São Paulo Brasil).

Durante o estudo, normas de biossegurança foram seguidas e os EPIs como luvas esterilizadas sem pó; jalecos de manga longa limpos; toucas, propés e máscaras cirúrgicas faciais descartáveis, foram devidamente utilizados para manipular os camundongos.

#### **4.5 Estabelecimento do PDX e inibição da MEK**

Os animais foram anestesiados com cloridrato de xilazina (10 mg/kg) (Sespo, São Paulo, Brasil) e cloridrato de ketamina (80 mg/kg) (Sespo, São Paulo, Brasil) pela via intraperitoneal com seringas ultrafinas curtas com agulha de 6 mm (BD Company, New Jersey, EUA). Em seguida, houve assepsia da região dorsal dos animais com gaze embebida em álcool na concentração de 70%.

A eficácia da anestesia foi testada ao pressionar cuidadosamente as patas dos animais com uma pinça. Realizou-se posteriormente uma incisão de aproximadamente 1 cm próxima a cauda dos camundongos, por meio de uma lâmina de bisturi nº10 estéril (Wuxi Xinda, Jiangsu, China). Com o auxílio de uma tesoura de ponta romba, o tecido foi divulsionado para que os fragmentos de 5x5 mm de MO fossem implantados no dorso dos camundongos, próximo à região cervical; dois deles foram implantados com dois fragmentos de tumor (PDXA, PDXB, PDXC e PDXD) e o terceiro teve um único fragmento implantado e foi utilizado como controle (CT). A seguir, foram realizadas suturas de ponto simples com fios cirúrgicos não absorvíveis de origem sintética (Technew, Rio de Janeiro, Brasil). Durante o estudo, normas de biossegurança foram seguidas e os EPIs como luvas esterilizadas sem pó; jalecos de manga longa limpos; toucas, propés e máscaras cirúrgicas faciais descartáveis, foram devidamente utilizados para manipular os camundongos.

Mantas térmicas mantidas à 47°C (Bioterm, Rio Grande do Sul, Brasil) foram utilizadas durante o procedimento cirúrgico, a fim de não causar hipotermia nos animais, que não possuem pelos para regulação térmica. Além disso, empregou-se gel lubrificante (Bausch & Lomb, Nova York, EUA) nos olhos dos camundongos durante o período do experimento para não os ressecar.

Os animais foram acompanhados diariamente durante uma semana para verificar possíveis consequências adversas da cirurgia. Eles foram mantidos sob condições estéreis a  $21 \pm 3^\circ\text{C}$  e umidade de  $55 \pm 5\%$  em um ambiente controlado com ciclo diurno-noturno com água e ração peletizada esterilizadas *ad libitum*.

Depois de uma semana, por meio de um paquímetro digital (King Tools, nº de catálogo: 502.150BL, China), efetuaram-se mensurações semanais dos tamanhos dos fragmentos xenotransplantados, para a construção do gráfico de crescimento tumoral. As mensurações foram realizadas por um único observador (J.C.S.), exatamente no mesmo horário da implantação dos fragmentos minimamente processados de MO. O volume do tumor foi calculado utilizando a seguinte fórmula: comprimento x largura<sup>2</sup> / 2 (PEARSON *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2019). Foram calculadas, a cada mensuração, três medidas de volume para cada fragmento e uma média delas foi obtida. Os fragmentos tumorais foram mantidos por 55 dias nos camundongos.

No dia 34, os dois animais com dois fragmentos cada receberam injeção intraperitoneal de 200µL (50 µmol/kg) do inibidor de MEK U0126 (CST 9903, Danvers, MA, USA). A diluição do fármaco foi feita em solução veículo de DMSO 40% em solução fisiológica. No camundongo utilizado como controle foi injetado intraperitonealmente 200µL de PBS mais solução veículo. Os camundongos receberam o tratamento a cada 3 dias, totalizando 7 injeções em um período de 21 dias. As injeções com o inibidor de MEK foram aplicadas sempre no mesmo horário. O cálculo



para avaliar a dinâmica do volume tumoral foi efetuado pela razão do tamanho dos fragmentos tumorais xenotransplantados no último dia do experimento (dia 55) pelo seu tamanho inicial (dia 34) (*fold-change*).

No dia 55, os animais foram eutanasiados com uma overdose de anestésico (3x a dose para a anestesia) e os tumores xenotransplantados foram removidos, fixados em formaldeído e incluídos em parafina para coloração histológica de hematoxilina-eosina (HE). Além disso, seus órgãos foram avaliados macroscopicamente para constatar possíveis alterações macroscópicas.

A razão pela qual foi escolhido o período de tempo de 34 e 55 dias está relacionada ao tamanho dos fragmentos tumorais, de forma que o volume deles não decrescessem tanto a ponto de não ter material suficiente para as análises microscópicas.

#### ***4.6 Estabelecimento da cultura celular tridimensional e inibição da MEK***

Para o estabelecimento de uma cultura tridimensional de MO, foram utilizados *scaffolds* de colágeno tipo 1 derivado dos tendões caudais de ratos, gentilmente cedidos pelo professor Gregory Kitten. Conforme descrito anteriormente por Valverde e colaboradores (2016), os tendões foram extraídos, lavados em água e, posteriormente, imersos em uma solução de ácido acético a 0,5 mol/L, sob leve agitação, por 48h a 4°. A solução proveniente dessa etapa foi filtrada através de camadas de gaze estéreis e centrifugada a 14.000 x g durante 1 hora. A concentração de 5,4 mg/mL dessa solução foi obtida por meio da secagem de alíquotas de volume pré-dosado e, então, acondicionadas como solução estoque a uma temperatura de 4-7°C (VALVERDE *et al*, 2016).

Em conformidade com Bastos e colaboradores (2019), *scaffolds* de colágeno na concentração de 2 mg/mL foram preparados a partir da solução de estoque juntamente com água mili-Q estéril, meio  $\alpha$ -MEM concentrado 10x e hidróxido de sódio a 0.1M. Essa mistura foi então submetida a baixa rotação por meio de um vórtex para homogeneização da mesma.

Após a preparação do colágeno descrita acima, os explantes (fragmentos) foram lavados em meio DMEM 1x aquecido a 37°C e mantidos à temperatura ambiente. Enquanto isso, a solução de colágeno foi plaqueada em placas de cultura individualizadas de 35 mm de diâmetro com vidro acoplado ao fundo (FluoroDish, FD35-100). Antes que o colágeno se gelificasse, através da técnica de explante direto, os fragmentos de tecidos (n=28) foram alocados a uma densidade de 4 explantes/placa. Após o tempo de gelificação, que ocorreu à temperatura ambiente, por cerca de 15 minutos, as placas foram lavadas três vezes com DMEM 1x (pH 7.1) não suplementado, a fim de remover o excesso de sais e promover um ambiente isotônico para os explantes. Posteriormente,

aproximadamente 1,5 mL de meio DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) foi adicionado às placas, que foram então encubadas em uma estufa úmida a 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C.

O meio de cultura foi trocado a cada 2 dias. Depois de 45 dias em cultura, os géis de colágeno contendo os explantes foram lavados com DMEM suplementado com 10% de SFB e tratados com 10 mM de U0126 em DMSO. O grupo controle de amostras foi incubado com uma concentração equivalente de solução veículo sem o fármaco. O meio com o inibidor de MEK foi substituído no terceiro dia e depois de seis dias de tratamento.

#### **4.7 Avaliação da inibição de MEK por U0126 na cultura 3D**

##### **4.7.1 Incubação com LIVE/DEAD®**

Após seis dias de tratamento com o U0126, as amostras foram lavadas com PBS e incubadas com o kit de viabilidade/citotoxicidade celular LIVE/DEAD® (Invitrogen, L3224, Carlsbad, CA, USA).

Para esse ensaio, foi diluído 20 µL da solução estoque EtdhD-1 (2 mM) a 10 mL de PBS estéril, obtendo uma concentração final de 4 µM; e 5 µL de calceína AM (4mM) foi adicionado aos 10 mL de solução EtdhD-1. A solução final foi então agitada sobre um vórtex para homogeneização e 100 µL dela foi adicionada às células, que foram incubadas com a solução por um período de 30-45 minutos. As células viáveis foram observadas pela produção de uma fluorescência verde e uniforme e as com membranas modificadas puderam ser visualizadas pela emissão de fluorescência vermelha.

Os experimentos foram realizados em duplicata. Imagens de campos aleatórios (duas imagens por poço) foram obtidas por um microscópio de fluorescência (Zeiss Axio Vert A1) com uma lente objetiva com aumento de 40x. Para a observação da fluorescência emitida, foram utilizados os canais dos seguintes comprimentos de onda (excitação/emissão): faixa de 494 a 517 nm para calceína AM e 528 a 617 nm para o EthD-1. A análise foi feita usando o software ImageJ v.1.52e. Um número total de 160 células foi contado no grupo controle e 200 células foram contadas na cultura tratada.

##### **4.7.2 Western blot**

A fim de avaliar a inibição da fosforilação de ERK1/2 nas células de MO em cultura, empregou-se a técnica de *Western Blot* que, além de permitir essa análise, possibilitou avaliar se essa inibição era dose-dependente. Assim, os explantes foram plaqueados e embebidos em matriz colágena, em uma placa de 24 poços (STARSTED, Nümbrecht, Alemanha), à densidade de 1 explante/poço, como descrito anteriormente.

Foram mantidas as mesmas condições de cultura conforme exposto no item 4.5. Ao 45° dia, os explantes foram tratados com diferentes concentrações do inibidor de MEK U0126 (0 – controle com o veículo, 1mM e 10mM). O tratamento foi realizado por 6 dias, com troca do meio contendo o fármaco sendo realizada ao terceiro dia. O lisado total foi obtido após a lavagem dos explantes com PBS 1x, seguidos pela adição do tampão de lise RIPA (Sigma Aldrich, EUA), contendo coquetéis com inibidor de proteases (1:100) e de fosfatases (1:100) (Sigma Aldrich, EUA). Após a extração, as proteínas foram quantificadas pelo método de Bradford (Bradford, 1976).

As amostras foram diluídas em tampão de borato de lítio 5x e aquecidas a 100°C durante 5 minutos para desnaturação e remoção debris celulares, facilitando o carregamento das proteínas. Em seguida, 25 µg de proteína foi aplicada à canaletas de gel de acrilamida fracionados, sendo o gel de compactação a 4% e o de resolução a 10%. Em uma das canaletas foi aplicado marcador de peso molecular. O tampão de corrida utilizado foi um tampão pré-preparado (Bio-Rad, California, EUA). As proteínas foram separadas através da aplicação de 60 V até chegarem ao gel de resolução, e então uma voltagem de 100 V foi aplicada.

Após a corrida, as proteínas foram transferidas para membrana de nitrocelulose (Bio-Rad, Califórnia, EUA) com tampão de transferência pré-preparado (Bio-Rad, Califórnia, EUA). Logo após, empregou-se uma amperagem de 200 mA e 70 V por 1 hora.

A membrana de nitrocelulose foi então incubada com solução de bloqueio durante 1 hora à temperatura ambiente. A solução consistiu em leite em pó desnatado (20%) em PBS com tween a 0,1%. Após esse bloqueio, ela foi incubada com os seguintes anticorpos primários: anti-pERK1/2 (1:1000, Thr202/Tyr204, CST 9101) e anti-ERK1/2 (1:1000, CST 9102) (Cell Signaling Technology, Massachusetts, EUA) *overnight* a 4°C. O anticorpo secundário anti-coelho conjugado com peroxidase (1:2000, CST 7074) foi utilizado para incubar a membrana à temperatura ambiente por 1 hora. Após a incubação com o anticorpo secundário, a membrana foi lavada com PBS/tween 2x e com PBS 1x.

A reação foi detectada pelo sistema de detecção ECL com reagentes quimioluminescentes (Amersham Biosciences, Reino Unido). A membrana foi então exposta a um filme sensível a quimioluminescência (GE Life Sciences, Illinois, EUA). Posteriormente, a intensidade das bandas foi calculada usando o software ImageJ v.1.52e, a fim de quantificar pERK1/2 e ERK total. O resultado dessa quantificação foi usado para calcular o *fold-change*, razão entre pERK1/2 e ERK1/2 (pERK1/2/ERK1/2), do controle e das amostras tratadas. Em seguida, calculou-se a proporção, através de regra de três simples, das amostras tratadas em relação ao controle; sendo

que para esse cálculo, considerou-se o grupo controle como 1. Os experimentos foram realizados em triplicata.

#### ***4.8 Imunohistoquímica para imunocomplexo humano (HLA ABC) e murino (H2Db)***

Após os 55 dias de xenotransplante de MO, observou-se macroscopicamente um aumento da vascularização ao redor dos fragmentos implantados. A análise microscópica revelou a presença de capilares sanguíneos permeando as células neoplásicas. Seriam esses vasos derivados do paciente ou resultantes do processo de estabelecimento do modelo de PDX? Para responder à essa pergunta, realizou-se reações imunohistoquímicas direcionadas ao imunocomplexo humano (HLA ABC) e ao imunocomplexo murino (H2Db).

Inicialmente, os fragmentos de MO xenotransplantados foram fixados em formol e incluídos em parafina (amostras FFPE). Por meio de um micrótomo, as amostras FFPE foram seccionadas em cortes de 4µm de espessura. As etapas de desparafinização, hidratação e recuperação antigênica foram realizadas em etapa única com o reagente de trilogy (Cell Marque, Darmstadt, Alemanha) na concentração de 1:100. As lâminas com os cortes foram encubadas em solução de trilogy, que foi pré-aquecida em um micro-ondas na potência máxima até que fosse atingido no mínimo 90°C; quando essa temperatura foi alcançada, 2 banhos de 5 minutos cada foram realizados a uma menor potência (30w) para manter a temperatura de 90°C e evitar a fervura do reagente e secagem dos cortes.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com metanol (Neon, São Paulo, Brasil) e peróxido de hidrogênio a 10% (FARMAX, Minas Gerais, Brasil) na proporção de 1:1. Foram usados os seguintes anticorpos primários monoclonais de camundongo: anticorpo anti-MHC classe 1 H2 Db/H2 D1 (clone 28-14-8, ab25228) (Abcam, Cambridge, Reino Unido) em uma diluição de 1:50 e anticorpo anti-HLA ABC MHC classe 1 (clone EMR8-5, ab70328) em uma diluição de 1:400, ambos incubados por 2 horas cada em câmara úmida (EasyPath, São Paulo, Brasil).

A reação foi visualizada usando o sistema à base de polímeros *EnVision EnV+/HRP* (Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA) com DAB (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) como cromógeno. Os cortes foram contra corados com hematoxilina de Mayer (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). A omissão do anticorpo primário foi utilizada como controle negativo e, como controle positivo, foi empregada amostras de baços de camundongo e de hiperplasia fibrosa humana.

As imagens provenientes das reações de imunohistoquímica foram capturadas e digitalizadas por meio de microscópios e equipamentos do Centro de Aquisição e Processamento

de Imagens (CAPI-ICB/UFGM) e visualizadas através do software *CaseViewer* (CaseViewer 2.4 [64-bit version for Windows]). A imunoreatividade foi avaliada qualitativamente em positiva ou negativa. Em caso de positividade, classificou-a de acordo com o seu perfil marcação em nuclear ou citoplasmática.

## 5 RESULTADOS

Os resultados referentes à imunohistoquímica de pERK em amostras FFPE de MO, bem como os relacionados ao estabelecimento dos modelos *in vivo* e *in vitro* para inibição de MEK em amostras derivadas de paciente, foram compilados e publicados em forma de artigo científico na revista *Clinical Oral Investigations* (**Apêndice D**).

### 5.1 Caracterização das amostras

Do total de 9 amostras incluídas nesse estudo, uma era proveniente de um tumor coletado fresco e as outras 8 eram material FPPE. Os dados clínico-patológicos de todas as amostras estão sistematizados na tabela 2.

**Tabela 2. Dados clínico-patológicos dos casos de mixoma odontogênico**

Amostra	Sexo	Idade (anos)	Localização
#1	F	26	Maxila posterior
#2	F	14	Mandíbula posterior
#3	F	ND	Maxila posterior
#4	F	45	Maxila posterior
#5	F	28	Mandíbula posterior
#6**	M	29	Mandíbula posterior
#7	F	23	Mandíbula anterior
#8	M	41	Mandíbula posterior
#9	M	26	Mandíbula anterior

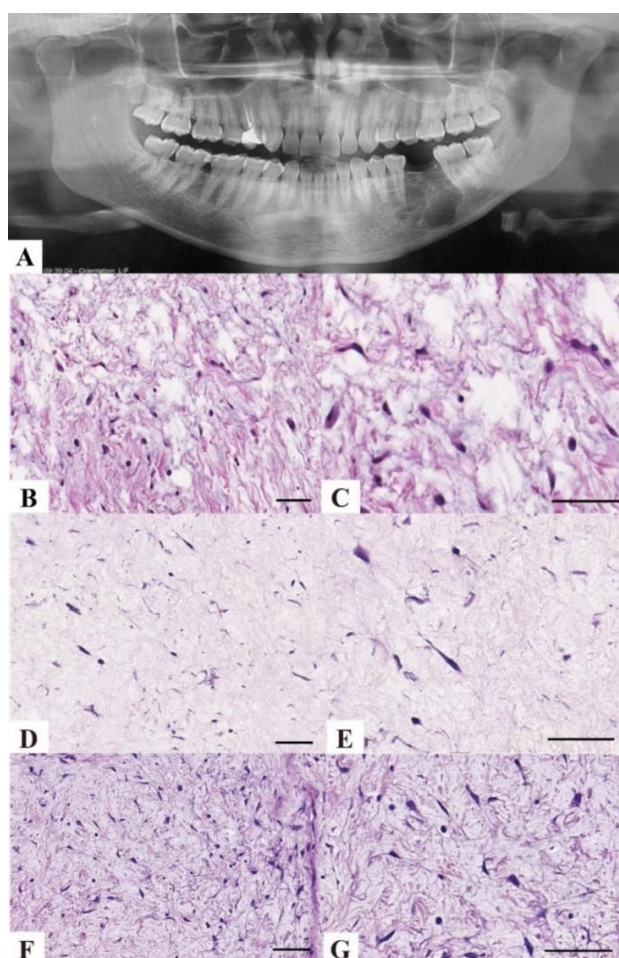
\*\* Amostra para modelo de PDX e para a cultura celular; F, feminino; M, masculino; ND, não disponível.

A idade média dos pacientes foi de 29 anos, com variação de idade entre 14 a 45 anos. A predileção pelo sexo feminino em detrimento do sexo masculino foi constada por meio da

proporção de 2:1. De uma forma geral, o acometimento da mandíbula foi observado em aproximadamente 67% dos casos (6/9), sendo que a região posterior foi afetada em aproximadamente 67% dos casos (4/6) e a anterior em 33% dos casos (2/6). Considerando os casos que ocorreram em maxila, a região posterior foi acometida pelo MO em 100% dos pacientes (3/3). No caso do tumor proveniente da amostra fresca, ele acometeu a região posterior da mandíbula do paciente (Figura 3A).

Histologicamente, os tumores foram caracterizados pela presença de células fusiformes e estreladas dispersas em uma matriz extracelular mixoide (Figura 3B-C).

**Figura 3.** Imagem radiográfica e histopatológica do mixoma odontogênico derivado do paciente do caso #6.

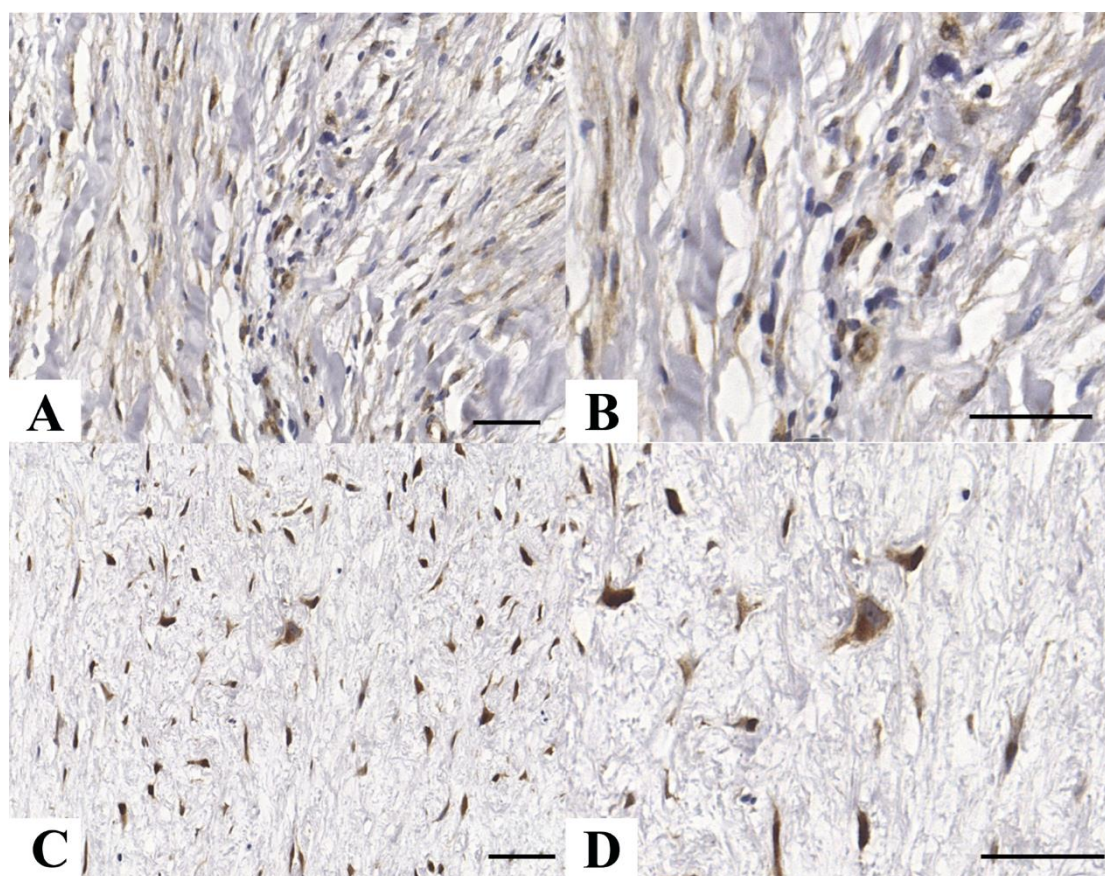


(A) Radiografia panorâmica mostrando uma lesão radiolúcida no corpo mandibular esquerdo. (B e C) Fotomicrografias do tumor primário humano mostrando as células fusiformes e estreladas dispersas em uma matriz mixoide. (D e E) Cultura de células e (F e G) xenoenxerto apresentando características histológicas similares ao observado no tumor primário. Escala gráfica = 50  $\mu$ M.

### 5.2 Avaliação de pERK 1/2 por imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímica para avaliação da ativação da via de sinalização MAPK/ERK revelaram forte marcação nuclear em todas as amostras de MO (9/9). Pôde-se observar também, imunoreatividade nos capilares sanguíneos que foram utilizados como controle interno da reação (Figura 4).

**Figura 4.** Expressão imunohistoquímica representativa para pERK1/2 nas amostras de mixoma odontogênico.



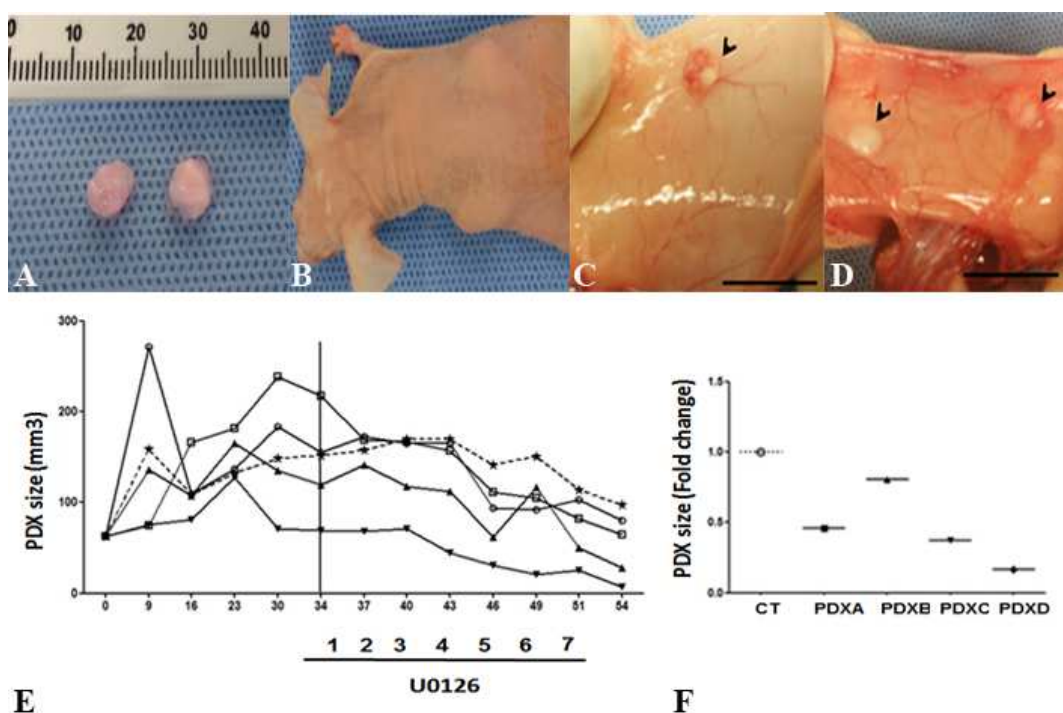
(A-D) Reação imunohistoquímica mostrando imunexpressão de pERK1/2 nas células fusiformes e estreladas do tumor e (A e B) nas células endoteliais dos vasos sanguíneos presentes nas amostras. Escala = 50  $\mu$ M.

### 5.3 Estabelecimento do PDX e inibição da MEK

Os fragmentos de xenoinxerto derivado de paciente mantiveram-se estáveis no microambiente murino por 55 dias e nenhuma área de necrose foi observada macro e microscopicamente em nenhum dos tumores. Macroscopicamente, o processo de angiogênese foi observado no tecido subcutâneo dos camundongos através da presença de vasos sanguíneos que recobriam o tumor, também foi constatado que eles apresentavam-se hiperemiados (Figura 5C-D).

No dia 34, os animais começaram a receber o tratamento com o inibidor de MEK U0126 (Figura 5E). Os valores de *fold-change* comparando a razão dos tamanhos dos xenoenxertos no dia 55 com o dia 34 mostraram redução no volume tumoral depois do tratamento (PDXA: 0.16, PDXB: 0.81, PDXC: 0.37, PDXD: 0.17) quando comparado com o controle (1.00) (Figura 5F), indicando uma redução percentual de 54% para o PDXA, 19% para o PDXB, 63% para o PDXC e 83% para o PDXD. Durante a necropsia dos camundongos, nenhuma alteração macro e microscópica foi observada no fígado, nos rins, nos pulmões, na pele e no baço. Histologicamente, as características do tumor primário mantiveram-se nos tumores xenotransplantados (Figura 3F-G).

**Figura 5.** Imagens obtidas durante o período de estabelecimento do modelo de xenoenxerto derivado de paciente, desde a preparação dos tumores até a avaliação macroscópica da área de implantação dos xenoenxertos.



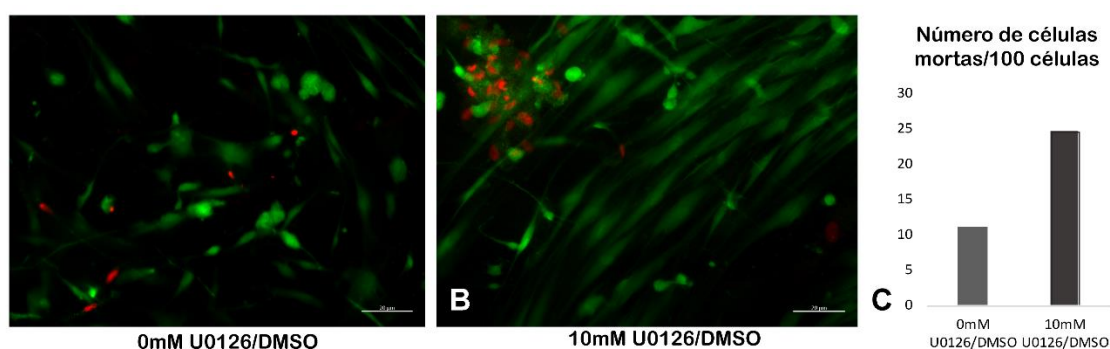
(A) Tamanho dos fragmentos do tumor primário antes da implantação. (B) Camundongo após a implantação subcutânea. (C e D) Remoção do xenoenxerto no 55º dia após a implantação dos tumores. (E) Gráfico de curva de crescimento. A linha pontilhada representa o xenoenxerto utilizado como controle (PDXCT) e a linha contínua representa os quatro tumores utilizados para o tratamento com o inibidor de MEK U0126. O tratamento teve início no 34º dia. A denominação dos fragmentos tratados pode ser observada através do gráfico (F) Fold change do volume dos PDXs, mostrando que, em relação ao controle (CT), todos tiveram o volume diminuído. Escala gráfica = 50  $\mu$ M.



#### 5.4 Estabelecimento da cultura organotípica 3D e inibição da MEK

Os explantes de MO mostraram a preservação da arquitetura tecidual em relação ao tumor primário (Figura 3D-E). Depois do tratamento com o inibidor de MEK U0126, foi observado uma diminuição da viabilidade celular, que foi constatada pelo aumento da presença de células mortas na cultura tratada com o fármaco em comparação com o grupo utilizado como controle (Figura 6).

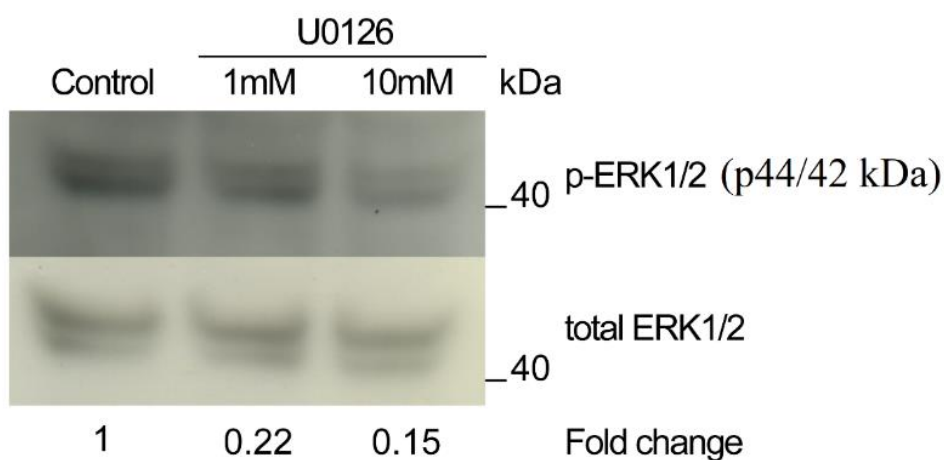
**Figura 6.** Análise do LIVE/DEAD após o tratamento do U0126 na cultura celular tridimensional



(A e B) As células viáveis estão marcadas com verde/calceína AM, enquanto as células com membranas danificadas estão marcadas com vermelho/Eth-D1. (B e C) Um aumento do número de células mortas foi observado na cultura tratada com o U0126. Escala gráfica = 20  $\mu$ M.

Microscopicamente, não foi observada nenhuma área sugestiva de processo degenerativo ou necrótico. O resultado do *western blot* mostrou uma diminuição no *fold change* de pERK1/2/ERK1/2 nas amostras tratadas com o inibidor de MEK U0126, indicando que houve inibição da ativação da via das MAPK com o fármaco (Figura 7).

**Figura 7.** *Imunoblot* representativo da inibição de MEK na cultura celular tridimensional



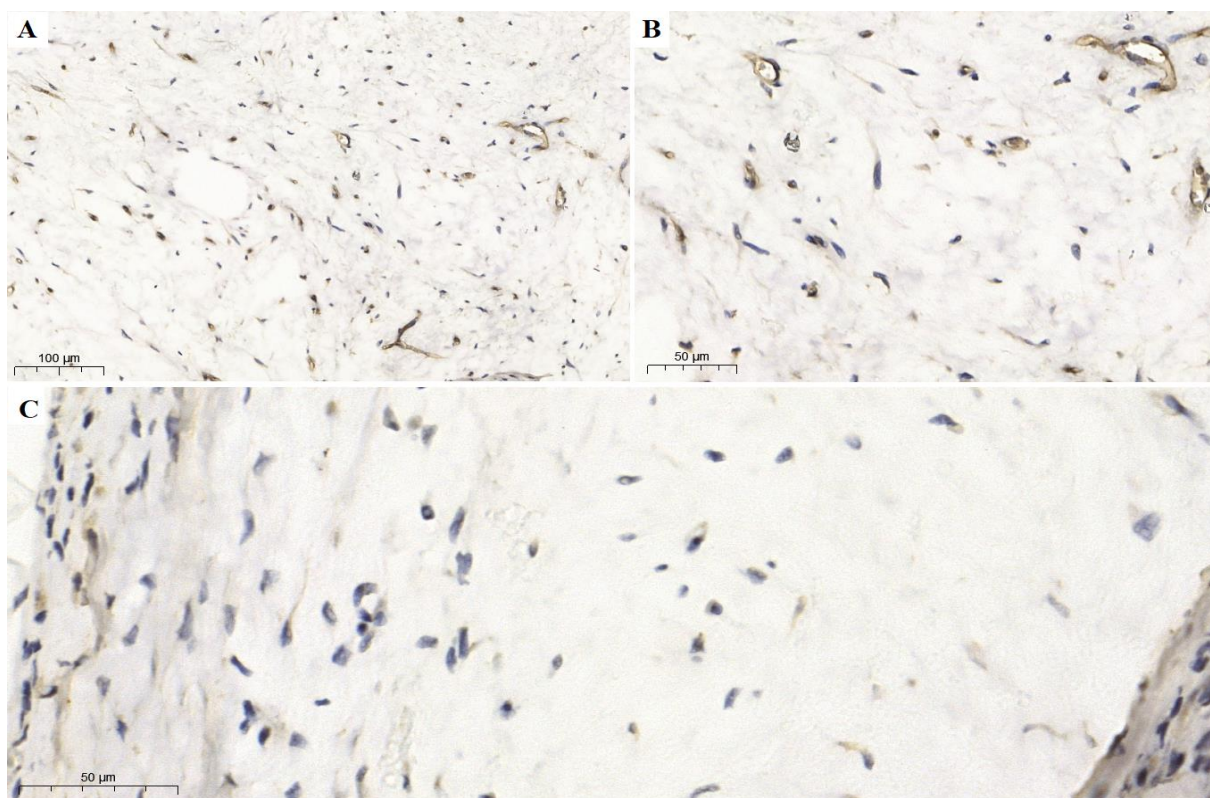
O U0126 inibiu de forma dose-dependente a fosforilação de ERK1/2 na cultura celular 3D. Os valores de *fold-change* representam a razão entre pERK1/2 e ERK1/2 total (pERK1/2/ERK1/2). Os experimentos foram realizados em triplicata.

A inibição da ativação da via pelo inibidor de MEK foi dose-dependente, uma vez que foi observada uma diminuição mais acentuada do *fold change* pERK1/2/ERK1/2 após o tratamento das células com 10mM do U0126 (*fold change* 0,15) do que com 1 mM do fármaco (*fold change* 0,22) (Figura 7).

### 5.5 Avaliação do imunocomplexo humano (HLA) e murino (H2Db) por imunohistoquímica

As reações de imunohistoquímica para investigar a origem dos vasos sanguíneos neoformados em meio às células neoplásicas do MO revelaram um perfil de marcação citoplasmática para o anticorpo anti-HLA MHC classe 1, indicando que esses pequenos vasos são derivados de células dopaciente humano (Figura 8 A-C).

**Figura 8.** Imunohistoquímica para investigar a origem dos vasos sanguíneos que permeiaram as células neoplásicas do xenoinxerto de MO.



(A e B) Imunoexpressão para imunocomplexo humano (HLA ABC) nos vasos sanguíneos tumor xenotransplantados. (C) Ausência de imunoexpressão para imunocomplexo murino (H2Db).

## 6 DISCUSSÃO

O MO é uma neoplasia intraóssea benigna caracterizada pela presença de células fusiformes e estreladas dispersas em uma abundante matriz extracelular mixoide, que acomete, principalmente, indivíduos entre a segunda e a quarta década de vida (ODELL; ADEBIYI, 2017). As lesões de menores tamanhos são assintomáticas e causam expansão indolor com a expansão contínua (ODELL; ADEBIYI, 2017; CHRCANOVIC; GOMEZ; 2019; SIMON *et al.*, 2004; BANASSER *et al.*, 2020), sendo ocasionalmente identificada em exames radiográficos de rotina, frequentemente como achados incidentais (JOHNSON *et al.*, 2014). Apesar de ser benigno, o MO é localmente agressivo e pode infiltrar e destruir os ossos adjacentes ao seu local de surgimento. O tratamento cirúrgico dessa lesão pode causar deformidades faciais e perdas dentárias. Além disso, há frequentes casos de recidiva após tratamentos mais conservadores (CHRCANOVIC; GOMEZ; 2019).

Apesar de inúmeros estudos terem sido realizados, a patogênese molecular do MO ainda não está completamente elucidada. Soma-se a isso, o fato de haver poucos trabalhos na literatura relacionados ao estabelecimento de modelos de estudo para o MO, seja *in vivo* ou *in vitro*. Ao mesmo tempo que esses modelos permitem que a tumorigênese das neoplasias possa ser esclarecida, eles possibilitam a identificação de novos alvos terapêuticos (LAI *et al.*, 2017). Considerando a prevalência do MO em indivíduos jovens e que o tratamento cirúrgico de lesões maiores frequentemente causa danos físicos, funcionais e estéticos para os pacientes (FARIÑA *et al.*, 2016), o presente estudo propôs a elaboração de um modelo de cultura tridimensional organotípica e de um modelo de xenoinxerto derivado de paciente com o intuito de que ensaios pré-clínicos pudessem ser realizados em amostras de MO derivadas de paciente, constituindo então uma possível terapia alternativa aos tratamentos cirúrgicos mais radicais e aos casos recorrentes.

A via das MAPK/ERK participa de vários processos celulares, incluindo os de proliferação, e está desregulada em várias neoplasias, incluindo tumores odontogênico (DINIZ *et al.*, 2017). Sua hiperativação pode ser conduzida por ativação anormal dos receptores celulares tirosina-quinase ou por mutações oncogênicas nos componentes da via (MARAMPON *et al.*, 2019). Além disso, devido aos *crossstalks* entre as vias de sinalização celulares, a via das MAPKs também pode ser indiretamente ativada por outros oncogenes (MAIK-RACHLINE; SEGER, 2016). Apesar de mutações *drivers* nos genes que codificam os componentes da via MAPK/ERK terem sido reportadas em alguns tumores odontogênicos, nenhuma mutação patogênica recorrente foi reportada para o MO (SANTOS *et al.*, 2017). Porém, sabe-se que a fosforilação de quinases

terminais, como ERK1/2, foram identificadas em tumores em que os genes da cascata de sinalização não estavam mutados (PLOTNIKOV *et al.*, 2011).

Dito isso, levantou-se a hipótese de que a via de sinalização MAPK/ERK poderia estar ativada indiretamente em amostras de MO. Decidiu-se então investigar a imunexpressão de pERK1/2, um marcador de ativação dessa via, e como resultado, foi encontrada forte expressão de pERK1/2 em todas as nove amostras de MO incluídas nesse projeto. A via MAPK/ERK é ativada por fosforilação nos resíduos Tyr e Thr, mediada por MEK (WORTZEL; SEGER, 2011). Foi demonstrado que ERK1/2 regulam processos de proliferação de células endoteliais e migração durante a angiogênese (NAGASAWA-MASUDA; TERAJ, 2016; SRINIVASAN *et al.*, 2009), e de acordo com a importância de ERK1/2 na angiogênese, observou-se imunexpressão positiva de pERK1/2 nas células endoteliais de todas as amostras de MO avaliadas.

Inúmeros alvos terapêuticos têm sido estabelecidos com o intuito de inibir a via MAPK, como a combinação de compostos inibitórios de *BRAF* e *MEK* concomitantemente em melanomas e câncer de pulmão com a mutação p.BRAFV600E (SULLIVAN *et al.*, 2017). Mutações em *MEK* e *ERK* são raras, mas sabe-se que ERK está ativada em uma proporção alta de neoplasias, porém inibidores dessa quinase terminal ainda estão em testes clínicos (MAIK-RACHLINE; SEGER, 2016; SULLIVAN *et al.*, 2017). Considerando que inibidores de MEK têm sido desenvolvidos e que estão clinicamente disponíveis (MAIK-RACHLINE; SEGER, 2016) e que pERK1/2 estava ativada em todas as amostras de MO, pretendeu-se avaliar o efeito do inibidor de MEK, U0126, nos modelos *in vivo* e *in vitro* propostos nesse estudo.

O U0126 é um inibidor potente e específico das quinases MEK1 e MEK2, que impede a fosforilação e ativação de ERK e, conseqüentemente, inibe a fosforilação *downstream* dessa quinase terminal (FAVATA *et al.*, 1998). Para testar os efeitos do U0126 *in vitro* e *in vivo*, estabeleceu-se um modelo de cultura celular organotípica 3D e um modelo de PDX para o MO. Considerando esses modelos em específico, vale ressaltar que não há descrito na literatura, nenhum modelo de PDX para o MO; e que, apenas Bastos e colaboradores (2019) foram pioneiros em propor um modelo 3D *in vitro* para esse tumor (BASTOS *et al.*, 2019).

O tratamento das células em cultura com o U0126 resultou em redução das taxas de pERK1/2 e ERK1/2 e, de acordo com os resultados *in vitro*, todos os xenoenxertos dos animais tratados mostraram redução do volume tumoral em comparação com o grupo controle. Marampon e colaboradores (2009) fizeram um estudo semelhante em que foi testado o efeito do U0126 *in vitro* e *in vivo* em amostras de rhabdomyosarcoma embrionário imunopositivas para pERK, e encontraram redução tumoral expressiva em ambos os ensaios realizados (MARAMPON *et al.*,

2009). No presente estudo, a análise por *western blot* demonstrou que o U0126 foi capaz de inibir a fosforilação de ERK de forma dose-dependente nas células de MO em cultura 3D. Esse resultado está de acordo com o que foi encontrado por Favata e colaboradores (1998) quando eles fizeram essa análise utilizando células COS-7 (FAVATA et al., 1998).

O uso de modelos de cultura celular 3D, bem como a utilização de modelos de PDX pode facilitar a investigação de abordagens terapêuticas e tem uma gama variada de vantagens, incluindo, a retenção das características fenotípicas do tumor primário (BASTOS *et al.*, 2019; PEARSON *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2019); o que está de acordo com os achados desse estudo, em que todos os fragmentos de MO *in vivo* (xenotransplantados em camundongos NUDE) e *in vitro* (em cultura celular 3D) mantiveram as características morfológicas do tumor derivado do paciente.

Em homeostase, o microambiente tumoral provê sinais supressores de tumor; no entanto, quando esse equilíbrio é perdido, o microambiente torna-se um promotor do crescimento do tumor (BISSEL; HINES, 2011). Além disso, a manutenção do fenótipo celular é fruto das interações entre as células desse microambiente e entre elas e a MEC (BISSEL; LABARGE, 2005). Considerando a importância do microambiente tumoral e da MEC no contexto de progressão das neoplasias, o estabelecimento de modelos que preservem essas características favorece o entendimento da patogênese tumoral; além de fornecer condições similares as que são encontradas nos pacientes, permitindo a abordagem de novos alvos terapêuticos. Esses dois fatores podem aumentar as chances de obter os mesmos resultados obtidos na fase pré-clínica na fase clínica de testes.

Modelos de cultura celular 2D (monocamada) são muito simples e não são capazes de mimetizar a complexidade e as interações dinâmicas das células do microambiente tumoral. O fato de as células crescerem em monocamada pode resultar na perda de sinalização celular e nas mudanças das respostas celulares frente aos estímulos (RODRIGUES *et al.*, 2020; DUVAL *et al.*, 2017; MABRY *et al.*, 2016; MELISSARIDOU *et al.*, 2019). A fim de superar essas desvantagens, modelos de cultura organotípica 3D têm sido propostos, por permitirem a co-cultura simultânea de células tumorais e estromais. Nesse sentido, utilizou-se a técnica de explante direto, porque ela retém o microambiente tumoral das células neoplásicas, o que permite a manutenção da complexidade tumoral (BASTOS *et al.*, 2019; MEIJER *et al.*, 2017). No entanto existem limitações que devem ser ponderadas, como a necessidade de uma quantidade maior de tecido a ser utilizada em comparação com outras técnicas; o risco de contaminação das células, mesmo com o uso de antibióticos e antimicóticos; e a senescência celular (BASTOS *et al.*, 2019). Porém,

essas desvantagens têm um peso relativamente baixo se considerarmos que essa é uma técnica de execução simples, relativamente barata e que permite a manutenção das características do tumor primário (BASTOS *et al.*, 2019).

O estabelecimento de culturas 3D para triagem de fármacos deve predizer os resultados dos testes em modelos pré-clínicos animais e, para isso, deve-se considerar fatores como a recapitulação da histologia *in vivo* (SHAMIR; EWALD, 2014). Levando isso em consideração, por esse estudo propor um novo alvo terapêutico para o MO, os experimentos realizados envolveram modelos de cultura celular 3D e de PDX.

Modelos de PDX são estabelecidos por meio do implante de fragmentos de tumor minimamente processados e/ou suspensão de células do tumor primário em camundongos imunodeficientes (Rygaard & Povlsen, 1969). Para gerá-los, pode-se usar células em suspensão a partir do tumor primário ou fragmentos de tumor minimamente processados. A utilização de células em suspensão é mais indicada para neoplasias malignas, uma vez que a taxa de sucesso pode ser mais alta quando o tumor é indiferenciado e agressivo (CUTZ *et al.*, 2006; GAZDAR; OIE, 1986; PHELPS *et al.*, 1996). Durante o processo de digestão celular, as células que sobrevivem podem ser induzidas a sofrer apoptose (JUNG *et al.*, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2013; ZVIBEL *et al.*, 2002) ademais, as células filtradas perdem o microambiente tumoral, o que pode resultar em maior dificuldade de enxerto (KARAMBOULAS *et al.*, 2020). O uso dos fragmentos de tumor minimamente processados tem como principal vantagem a presença do microambiente tumoral, que permite não só as interações entre as células neoplásicas, mas entre elas e as células do estroma (WILLIAMS *et al.*, 2013). Considerando que o microambiente tumoral é essencial para a progressão das neoplasias e que o MO é uma neoplasia bem diferenciada, utilizou-se, nesse estudo, como “fonte de material” fragmentos de tumores minimamente processados.

Baseado no local de implantação, os PDX são classificados como ortotópico ou heterotópico. O primeiro consiste na implantação de fragmentos do tumor na mesma área em que ele ocorre nos pacientes. Por outro lado, o sítio heterotópico baseia-se no xenotransplante da amostra tumoral em um local diferente do desenvolvimento do tumor primário, podendo ser subcutaneamente ou na capsula renal do camundongo (JUNG *et al.*, 2018; JIN *et al.*, 2010). Quando o xenotransplante é realizado na região subcutânea, temos um processo de implantação nos camundongos relativamente simples e, uma vez que o tumor cresce, ele pode ser mensurado com facilidade e precisão (LAI *et al.*, 2017); essa mensuração é ainda mais facilitada nos camundongos NUDE pela ausência de pelos nesses animais. No entanto, sua principal desvantagem é que esse local não mimetiza o microambiente do tumor primário (JIN *et al.*, 2010).

Em relação ao modelo de PDX proposto, pode-se relatar como fatores que impactam a taxa de sucesso dos xenoinxertos: a característica do tumor primário, a quantidade de tecido tumoral necessária para a implantação subcutânea, a coleta e armazenamento das amostras do tumor, a qualidade e temperatura do meio de coleta e o próprio processo de implantação em si (JUNG *et al.*, 2018).

Após 55 dias do xenoinxerto, observou-se microscopicamente a presença de pequenos vasos sanguíneos permeando as células neoplásicas. Levantou-se então a hipótese de que eles seriam provenientes do próprio camundongo, pois macroscopicamente havia o aumento da vascularização ao redor dos fragmentos minimamente processados de MO. Porém, esses vasos tiveram reação imunohistoquímica positiva apenas quando foi utilizado o anticorpo anti MHC 1 humano (HLA ABC), o que pode ser respaldado pelo fato do MO apresentar, microscopicamente, vasos sanguíneos escassos e capilares esparsos (SHIVASHANKARA *et al.*, 2017). A preservação da morfologia dos capilares sanguíneos derivados do paciente corrobora o fato de que o microambiente murino foi propício para a manutenção das características histológicas do MO, além de permitir a adaptação dos fragmentos minimamente processados em um microambiente diferente do local de origem do tumor primário

A raridade do MO reflete no número amostral desse estudo. Nesse sentido, futuros trabalhos que permitam a expansão dele fazem-se necessários para determinar se os achados iniciais são clinicamente promissores.

## CONCLUSÃO

Coletivamente, os resultados desse trabalho fornecem evidências de que alvos terapêuticos para MEK podem ser uma forma eficaz de inibir a ativação da via MAPK/ERK em amostras de MO imunopositivas para *perk1/2*, resultando em redução tumoral nos modelos de PDX e diminuição da viabilidade celular das células mantidas em cultura 3D. Além disso, o estabelecimento dos modelos *in vitro* e *in vivo* para o MO possibilitou a manutenção histológica do tumor primário. Especificamente, o modelo de PDX permitiu que as características morfológicas dos capilares sanguíneos provenientes do tumor do paciente fossem preservadas, sugerindo que a adaptação do tumor no microambiente murino obteve êxito. A boa reprodutibilidade tumoral nos modelos propostos permite que novos estudos de biologia básica e pré-clínica possam ser realizados no futuro.

## REFERÊNCIAS

- ANDRADE, FR; SOUSA, DP; MENDONÇA, EF. *et al.* Expression of bone resorption regulators (RANK, RANKL, and OPG) in odontogenic tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 106 n. 4, p. 548-555, 2008. DOI: 10.1016/j.tripleo.2008.05.042.
- APARICIO, S; HIDALGO, M, KUNG, AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer.*, v. 15, n. 5, p. 311-316, 2018. DOI: 10.1038/nrc3944.
- BANASSER, AM; BAWAZIR, MM; ISLAM, MN. *et al.* Odontogenic Myxoma: A 23-Year Retrospective Series of 38 Cases. *Head Neck Pathol.*, v. 14, n. 4, p. 1021-1027, 2020. DOI: 10.1007/s12105-020-01191-7.
- BAST, BT; POGREL, MA; REGEZI, JA. The expression of apoptotic proteins and matrix metalloproteinases in odontogenic myxomas. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 61, n. 12, p. 1463-1466, 2003. DOI: 10.1016/j.joms.2003.06.002.
- BASTOS, VC; PEREIRA, NB; DINIZ, MG. *et al.* Bringing benign ectomesenchymal odontogenic tumours to the lab: an in vitro study using an organotypic culture model. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 48, n. 2, p. 174-179, 2019. DOI: 10.1111/jop.12812.
- BATSAKIS, JG. Myxomas of soft tissues and the facial skeleton. *Ann Otol Rhinol Laryngol.*, v. 96, n. 5, p. 618-619, 1987. DOI: 10.1177/000348948709600527.
- BELIZARIO, JE. Immunodeficient mouse models: an overview. *Open Immunol.*, v. 2, p. 79-85, 2009. DOI: 10.2174/18742262000902010079.
- 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. DOI: 10.2350/15-05-1637-CR.1.
- BISSELL, MJ; LABARGE, MA. Context, tissue plasticity, and cancer: are tumor stem cells also regulated by the microenvironment?. *Cancer Cell.*, v. 7, n. 1, p. 17-23, 2005. DOI: 10.1016/j.ccr.2004.12.013.



BISSEL, MJ; HINES, WC. Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med.*, v. 17, n. 3, p. 320-329, 2011. DOI: 10.1038/nm.2328.

BOLOGNA-MOLINA, R; MOSQUEDA-TAYLOR, A; DOMÍNGUEZ-MALAGÓN, H. *et al.* Immunolocalization of VEGF-A and orosomucoid-1 in odontogenic myxoma. *Rom J Morphol Embryol.*, v. 56, n. 2, p. 465-473, 2015.

BOSON, WL; GOMEZ, RS; ARAUJO, L. *et al.* Odontogenic myxomas are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. *Anticancer Res.*, v. 18, n. 6A, p. 4415-4417, 1998.

CALLES, A; RUBIO-VIQUEIRA, B; HIDALGO, M. Primary human non-small cell lung and pancreatic tumorgraft models--utility and applications in drug discovery and tumor biology. *Curr Protoc Pharmacol.*, Chapter 14, 2013. DOI: 10.1002/0471141755.ph1426s61 .

CHRCANOVIC, BR; GOMEZ, RS. Odontogenic myxoma: An updated analysis of 1,692 cases reported in the literature. *Oral Diseases*, v. 25, n. 3, p. 676–683, 2019. DOI: 10.1111/odi.12875.

CICCARELLI, C; DI ROCCO, A; GRAVINA, GL. *et al.* Disruption of MEK/ERK/c-Myc signaling radiosensitizes prostate cancer cells in vitro and in vivo. *J Cancer Res Clin Oncol.* v. 144, n. 9, p. 1685-1699, 2018. doi:10.1007/s00432-018-2696-3.

CONTARTESE, D; SALAMANNA, F; VERONESI, F. *et al.* Relevance of humanized three-dimensional tumor tissue models: a descriptive systematic literature review. *Cell Mol Life Sci.* v. 77, n. 20, p. 3913-3944, 2020. DOI: 10.1007/s00018-020-03513-y.

COURA, BP; BERNARDES, VF; DE 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, 2019. DOI: 10.1038/s41379-018-0194-4.

CUTZ, JC; GUAN, J; BAYANI, J. *et al.* Establishment in severe combined immunodeficiency mice of subrenal capsule xenografts and transplantable tumor lines from a variety of primary human lung cancers: potential models for studying tumor progression-related changes. *Clin Cancer Res.*, v. 12, n. 13, p. 4043-4054, 2006. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0252.

DELANEY, D; DISS, TC; PRESNEAU, N. *et al.* GNAS1 mutations occur more commonly than previously thought in intramuscular myxoma. *Mod Pathol.*, v. 22, n. 5, p. 718-724, 2009. doi:10.1038/modpathol.2009.32.

DE MARCO, L; STRATAKIS, CA; BOSON, WL. *et al.* Sporadic cardiac myxomas and tumors from patients with Carney complex are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. *Hum Genet.*, v. 98, n. 2, p. 185-188, 1996. doi: 10.1007/s004390050187.

DE SIQUEIRA, EC; DE SOUSA, SF; CARLOS, R. *et al.* Odontogenic myxomas lack *PDGFRB* mutations reported in myofibromas. *J Oral Pathol Med.*, v. 49, n. 3, p. 278-283, 2020. DOI: 10.1111/jop.13004.

DINIZ, MG; GOMES, CC; DE SOUSA SF. *et al.* Oncogenic signaling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol*, v. 72, p. 165–173, 2017. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2017.07.021.

DUVAL, K; GROVER, H; HAN, LH. *et al.* Modeling Physiological Events in 2D vs. 3D Cell Culture. *Physiology (Bethesda)*., v. 32, n. 4, p. 266-277, 2017. DOI: 10.1152/physiol.00036.2016.

EVANS, KW; YUCA, E; AKCAKANAT, A. *et al.* Population of heterogeneous breast cancer patient-derived xenografts demonstrate broad activity of PARP inhibitor in BRCA1/2 wild-type tumors. *Clin Cancer Res.*, v. 23, n. 21, p. 6468-6477, 2017. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-17-0615.

FARIÑA, R; ALISTER, JP; URIBE, F, Olate S. *et al.* Indications of Free Grafts in Mandibular Reconstruction, after Removing Benign Tumors: Treatment Algorithm. *Plast Reconstr Surg Glob Open.*, v. 4, n. 8, e845, 2016. DOI: 10.1097/GOX.0000000000000832.

FLANAGAN, SP. 'Nude', a new hairless gene with pleiotropic effects in the mouse. *Genet Res.*, v. 8, n. 3, p. 295-309, 1966. DOI: 10.1017/s0016672300010168.

FAVATA, MF; HORIUCHI, KY, MANOS, EJ. *et al.* Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem.*, v. 273, n. 29, p. 18623-18632, 1998. DOI: 10.1074/jbc.273.29.18623.

FRIEDRICH, RE; HAGEL C; ZUSTIN, J. Expression of the Insulin-like Growth Factor-1 Receptor in Odontogenic Myxoma. *Anticancer Res*, v. 36, n. 6, p. 3103-3107, 2016.

FRIEDRICH, RE; SCHEUER, HA; ASSAF, AT. *et al.* Odontogenic myxomas are not associated with GNAS1 mutations. *Anticancer Res.*, v. 32, n. 5, p. 2169-2172, 2012.

FUJITA, S; HIDESHIMA, K; IKEDA, T. Nestin expression in odontoblasts and odontogenic ectomesenchymal tissue of odontogenic tumours. *J Clin Pathol*, v. 59, n.3, p.240-245, 2006. DOI: 10.1136/jcp.2004.025403.

GAZDAR, AF; OIE, HK. Cell culture methods for human lung cancer. *Cancer Genet Cytogenet.*, v. 19 1-2, p. 5-10, 1986. DOI: 10.1016/0165-4608(86)90365-1.

GARCIA, PL; MILLER, AL; GAMBLIN, TL. *et al.* JQ1 induces DNA damage and apoptosis, and inhibits tumor growth in a patient-derived xenograft model of cholangiocarcinoma. *Mol Cancer Ther.*, v. 17, n. 1, p. 107-118, 2018. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-16-0922.

GIOVANELLA, BC; FOGH, J. The nude mouse in cancer research. *Adv Cancer Res.*, v. 44, p. 69-120, 1985. DOI: 10.1016/s0065-230x(08)60026-3.

GODISHALA SWAMY, SR; NAAG, S; BAHL, S. *et al.* Odontogenic myxoma: A causality dilemma - Report of a nonpareil case and review of literature. *J Oral Maxillofac Pathol.*, v. 22, Suppl. 1, p. S2-S6, 2018. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP\_120\_16.

GOMES, CC; DE SOUSA, SF; DE MENEZES, GH. *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol*, v. 56, p. e3-e5, 2016. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2016.03.001.

GOMES, CC.; DINIZ, MG.; DUARTE, AP. *et al.* Molecular review of odontogenic myxoma. *Oral Oncol*, v. 47, n. 5, p. 325-328, 2011. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2011.03.006.

GONZÁLEZ-GALVÁN, MC; MOSQUEDA-TAYLOR, A; BOLOGNA-MOLINA, R. *et al.* Evaluation of the osteoclastogenic process associated with RANK/RANK-L/OPG in odontogenic myxomas. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.*, v. 23, n. 3, p. e315-e319, 2018. DOI: 10.4317/medoral.22372.

GUIMARÃES, DM; ANTUNES, DM; DUARTE, CM. *et al.* DNA methyltransferase immunohistochemical expression in odontogenic tumours. *J Oral Pathol Med.*, v. 44, n. 1, p. 59-66, 2015. DOI: 10.1111/jop.12208.

GUO, M; WEI, H; HU, J. *et al.* U0126 inhibits pancreatic cancer progression via the KRAS signaling pathway in a zebrafish xenotransplantation model. *Oncol Rep.*, v. 34, n. 2, p. 699-706, 2015. doi:10.3892/or.2015.4019.

HAYDEN, PJ; HARBELL, JW. Special review series on 3D organotypic culture models: Introduction and historical perspective. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* p. 1-9, 2020. DOI: 10.1007/s11626-020-00500-2.

HIDALGO, M; AMANT, F, BIANKIN, AV. *et al.* Patient-derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov.*, v. 4, n. 9, p. 998-1013, 2014. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-14-0001.

IWAMOTO, C; TAKENAKA, K; URATA, S. *et al.* The BALB/c-specific polymorphic SIRPA enhances its affinity for human CD47, inhibiting phagocytosis against human cells to promote xenogeneic engraftment. *Exp Hematol.*, n. 42, v. 3, p. 163-171, 2014. DOI: 10.1016/j.exphem.2013.11.005.

JIN, K; TENG, L; SHEN, Y. *et al.* Patient-derived human tumour tissue xenografts in immunodeficient mice: a systematic review. *Clin Transl Oncol.*, v. 12, n. 7, p. 473-480, 2010. DOI: 10.1007/s12094-010-0540-6.

JOHNSON, NR; GANNON, OM; SAVAGE, NW. *et al.* Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *J Investig Clin Dent*, v. 5, n.1, p. 9-14, 2014. DOI: 10.1111/jicd.12044.

JUNG, J; SEOL, HS; CHANG, S. The generation and application of patient-derived xenograft model for cancer research. *Cancer Res Treat.*, v. 50, n. 1, p. 1-10, 2018. DOI: 10.4143/crt.2017.307.

KAFFE, I; NAOR, H; BUCHNER, A. Clinical and radiological features of odontogenic myxoma of the jaws. *Dentomaxillofac Radiol*, v. 26, n. 5, p. 299-303, 1997. DOI: 10.1038/sj.dmfr.4600261.

KANSY, K; JUERGENS, P; KROL, Z. *et al.* Odontogenic myxoma: diagnostic and therapeutic challenges in paediatric and adult patients - a case series and review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg.*, v. 40, n. 3, p. 271-276, 2012. DOI: 10.1016/j.jcms.2011.04.009.

KARAMBOULAS, C; MEENS, J; AILLES, L. Establishment and use of patient-derived xenografts models for drug testing in head and neck squamous cell carcinoma. *STAR protocols*, v. 1:100024, 2020. DOI: 10.1016/j.xpro.2020.100024.

KATO, S; LIPPMAN, SM; FLAHERTY, KT, *et al.* The Conundrum of Genetic "Drivers" in Benign Conditions. *J Natl Cancer Inst.*, v. 108, n. 8, 2016. DOI: 10.1093/jnci/djw036.

KIM, MP; EVANS, DB; WANG, H. *et al.* Generation of orthotopic and heterotopic human pancreatic cancer xenografts in immunodeficient mice *Nat Protoc.*, v. 4, n. 11, p. 1670-80, 2009. DOI: 10.1038/nprot.2009.171.

KOHNKEN, R; PORCU, P; MISHRA, A. Overview of the use of murine models in leukemia and lymphoma research. *Front Oncol.*, v. 7, n. 22, 2017. DOI: 10.3389/fonc.2017.00022.

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. DOI: 10.1002/path.4317.

LAI, Y; WEI, X; LIN, S. *et al.* Current status and perspectives of patient-derived xenograft models in cancer research. *J Hematol Oncol.*, v. 10, n. 1:106, 2017. DOI: 10.1186/s13045-017-0470-7.

MABRY, KM; PAYNE, SZ; ANSETH, KS. Microarray analyses to quantify advantages of 2D and 3D hydrogel culture systems in maintaining the native valvular interstitial cell phenotype. *Biomaterials.*, v. 74, p. 31-41, 2016. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2015.09.035.

MAIK-RACHLINE, G; SEGER, R. The ERK cascade inhibitors: Towards overcoming resistance. *Drug resistance updates: reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer chemotherapy*, v. 25, p. 1–12, 2016. DOI: 10.1016/j.drug.2015.12.001.

MARAMPON, F; BOSSI, G, CICCARELLI, C. *et al.* MEK/ERK inhibitor U0126 affects in vitro and in vivo growth of embryonal rhabdomyosarcoma. *Mol Cancer Ther.*, v. 8, n. 3, p. 543-551, 2009. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-08-0570.

MARAMPON, F; CICCARELLI, C; ZANI, BM. Biological Rationale for Targeting MEK/ERK Pathways in Anti-Cancer Therapy and to Potentiate Tumour Responses to Radiation. *Int J Mol Sci.*, v. 20, n. 10, p. 2530, 2019. DOI: 10.3390/ijms20102530.

MARINO-ENRIQUEZ, A; FLETCHER, CD. Shouldn't we care about the biology of benign tumours?. *Nat Rev Cancer.*, v. 14, n. 11, p. 701-702, 2014. DOI: 10.1038/nrc3845.

MEIJER, TG; NAIPAL, KA; JAGER, A; VAN GENT, DC. *Ex vivo* tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA.*, v. 3, n. 2, FSO190, 2017. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0003.

MEIJER, TG; NAIPAL, KA; JAGER, A. *et al.* *Ex vivo* tumor culture systems for functional drug testing and therapy response prediction. *Future Sci OA*, v. 3, n. 2, FSO190, 2017. DOI: 10.4155/fsoa-2017-0003.

MELISSARIDOU, S; WIECHEC, E; MAGAN, M. *et al.* The effect of 2D and 3D cell cultures on treatment response, EMT profile and stem cell features in head and neck cancer. *Cancer Cell Int.*, v. 19:16, 2019. DOI: 10.1186/s12935-019-0733-1.

MELOCHE, S; POUYSSÉGUR, J. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, v. 26, n. 22, p. 3227-3239, 2007. DOI: 10.1038/sj.onc.1210414.

MERZ, F; GAUNITZ, F; DEHGHANI, F. *et al.* Organotypic slice cultures of human glioblastoma reveal different susceptibilities to treatments. *Neuro Oncol*, v. 15, n. 6, p. 670–681, 2013. DOI: 10.1093/neuonc/not003.

MILANI, C; WELSH, J; KATANYAMA, M. *et al.* Human breast tumor slices: a model for identification of vitamin D regulated genes in the tumor microenvironment. *J Steroid Biochem Mol Biol*, v. 121, n. 1–2, p. 151–155, 2010. DOI: 10.1016/j.jsbmb.2010.03.051.

MISALE, S; BOZIC, I; TONG, J. *et al.* Vertical suppression of the EGFR pathway prevents onset of resistance in colorectal cancers. *Nat Commun.*, v. 6:8305, 2015. DOI: 10.1038/ncomms9305.

MIYAGI, SP; HIRAKI, KR, MARTINS, MD. *et al.* Expression of matrix metalloproteinases 2 and 9 in odontogenic myxoma in vivo and in vitro. *J Oral Sci.*, v. 50, n. 2, p. 187-192, 2008. DOI: 10.2334/josnusd.50.187.

MONTAGUT, C; SETTLEMAN, J. Targeting the RAF-MEK-ERK pathway in cancer therapy. *Cancer Lett* v., 283, p. 125–134, 2009. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.01.022.

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. DOI: 10.1590/s0103-64402011000500013.

NAGASAWA-MASUDA, A; TERAJ, K. ERK activation in endothelial cells is a novel marker during neovasculogenesis. *Genes Cells.*, v. 21, n. 11, p. 1164-1175, 2016. DOI: 10.1111/gtc.12438.

NAKAO, Y; MITSUYASU, T; KAWANO, S. *et al.* Fibroblast growth factors 7 and 10 are involved in ameloblastoma proliferation via the mitogen-activated protein kinase pathway. *Int J Oncol.* v. 43, n. 5, p. 1377-1384, 2013. doi:10.3892/ijo.2013.2081.

NEHLS, M; PFEIFER, D; SCHORPP, M. *et al.* New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations. *Nature.*, v. 372, n. 6501, p. 103-107, 1994. DOI: 10.1038/372103a0.

NOFFKE, CE; RAUBENHEIMER, EJ; CHABIKULI, NJ; BOUCKAERT, MM. Odontogenic myxoma: review of the literature and report of 30 cases from South Africa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* v. 104, n.1, p. 101-109, 2007. doi:10.1016/j.tripleo.2007.01.026.

NONAKA, CF; AUGUSTO VIANNA GOULART FILHO, J; CRISTINA DA COSTA MIGUEL, M. *et al.* Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases 1, 2, and 9 in odontogenic myxoma and dental germ papilla. *Pathol Res Pract.*, v. 205, n. 7, p. 458-465, 2009. DOI: 10.1016/j.prp.2009.01.004.

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

OKADA, S; VAETEEWOOTTACHARN, K; KARIYA, R. Establishment of a Patient-Derived Tumor Xenograft Model and Application for Precision Cancer Medicine. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, v. 66, n. 3, p. 225-230, 2018. DOI: 10.1248/cpb.c17-00789.

OKADA, S; VAETEEWOOTTACHARN, K; KARIYA, R. Application of highly immunocompromised mice for the establishment of patient-derived xenograft (PDX) models. *Cells*, v. 8, n. 8, p. 889, 2019. DOI: 10.3390/cells8080889.

PACAK, K; SIROVA, M; GIUBELLINO, A. *et al.* NF- $\kappa$ B inhibition significantly upregulates the norepinephrine transporter system, causes apoptosis in pheochromocytoma cell lines and prevents metastasis in an animal model. *Int J Cancer.*, v. 131, v. 10, p. 2445-2455, 2012. DOI: 10.1002/ijc.27524.

PEARSON, AT; FINKEL, KA; WARNER, KA. *et al.* Patient-derived xenograft (PDX) tumors increase growth rate with time. *Oncotarget.*, v. 7, n. 7, p. 7993-8005, 2016. DOI: 10.18632/oncotarget.6919.

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. DOI: 10.1002/gcc.20232.

PEREIRA, NB; DE SOUZA, JC; BASTOS, VC. *et al.* Patient-derived xenografts of a case of ameloblastic fibrodentinoma. *Oral Dis.*, v. 25, n. 4, p. 1229-1233, 2019. DOI: 10.1111/odi.13056.

PHELPS, RM; JOHNSON, BE; IHDE DC. *et al.* NCI-navy medical oncology branch cell line data base. *J Cell Biochem Suppl.*, v. 24, p. 32-91, 1996. DOI: 10.1002/jcb.240630505.

PLOTNIKOV, A; ZEHORAI, E; PROCACCIA, S. *et al.* The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochim Biophys Acta*, v. 1813, n. 9, p. 1619-1633, 2011. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2010.12.012.

PRIOLO, C; AGOSTINI, M; VENA, N. *et al.* Establishment and genomic characterization of mouse xenografts of human primary prostate tumors. *Am J Pathol.*, v. 176, n. 4, p. 1901-1913, 2010. DOI: 10.2353/ajpath.2010.090873.



REYAL, F; GUYADER, C, DECRAENE, C. *et al.* Molecular profiling of patient-derived breast cancer xenografts. *Breast Cancer Res* ., v. 14, n. 1, 2012. DOI: 10.1186/bcr3095.

RICHMOND, A; SU, Y. Mouse xenograft models vs GEM models for human cancer therapeutics. *Dis Model Mech*, v. 1, n. 2-3, p. 78-82, 2008. DOI: 10.1242/dmm.000976.

RIJAL, G; LI, W. 3D scaffolds in breast cancer research. *Biomaterials*. v. 81, p. 135-156, 2016. doi:10.1016/j.biomaterials.2015.12.016.

RODRIGUES, J; HEINRICH, MA; TEIXEIRA, LM. *et al.* 3D In Vitro Model (R)evolution: Unveiling Tumor-Stroma Interactions. *Trends Cancer*. v. S2405-8033, n. 20, p. 30283-1, 2020. DOI: 10.1016/j.trecan.2020.10.009.

RYGAARD, J; POVLSEN, CO. Heterotransplantation of a human malignant tumour to "Nude" mice. *Acta Pathol Microbiol Scand.*, v. 77, n. 4, p. 758-760, 1969. DOI: 10.1111/j.1699-0463.1969.tb04520x.

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. DOI: 10.1111/jop.12598.

SATO, K; TERAJ, K; OZAKI, M. *et al.* Odontogenic myxofibroma with HMGA2 overexpression and HMGA2 rearrangement. *Pathol Int.*, v. 60, n. 11, p. 760-764, 2010. DOI: 10.1111/j.1440-1827.2010.02589.x.

SHAMIR, ER; EWALD, AJ. Three-dimensional organotypic culture: experimental models of mammalian biology and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.*, v. 15, n. 10, p. 647-664, 2014. DOI: 10.1038/nrm3873.

SHIVASHANKARA, C; NIDONI, M; PATIL S. *et al.* Odontogenic myxoma: A review with report of an uncommon case with recurrence in the mandible of a teenage male. *Saudi Dent J.*, v. 29, n. 3, p. 93-101, 2017. DOI: 10.1016/j.sdentj.2017.02.003.

SHULTZ, LD, GOODWIN, N; ISHIKAWA, F. *et al.* Human cancer growth and therapy in immunodeficient mouse models. *Cold Spring Harb Protoc.*, v. 2014, n. 7, p. 694-708, 2014. DOI: 10.1101/pdb.top073585.

SHULTZ, LD; LYONS, BL; BURZENSKI, LM. *et al.* Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engrafted with mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol.*, v. 174, n. 10, p. 6477-6489, 2005. DOI: 10.4049/jimmunol.174.10.6477.

SIMON, EM; 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. DOI: 10.1016/j.ijom.2003.12.004.

SIVAPATHASUNDHARAM, B.; PROTYUSHA, GB; PREETHI S. The World Health Organization Classification of Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors: An appraisal. *J Oral Maxillofac Pathol*, v. 23, n. 2, p. 178-186, 2019. DOI: 10.4103/jomfp.JOMFP\_211\_19.

SONG, CQ; LI, Y; MOU, H. *et al.* Genome-Wide CRISPR Screen Identifies Regulators of Mitogen-Activated Protein Kinase as Suppressors of Liver Tumors in Mice. *Gastroenterology*. v. 152, n. 5, p. 1161-1173.e1, 2017. doi:10.1053/j.gastro.2016.12.002.

SRINIVASAN, R; ZABUAWALA, T; HUANG, H. *et al.* Erk1 and Erk2 regulate endothelial cell proliferation and migration during mouse embryonic angiogenesis. *PLoS One.*, v. 4, n. 12, p.:e8283, 2009. DOI: 10.1371/journal.pone.0008283.

SULLIVAN, RJ; INFANTE, JR, JANJU, F. *et al.* First-in-Class ERK1/2 Inhibitor Ulixertinib (BVD-523) in Patients with MAPK Mutant Advanced Solid Tumors: Results of a Phase I Dose-Escalation and Expansion Study. *Cancer Discov.*, v. 8, n. 2, p. 184-195, 2018. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-17-1119.

SZADVARI, I; KRIZANOVA, O; BABULA, P. Athymic nude mice as an experimental model for cancer treatment. *Physiol Res.*, v. 65, n. 4, p. S441-S453, 2016. DOI: 10.33549/physiolres.933526.

TAKAHASHI, H; FUJITA, S; OKABE, H. Immunohistochemical investigation in odontogenic myxoma. *J Oral Pathol Med.*, v. 20, n. 3, p. 114-119, 1991. DOI: 10.1111/j.1600-0714.1991.tb00903.x.

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

TENTLER, JJ; TAN, AC; WEEKES, CD. *et al.* Patient-derived tumour xenografts as models for oncology drug development. *Nat Ver Clin Oncol.*, v. 9, n. 6, p. 338-350, 2012. DOI: 10.1038/nrc3845.

VALVERDE, TM; CASTRO, EG; CARDOSO, MH. *et al.* A novel 3D bone-mimetic scaffold composed of collagen/MTA/MWCNT modulates cell migration and osteogenesis. *Life Sci.*, v. 162, p. 115-124, 2016. DOI: 10.1016/j.lfs.2016.08.003.

VAN VLIET, E; JENKINSON, EJ; KINGSTON, R. *et al.* Stromal cell types in the developing thymus of the normal and nude mouse embryo. *Eur J Immunol.*, v. 15, n. 7, p. 675-681, 1985. DOI: 10.1002/eji.1830150707.3.

WILLIAMS, SA; ANDERSON, WC; SANTAGUIDA, MT. *et al.* Patient-derived xenografts, the cancer stem cell paradigm, and cancer pathobiology in the 21st century. *Lab Invest.*, v. 93, n. 9, p. 970-982, 2013. DOI: 10.1038/labinvest.2013.92.

WORTZEL, I; SEGER, R. "The ERK Cascade: Distinct Functions within Various Subcellular Organelles." *Genes & cancer.*, v. 2,3, p. 195-209, 2011. DOI: 10.1177/1947601911407328.

WRIGHT, JM.; SOLUK, MT. Odontogenic tumors: where are we in 2017? *J Istanb Univ Fac Dent*, v. 51, n. 3 Suppl 1, p. S10-S30, 2017. DOI: 10.17096/jiufd.52886.

ZHANG, B; ZHANG, J; HUANG, HZ. *et al.* Inhibition of ameloblastoma invasion in vitro and in vivo by inhibitor of metalloproteinase-2 activity. *J Oral Pathol Med.*, v. 38, n. 9, p. 731-736, 2009. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00771.x.

ZHANG, D; WU, X; CHEN, J. *et al.* The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioact Mater.*, v. 3, n. 1, p. 129-138, 2017. DOI: 10.1016/j.bioactmat.2017.08.004.

ZHANG, X; CLAERHOUT, S, PRAT, A. *et al.* A renewable tissue resource of phenotypically stable, biologically and ethnically diverse, patient-derived human breast cancer xenograft models. *Cancer Res.*, v. 73, n. 15, p. 4885-4897, 2013. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-12-4081.

ZHAO, M; LU, Y; TAKATA, T. *et al.* Immunohistochemical and histochemical characterization of the mucosubstances of odontogenic myxoma: Histogenesis and differential diagnosis. *Pathology Research and Practice*, v. 195, n. 6, p. 391-397, 1999. DOI: 10.1016/S0344-0338(99)80012-0.

ZHAO, X; LIU, Z, YU, L. *et al.* Global gene expression profiling confirms the molecular fidelity of primary tumor-based orthotopic xenograft mouse models of medulloblastoma. *Neuro Oncol.*, v. 14, n. 5, p. 574-583, 2012. DOI: 10.1093/neuonc/nos061.

ZVIBEL, I; SMETS, F; SORIANO, H. Anoikis: roadblock to cell transplantation?. *Cell Transplant.*, v. 11, n. 7, p. 621-630, 2002. DOI:10.3727/000000002783985404.

YE, H; ZHANG, Y; WANG, Y. *et al.* The restraining effect of baicalein and U0126 on human cervical cancer cell line HeLa. *Mol Med Rep.*, v. 16, n. 1, p. 957-963, 2017. doi:10.3892/mmr.2017.6648.

YOSHIDA, GJ. Applications of patient-derived tumor xenograft models and tumor organoids. *J Hematol Oncol.*, v. 13, n. 1, 2020. DOI: 10.1186/s13045-019-0829-z.


YUAN, J; DONG, X; YAP, J. *et al.* The MAPK and AMPK signalings: interplay and implication in targeted cancer therapy. *Journal of hematology & oncology*, v. 13, n. 1, p. 113, 2020. DOI: 10.1186/s13045-020-00949-4.

## APÊNDICES

**Apêndice A** – Artigo científico de revisão publicado no periódico *Experimental and Molecular Pathology* englobando diversos tipos de neoplasias benignas para as quais já foram gerados modelos de PDX

Experimental and Molecular Pathology 120 (2021) 104630

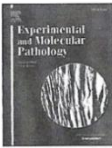
---




Contents lists available at ScienceDirect

### Experimental and Molecular Pathology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/yexmp](http://www.elsevier.com/locate/yexmp)



---

Review 

## Patient-derived xenograft models for the study of benign human neoplasms

Juliana Cristina de Souza<sup>a</sup>, Lucyene Miguita<sup>a</sup>, Ricardo Santiago Gomez<sup>b</sup>,  
Carolina Cavaliéri Gomes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Pathology, Biological Science Institute (ICB), Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

---

**ARTICLE INFO**

**Keywords:**  
 Patient-derived xenograft models  
 PDX  
 Benign tumors  
 Malignant tumors  
 Mice models  
 Personalized medicine

**ABSTRACT**

Preclinical models are a core feature of translational research, and patient-derived xenograft (PDX) models have increasingly been used with such purpose. PDX involves the transplantation of fresh human tumor samples into immunodeficient mice to overcome immunologic rejection. It is a valuable tool for basic as well as preclinical research, contributing to the establishment of models to characterize the neoplasms to drug screening and to allow the identification of therapeutic targets. The use of these models is justified because they retain the histological and genomic features of the primary tumor. PDX models are well described for malignant neoplasms, for which the advantages are clear and include the development of drug treatments. The establishment of malignant tumors PDX is undeniably important from a medical perspective. However, few studies have used such models for benign neoplasms. The use of PDX for benign neoplasm studies can help to clarify the pathobiology of these diseases, as well as invasion and malignant transformation mechanisms, which from a biological perspective is equally important to the study of malignant tumors. Therefore, the aim of this study is to review the current methodology for PDX model generation and to cover its main applications, focusing on benign neoplasms.

---

### 1. Introduction

The use of animal models, including mouse ones, is important for oncology as they allow the development of preclinical studies (Okada et al., 2019; Richmond and Su, 2008). There are several advantages of using mice in research, including the fact that they share physiological and genetic similarity with humans; they have a small size, which makes them easy to handle; their breeding cycle and life span are also short, resulting in a reduced time to conduct an *in vivo* research (Kohnken et al., 2017). Patient-derived xenograft (PDX) mouse models are among the most advanced preclinical models (Jung et al., 2018) to study benign and malignant neoplasms.

PDX models are established by transplanting patients' primary tumors fragments/ cell suspension into immunodeficient mice, in order to overcome immunologic rejection (Rygaard and Povlsen, 1969). Such models can preserve the phenotype of the tumor derived from the patient, as shown in studies that observed the same histological features in PDX as in the primary tumors (Aparicio et al., 2018; Hidalgo et al., 2014; Pereira et al., 2019; Pereira et al., 2020; Singh et al., 2004; Zhang et al.,

2013). Another advantage of PDX models is that they preserve the genomic profile of the primary human tumor (Evans et al., 2017; Garcia et al., 2018; Misale et al., 2015; Reyat et al., 2012; Yoshida, 2020; Zhao et al., 2012). Moreover, these models allow tumor cells to grow in a microenvironment with essential supplies, as seen in humans. Collectively, all these advantages are valuable for basic and preclinical research, contributing to the characterization of therapeutic targets, in addition to providing the opportunity for drug screening (Lai et al., 2017; Jung et al., 2018; Tentler et al., 2012).

The first successful heterotopic PDX was established in 1969 by Rygaard and Povlsen, who xenotransplanted a sigmoid colon adenocarcinoma from a 74-year-old woman subcutaneously into NUDE mice (Rygaard and Povlsen, 1969). Before that, many other attempts of establishing PDX of malignant neoplasms failed due to immune rejection, and neonatal thymectomy was helpful in increasing the success of this technique, but the immune response limitation was overcome by using NUDE immunodeficient mice (Rygaard and Povlsen, 1969). Since then, these models have been established for several human cancers (Calles et al., 2013; Hidalgo et al., 2014; Kim et al., 2009). With regard

\* Corresponding author at: Department of Pathology, Biological Science Institute (ICB), Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

E-mail addresses: [julianacs@ufmg.br](mailto:julianacs@ufmg.br) (J.C. de Souza), [lumiguita@ufmg.br](mailto:lumiguita@ufmg.br) (L. Miguita), [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br) (R.S. Gomez), [carolinacgomes@ufmg.br](mailto:carolinacgomes@ufmg.br) (C.C. Gomes).

<https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2021.104630>

Received 21 December 2020; Received in revised form 7 February 2021; Accepted 14 March 2021

Available online 17 March 2021

0014-4800/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.

## Apêndice B – Parecer N° 1.295.542

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 1.295.542

Somos favoráveis à aprovação do projeto "Estabelecimento e caracterização de modelo xenotransplantável de ameloblastomas humanos em murinos" do Pesquisador Responsável Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Aprovado conforme parecer.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_541272.pdf	14/10/2015 13:55:27		Acelto
Outros	Diligencia_COEP.doc	14/10/2015 13:53:51	Ricardo Santiago Gomez	Acelto
Folha de Rosto	folhaDeRosto (1).pdf.docx	15/07/2015 09:33:38		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto de xenotransplante 07-05-2015 (2).docx	15/07/2015 09:29:37		Acelto
Outros	folhaDeRosto (1).pdf.docx	15/07/2015 09:23:32		Acelto
Outros	Parecer Camara Departamental.docx	14/07/2015 13:02:38		Acelto
Outros	Termo de compromisso.docx	14/07/2015 13:01:56		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE e Termo de assentimento ultima versao (1).doc	13/07/2015 14:47:17		Acelto

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

BELO HORIZONTE, 26 de Outubro de 2015

Assinado por:

**Telma Campos Medeiros Lorentz**  
(Coordenador)

## Apêndice C – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido e Termo de Assentimento Livre e Esclarecido (TALE)

### Apêndice C.1 – TALE para menores de idade

#### Termo de assentimento para menores de idade

#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado para participar das pesquisas “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DE TUMORES ODONTOGÊNICOS” e “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO XENOTRANSPLANTÁVEL DE AMELOBLASTOMAS HUMANOS EM MURINOS”. Nós pedimos aos seus pais para que você participe mas você não precisa participar da pesquisa se não quiser, é um direito seu, não terá nenhum problema se desistir.

Queremos desenvolver uma ferramenta que ajude a entender melhor porque alguns tumores aparecem e crescem na boca, e também tentar descobrir novos tratamentos para eles. Para isso, vamos coletar um pequeno pedaço do tumor após a sua cirurgia, e também um pequeno pedaço da parte normal da boca durante os pontos da cirurgia. Nós vamos comparar as diferenças entre o tumor e a parte normal da boca.

O pedaço do tumor será cultivado, multiplicado em laboratório e poderá ser mantido por um longo tempo e ser usado em outros estudos futuros. Nós não vamos vender o material cultivado a partir do tumor que vai ser coletado em hipótese alguma. Você tem o direito de pedir que o material que vamos cultivar seja jogado fora (descartado), se você quiser e quando quiser.

Este estudo não oferecerá mais riscos para você, além dos riscos da própria cirurgia e aqueles relacionados ao sentimento de ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo e nem você vai receber nada para participar. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor o que pode levar ao desenvolvimento dos tumores odontogênicos, e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença no futuro.

Nós vamos coletar o pequeno pedaço após a sua cirurgia e isso não vai mudar em nada o seu tratamento. Ninguém vai saber que você está participando da pesquisa, não falaremos a outras pessoas, nem daremos a estranhos as informações que você nos der. Os resultados da pesquisa vão ser publicados, mas sem identificar ninguém que participou da pesquisa.

Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar aos pesquisadores (Marina ou Ricardo). Eu escrevi os telefones e endereço na parte de baixo desse texto.

\_\_\_\_\_  
RICARDO SANTIAGO GOMEZ  
(SUPERVISOR)

\_\_\_\_\_  
MARINA GONÇALVES DINIZ  
(PESQUIADORA)

\_\_\_\_\_  
NÚBIA BRAGA PEREIRA  
(PESQUIADORA)

#### DECLARAÇÃO DE ASSENTIMENTO

Eu \_\_\_\_\_ aceito participar das pesquisas “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DE TUMORES ODONTOGÊNICOS” e “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO XENOTRANSPLANTÁVEL DE AMELOBLASTOMAS HUMANOS EM MURINOS”, que tem o objetivo desenvolver uma ferramenta de estudo para entender melhor os tumores odontogênico. Entendi que posso dizer “sim” e participar, mas que, a qualquer momento, posso dizer “não” e desistir sem que ninguém fique furioso. Os pesquisadores tiraram minhas dúvidas e conversaram com os meus responsáveis. Recebi uma cópia deste termo de assentimento e li e concordo em participar da pesquisa.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO MENOR

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO MENOR

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ Nº \_\_\_\_\_

**Pesquisadores: Ricardo Santiago Gomez/Marina Gonçalves Diniz. Telefones: (31) 3409-2477 / 9153-2190. Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG: Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II, 2º andar – Sala 2005 Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG. Telefax (31) 3409-4592**

## Apêndice C.2 – TCLE destinado ao responsável por menor de idade (inferior a 6 anos)

### TCLE destinado a responsável por menores de idade (inferior a 6 anos)

#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TEMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O(a) seu(sua) filho(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado(a) a participar das pesquisas “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DE TUMORES ODONTOGÊNICOS” e “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO XENOTRANSPLANTÁVEL DE AMELOBLASTOMAS HUMANOS EM MURINOS”.

Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acometem indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade desenvolver uma ferramenta que ajude a compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores e possíveis tratamentos futuros.

Caso você autoriza a participação do(a) seu(sua) filho(a) nesta pesquisa, será necessário a coleta de um pequeno pedaço do tumor após a cirurgia. O pedaço do tumor será cultivado e multiplicado em laboratório para que possamos estudar os processos que ocorrem dentro dos tumores e que levam ao desenvolvimento deles. Este material cultivado poderá ser mantido por um longo período de tempo e nenhum uso comercial será feito em hipótese alguma. Você tem o direito de pedir que o material cultivado seja descartado a qualquer momento, se desejar.

O pequeno pedaço do tumor será coletado após a cirurgia e não comprometerá nem o diagnóstico do tumor e nem o tratamento do(a) seu(sua) filho(a). Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletado durante a realização dos pontos/acerto da ferida cirúrgica. A coleta do material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor.

O material que vamos cultivar a partir do tumor coletado poderá ser usado também em outros estudos posteriores. Os estudos posteriores podem revelar alterações genéticas no(a) seu(sua) filho(a) que aumentam a chance dele(dela) desenvolver algumas doenças. Caso alguma alteração genética ligada ao risco do seu(sua) filho(a) ter alguma doença no futuro for descoberta em estudos posteriores, você gostaria de ficar sabendo? Marque sua resposta (Sim ou Não) no final deste documento.

Todos os resultados serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e seu supervisor terão conhecimento de identidade do seu(sua) filho(a) e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos sobre a metodologia empregada, antes e durante todo o curso da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade para se recusar a autorizar a participação ou para retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao tratamento do(a) seu(sua) filho(a). Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia que seu(sua) filho(a) será submetido(a) e aqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo ou ressarcimento para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento dos tumores odontogênicos, e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença no futuro.

Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar aos pesquisadores (Marina ou Ricardo). Os telefones e endereço na parte de baixo desse texto.

\_\_\_\_\_  
RICARDO SANTIAGO GOMEZ  
(SUPERVISOR)

\_\_\_\_\_  
MARINA GONÇALVES DINIZ  
(PESQUIADORA)

\_\_\_\_\_  
NÚBIA BRAGA PEREIRA  
(PESQUIADORA)

#### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados da pesquisa para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito e o direito do(a) meu(minha) filho(a) de não ser identificado. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer prejuízo ou represálias ao cuidado do meu(minha) filho(a).

DATA: / /



### Apêndice C.3 – TCLE destinado ao responsável por menor de idade (7 a 12 anos)

#### TCLE destinado a responsável por menores de idade (7 a 12 anos)

#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TEMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O(a) seu(sua) filho(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado(a) a participar das pesquisas “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DE TUMORES ODONTOGÊNICOS” e “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO XENOTRANSPLANTÁVEL DE AMELOBLASTOMAS HUMANOS EM MURINOS”.

Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acometem indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade desenvolver uma ferramenta que ajude a compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores e possíveis tratamentos futuros.

Caso você autoriza a participação do(a) seu(sua) filho(a) nesta pesquisa, será necessário a coleta de um pequeno pedaço do tumor após a cirurgia. O pedaço do tumor será cultivado e multiplicado em laboratório para que possamos estudar os processos que ocorrem dentro dos tumores e que levam ao desenvolvimento deles. Este material cultivado poderá ser mantido por um longo período de tempo e nenhum uso comercial será feito em hipótese alguma. Você tem o direito de pedir que o material cultivado seja descartado a qualquer momento, se desejar.

O pequeno pedaço do tumor será coletado após a cirurgia e não comprometerá nem o diagnóstico do tumor e nem o tratamento do(a) seu(sua) filho(a). Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletado durante a realização dos pontos/acerto da ferida cirúrgica. A coleta do material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor.

O material que vamos cultivar a partir do tumor coletado poderá ser usado também em outros estudos posteriores. Os estudos posteriores podem revelar alterações genéticas no(a) seu(sua) filho(a) que aumentam a chance dele(dela) desenvolver algumas doenças. Caso alguma alteração genética ligada ao risco do seu(sua) filho(a) ter alguma doença no futuro for descoberta em estudos posteriores, você gostaria de ficar sabendo? Marque sua resposta (Sim ou Não) no final deste documento.

Todos os resultados serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e seu supervisor terão conhecimento de identidade do seu(sua) filho(a) e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos sobre a metodologia empregada, antes e durante todo o curso da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade para se recusar a autorizar a participação ou para retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao tratamento do(a) seu(sua) filho(a). Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia que seu(sua) filho(a) será submetido(a) e aqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo ou ressarcimento para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento dos tumores odontogênicos, e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença no futuro. Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar aos pesquisadores (Marina ou Ricardo). Os telefones e endereço na parte de baixo desse texto.

\_\_\_\_\_  
RICARDO SANTIAGO GOMEZ  
(SUPERVISOR)

\_\_\_\_\_  
MARINA GONÇALVES DINIZ  
(PESQUIADORA)

\_\_\_\_\_  
NÚBIA BRAGA PEREIRA  
(PESQUIADORA)

#### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados da pesquisa para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito e o direito do(a) meu(minha) filho(a) de não ser identificado. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer prejuízo ou represálias ao cuidado do meu(minha) filho(a).

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL  
DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

Nº \_\_\_\_\_

## Apêndice C.4 – TCLE destinado ao responsável por adolescentes (14 a 18 anos)

### TCLE destinado a responsável por adolescentes (14 a 18 anos)

#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TEMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

O(a) seu(sua) filho(a) \_\_\_\_\_ está sendo convidado(a) a participar das pesquisas “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DE TUMORES ODONTOGÊNICOS” e “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO XENOTRANSPLANTÁVEL DE AMELOBLASTOMAS HUMANOS EM MURINOS”.

Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acometem indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade desenvolver uma ferramenta que ajude a compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores e possíveis tratamentos futuros.

Caso você autoriza a participação do(a) seu(sua) filho(a) nesta pesquisa, será necessário a coleta de um pequeno pedaço do tumor após a cirurgia. O pedaço do tumor será cultivado e multiplicado em laboratório para que possamos estudar os processos que ocorrem dentro dos tumores e que levam ao desenvolvimento deles. Este material cultivado poderá ser mantido por um longo período de tempo e nenhum uso comercial será feito em hipótese alguma. Você tem o direito de pedir que o material cultivado seja descartado a qualquer momento, se desejar.

O pequeno pedaço do tumor será coletado após a cirurgia e não comprometerá nem o diagnóstico do tumor e nem o tratamento do(a) seu(sua) filho(a). Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletado durante a realização dos pontos/acerto da ferida cirúrgica. A coleta do material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor.

O material que vamos cultivar a partir do tumor coletado poderá ser usado também em outros estudos posteriores. Os estudos posteriores podem revelar alterações genéticas no(a) seu(sua) filho(a) que aumentam a chance dele(dela) desenvolver algumas doenças. Caso alguma alteração genética ligada ao risco do seu(sua) filho(a) ter alguma doença no futuro for descoberta em estudos posteriores, você gostaria de ficar sabendo? Marque sua resposta (Sim ou Não) no final deste documento.

Todos os resultados serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente a pesquisadora e seu supervisor terão conhecimento de identidade do seu(sua) filho(a) e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos sobre a metodologia empregada, antes e durante todo o curso da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade para se recusar a autorizar a participação ou para retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao tratamento do(a) seu(sua) filho(a). Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia que seu(sua) filho(a) será submetido(a) e aqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo ou ressarcimento para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento dos tumores odontogênicos, e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença no futuro. Se você tiver alguma dúvida, você pode perguntar aos pesquisadores (Marina ou Ricardo). Os telefones e endereço na parte de baixo desse texto.

\_\_\_\_\_  
RICARDO SANTIAGO GOMEZ  
(SUPERVISOR)

\_\_\_\_\_  
MARINA GONÇALVES DINIZ  
(PESQUIADORA)

\_\_\_\_\_  
NÚBIA BRAGA PEREIRA  
(PESQUIADORA)

#### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados da pesquisa para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito e o direito do(a) meu(minha) filho(a) de não ser identificado. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer prejuízo ou represálias ao cuidado do meu(minha) filho(a).

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
NOME DO RESPONSÁVEL  
DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO RESPONSÁVEL

Nº \_\_\_\_\_

## Apêndice C.5 – TCLE destinado a indivíduos maiores de 18 anos

### TCLE destinado a indivíduos maiores de 18 anos

#### UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS TEMOS DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

Você está sendo convidado(a) a participar das pesquisas “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE LINHAGEM CELULAR DE TUMORES ODONTOGÊNICOS” e “ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE MODELO XENOTRANSPLANTÁVEL DE AMELOBLASTOMAS HUMANOS EM MURINOS”.

Os tumores odontogênicos são tumores que se originam dos tecidos que formam os dentes e acometem indivíduos de diferentes idades. Esta pesquisa tem como finalidade desenvolver uma ferramenta que ajude a compreender melhor as causas que levam ao desenvolvimento destes tumores e possíveis tratamentos futuros.

Casa você autoriza a sua participação nesta pesquisa, será necessário a coleta de um pequeno pedaço do tumor após a sua cirurgia. Este pedaço será cultivado e multiplicado em laboratório para que possamos estudar os processos que ocorrem dentro dos tumores e que levam ao desenvolvimento deles. Este material cultivado poderá ser mantido por um longo período de tempo e nenhum uso comercial será feito em hipótese alguma. Você tem o direito de pedir que o material cultivado seja descartado a qualquer momento, se desejar.

O pequeno pedaço será coletado após a cirurgia e não comprometerá nem o diagnóstico do tumor e nem ao seu tratamento. Uma pequena amostra do tecido normal da boca será também coletado durante a realização dos pontos/acerto da ferida cirúrgica. A coleta do material normal vai permitir que possamos comparar os resultados obtidos neste material com os resultados obtidos no tumor.

O material cultivado do tumor poderá ser usado também em outros estudos posteriores. Estudos posteriores podem revelar alterações genéticas que aumentam a chance de desenvolver algumas doenças. Caso alguma alteração genética ligada ao risco de ter alguma doença futura for descoberta, você gostaria de ficar sabendo? Marque sua resposta (Sim ou Não) ao final deste documento.

Todos os resultados serão utilizados apenas para pesquisa e ensino. Todas as informações coletadas neste estudo são estritamente confidenciais. Somente o(a) pesquisador(a) e seu(sua) orientador(a) terão conhecimento da sua identidade e nos comprometemos a mantê-la em sigilo ao publicar os resultados dessa pesquisa.

Estamos a sua disposição para esclarecimentos sobre a metodologia empregada, antes e durante todo o curso da pesquisa. Em qualquer fase desta pesquisa, você terá a liberdade para se recusar a participar ou para retirar seu consentimento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu tratamento. Este estudo não oferecerá riscos, além daqueles próprios da cirurgia que será submetido(a) e aqueles relacionados à ansiedade de participar de um projeto de pesquisa. Este estudo também não terá nenhum custo ou ressarcimento para você. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor os mecanismos que podem levar ao desenvolvimento dos tumores odontogênicos, e isso será muito importante para que possamos melhor conduzir o tratamento da doença no futuro.

\_\_\_\_\_  
RICARDO SANTIAGO GOMEZ  
(SUPERVISOR)

\_\_\_\_\_  
MARINA GONÇALVES DINIZ  
(PESQUIADORA)

\_\_\_\_\_  
NÚBIA BRAGA PEREIRA  
(PESQUIADORA)

#### TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações precedentes. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas. Autorizo a coleta de um fragmento do tecido que já será removido por motivo de cirurgia. Autorizo, ainda, a utilização dos dados da pesquisa para divulgação com finalidade de ensino e pesquisa, respeitando sempre o meu direito de não ser identificado. Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa posso retirar este consentimento, sem quaisquer prejuízo ou represálias.

LOCAL: \_\_\_\_\_ DATA: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
NOME DO PACIENTE

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PACIENTE

DOCUMENTO APRESENTADO: \_\_\_\_\_ N° \_\_\_\_\_

Caso alguma alteração genética ligada ao aumento de risco para alguma doença seja descoberta em pesquisas posteriores que utilizará o material cultivado do tumor que vamos coletar após a sua cirurgia, você deseja ser informado(a)? Sim \_\_\_ Não \_\_\_

**Apêndice D** – Artigo científico publicado no periódico *Clinical Oral Investigations* com os resultados obtidos nesse projeto.

Clinical Oral Investigations  
<https://doi.org/10.1007/s00784-019-03107-4>

ORIGINAL ARTICLE



## First insights for targeted therapies in odontogenic myxoma

Núbia Braga Pereira<sup>1</sup> · Victor Coutinho Bastos<sup>1</sup> · Juliana Cristina de Souza<sup>1</sup> · Marina Gonçalves Diniz<sup>1</sup> · Jéssica Gardone Vitória<sup>2</sup> · Gregory Thomas Kitten<sup>3</sup> · Luciana de Oliveira Andrade<sup>3</sup> · Gleide Fernandes de Avelar<sup>3</sup> · Wagner Henriques Castro<sup>2</sup> · Vanessa Fátima Bernardes<sup>1</sup> · Adriana Abalen Martins Dias<sup>4</sup> · Ricardo Santiago Gomez<sup>2</sup> · Carolina Cavalieri Gomes<sup>1</sup>

Received: 11 July 2019 / Accepted: 30 September 2019  
 © Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2019

### Abstract

**Objective** Odontogenic myxoma (OM) occasionally responds poorly to surgical treatment. The MAPK pathway is constitutively activated in several neoplasms and we aimed to test if the MAPK pathway is activated in OM, in order to pave the way for an alternative therapy for aggressive and recurrent cases.

**Materials and methods** The immunoeexpression of phosphorylated ERK1/2 (pERK1/2) was assessed in OM. We established a 3D organotypic culture model for the in vitro study and patient-derived xenografts (PDX) in mice for the in vivo study. The MEK inhibitor U0126 was used to inhibit phosphorylation of ERK1/2 in the in vitro and in vivo models.

**Results** All OM showed strong pERK1/2 immunoeexpression, consistent with MAPK pathway activation. Treatment of the 3D culture with U0126 resulted in a reduced pERK1/2/ERK1/2 ratio. Consistent with the in vitro results, all PDX of animals treated with U0126 showed a decreased volume fold change compared with controls.

**Conclusions** The MAPK pathway is activated in OM and its inhibition leads to tumor shrinkage in PDX and cell culture models.

**Clinical relevance** Our results offer a pre-clinical frame for OM-targeted therapy. Further work is needed to determine if this initial finding holds clinical promise.

**Keywords** Odontogenic tumors · MEK inhibition · Targeted therapy · ERK · MAPK pathway · 3D cell culture · PDX

Núbia Braga Pereira, Victor Coutinho Bastos, Juliana Cristina de Souza and Carolina Cavalieri Gomes contributed equally to this work.

✉ Carolina Cavalieri Gomes  
[carolinacgomes@ufmg.br](mailto:carolinacgomes@ufmg.br)

<sup>1</sup> Department of Pathology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha, Belo Horizonte, Brazil

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

<sup>3</sup> Department of Morphology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup> Department of General Biology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

### Introduction

Odontogenic myxoma (OM) is a benign odontogenic neoplasm of ectomesenchymal origin. OM usually presents bone expansion, showing a multilocular appearance and asymptomatic cortical perforation [1]. OM is mainly located in the mandible with most cases diagnosed in the second to fourth decades of life [2]. Conservative surgery is associated with higher probability of tumor recurrence, so tumor enucleation followed by peripheral osteotomy should be preferred [1]. The recurrence rate of OM is not associated with location, presence of bone expansion, cortical perforation, and radiographic features [1].

The molecular pathogenesis of OM is not completely elucidated [3]. Immunohistological studies have shown the expression of matrix metalloproteinases (MMPs) and apoptotic/antiapoptotic proteins in OM [4]. We previously screened sporadic OM for *PRKARIA* alterations and observed decreased expression of this protein, as well as mutations in the coding region of the gene in a low proportion of the samples (2/17) [5]. In addition, in another study, we detected