

**TAYNARA ASEVEDO CAMPOS DE RESENDE**

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO *BRAF* p.V600E EM  
NEVOS MELANOCÍTICOS E MELANOMAS MUCOSOS ORAIS**

**Faculdade de Odontologia  
Universidade Federal de Minas Gerais  
Belo Horizonte  
2021**

Taynara Asevedo Campos de Resende

**ESTUDO DA FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO *BRAF* p.V600E EM  
NEVOS MELANOCÍTICOS E MELANOMAS MUCOSOS ORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração em Patologia Bucal.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Cavaliéri Gomes  
**Coorientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa de Fátima Bernardes

Belo Horizonte  
2021

## Ficha Catalográfica

R433e Resende, Taynara Asevedo Campos de.  
2021 Estudo da frequência da mutação *BRAF* p.V600E em nevos  
T melanocíticos e melanomas mucosos orais / Taynara Asevedo  
Campos de Resende. -- 2021.

56 f. : il.

Orientadora: Carolina Cavaliéri Gomes.

Coorientadora: Vanessa de Fátima Bernardes.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Nevo pigmentado. 2. Melanoma. 3. Oncogenes. 4.  
Neoplasias bucais. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II.  
Bernardes, Vanessa de Fátima. III. Universidade Federal de  
Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

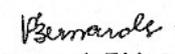
ESTUDO DA FREQUÊNCIA DA MUTAÇÃO BRAF p.V600E EM NEVOS MELANOCÍTICOS E MELANOMAS MUCOSOS ORAIS

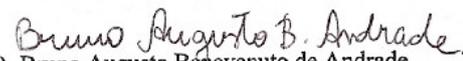
**TAYNARA ASEVEDO CAMPOS DE RESENDE**

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

Aprovada em 16 de julho de 2021, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Carolina Cavaliéri Gomes – Orientadora  
FO-UFMG

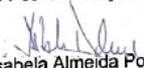
  
Prof(a). Vanessa de Fátima Bernardes  
FO-UFMG

  
Prof(a). Bruno Augusto Benevenuto de Andrade  
Universidade Federal do Rio de Janeiro

  
Prof(a). Marina Gonçalves Diniz  
UFMG

Belo Horizonte, 16 de julho de 2021.

Defesa Homologada pelo Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia em 26 /07 /2021.

  
Profa. Isabela Almeida Pordeus  
Coordenadora  
Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFMG

Dedico este trabalho aos meus pais e familiares que me guiaram pelo caminho da educação.

## AGRADECIMENTO

Este trabalho é fruto de minha estadia no mestrado acadêmico e da colaboração de muitas pessoas que me apoiaram no trabalho e pessoalmente nesse momento atípico que vivenciamos, a pandemia pelo SARS-CoV-2, que nos impôs restrições, muitas vezes limitando nossos projetos, e solicitou adaptações das mais diversas.

Deixo aqui meu agradecimento especial à Carolina, que me orientou desde os passos iniciais pela biologia molecular. E agradeço de modo conjunto à Carolina e à Vanessa, que são fonte de inspiração como professoras e cientistas, pela dedicação, por me acompanharem nessa caminhada e pela oportunidade de desenvolver essa pesquisa. Quero agradecer também ao professor Ricardo por toda sua contribuição para esse estudo e pelas oportunidades de aprendizagem no espaço do laboratório e nas aulas. Agradeço aos meus colegas de laboratório e trabalho, em especial à Bruna e à Thaís. E aos nossos colaboradores Wilson Delgado-Azãnero, Adalberto Mosqueda-Taylor e Oslei Paes de Almeida que gentilmente cederam suas amostras. E, em especial, agradeço ao Bruno A. B. de Andrade que teve um papel fundamental nas etapas iniciais desse projeto, tanto na obtenção dos espécimes quanto no trabalho experimental. Gratidão também a toda a equipe de professores e técnicos da Faculdade de Odontologia, que nos inspiram a contribuir para o desenvolvimento da patologia e nos apóiam solícitamente e com excelência.

Agradeço também aos meus colegas da patologia e da estomatologia, Victor, Isadora, Carolina, Daniela, Gabriela, Flávia e Eustáquio, com os quais aprendi muito. Obrigada pela convivência, apoio, e pela troca de experiências. Agradeço aos meus pais, irmãos e ao Lucas, aos meus padrinhos e familiares, e aos amigos de Belo Horizonte e São João Del-Rei por todo apoio e incentivo nessa jornada.

Por fim, agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico pelo apoio financeiro.

“(...) coisa alguma, em si mesma, se constitui como problema ou descoberta; ela pode ser um problema somente se produz perplexidade e incômodo a alguém, e será uma descoberta se aliviar alguém do peso do problema.”

Michael Polanyi

## RESUMO

Nevos melanocíticos são neoplasias benignas derivadas de melanócitos. O nevo melanocítico adquirido comum cutâneo é frequente na pele humana e apresenta maior incidência na terceira década de vida. E, embora uma taxa pequena de transformação maligna tenha sido estimada, considera-se que os nevos adquiridos sejam precursores de uma parcela dos melanomas cutâneos. A mutação somática *BRAF* p.V600E, que ativa a via MAPK/ERK e proliferação celular, está implicada na formação dos nevos adquiridos comuns de pele e de um grupo de melanomas cutâneos, de sítios não cronicamente expostos ao sol. A partir da caracterização molecular do melanoma seu tratamento foi aprimorado pelo uso de inibidores de Braf e Mek. O nevo melanocítico adquirido mucoso oral (NMO) e o melanoma mucoso oral (MMO) são lesões raras e de patogênese incerta. Há escassa literatura sobre aspectos moleculares do NMO e um número ligeiramente maior de estudos sobre os MMOs, em sua maioria em séries que englobam uma mistura de diferentes tipos de melanomas mucosos de diversos sítios. No presente estudo, investigou-se a mutação *BRAF* p.V600E em um grupo de 14 NMOs intramucosos e 7 MMOs primários, excluídas amostras de lábio, por meio de reação em cadeia da polimerase alelo-específico (PCR-AE). Realizou-se também uma revisão narrativa de literatura para calcular a frequência da mutação *BRAF* p.V600E em NMOs e MMOs. Foram incluídos artigos originais em língua inglesa que exibissem o sítio primário da lesão e *status* mutacional, seja por amostra ou sua frequência. Informações sobre a idade dos pacientes, país de origem e tipo de tumor, se primário, recorrente ou metastático, e técnica de análise do DNA utilizada também foram coletadas. Cinco das quatorze amostras de NMOs (35,7%) avaliadas no presente trabalho foram positivas para *BRAF* p.V600E, enquanto três das sete amostras de MMOs (42,8%) exibiram a mutação. Na revisão narrativa de literatura, em conjunto com nossos resultados, 19 NMOs foram avaliados e 8 NMOs apresentaram a mutação *BRAF* p.V600E, correspondendo a uma frequência de 42,1%. Dos 374 MMOs avaliados, 24 MMOs exibiram a mutação *BRAF* p.V600E, totalizando a frequência de 6,4%. Em conclusão, amostras de NMOs e MMOs foram analisadas quanto à presença da alteração genética oncogênica *BRAF* p.V600E. E junto à revisão da literatura pode-se calcular a frequência da mutação em NMOs e MMOs, contribuindo para uma melhor caracterização molecular dessas lesões.

**Palavras-chave:** Nevo melanocítico oral. Melanoma oral. Melanoma mucoso. BRAFV600E. Mutação ativadora. Oncogene.

## ABSTRACT

### Study of *BRAF* p.V600E mutation frequency in oral melanocytic nevi and oral mucosal melanomas

Melanocytic nevi are benign neoplasms derived from melanocytes. Common cutaneous acquired melanocytic nevus is frequently in human skin and it has a higher incidence in the third decade of life. Although a low rate of malignant transformation is estimated, a portion of cutaneous melanoma is preceded by a melanocytic acquired nevus. *BRAF* p.V600E somatic mutation activates the MAPK/ERK pathway and cell proliferation. It is implicated in the cutaneous melanocytic acquired common nevus pathogenesis and cutaneous melanoma that arise in sites not chronically sun-exposed. After melanoma molecular description, its therapeutic was improved by Braf and Mek inhibitors. Oral mucosal acquired melanocytic nevus (NMO) and oral mucosal melanoma (MMO) are rare lesions with uncertain pathogenesis. There is scanty literature about NMOs molecular features and few studies on MMOs. Most articles are series that evaluate mucosal melanomas from several sites collectively. In the present study, *BRAF* p.V600E mutation was assessed in 14 intramucosal NMOs and 7 primary MMOs, excluding lip samples, by allele specific quantitative polymerase chain reaction (AS-qPCR). A narrative literature review had been performed to calculate *BRAF* p.V600E frequency in NMOs and MMOs. Original articles in English language were included, since it was possible to identify the primary sample site and mutational status, by sample or its frequency. Data about patient age, country, type of tumor (primary, recurrent or metastatic) and sequence technique used also were collected. Five in fourteen NMOs samples (35.7%) analyzed in the present study were *BRAF* p.V600E positive and three in seven MMOs samples (42.8%) showed the mutation. In the narrative literature review, added to our results, 19 NMOs were evaluated and 8 NMOs presented *BRAF* p.V600E mutation, corresponding to a frequency of 42.1%. Between 374 MMOs evaluated, 24 MMOs showed the mutation totalizing the frequency of 6.4%. In conclusion, *BRAF* p.V600E oncogenic mutation was assessed in NMOs and MMOs samples. Additionally, in combination with the literature review, it calculated the mutation frequency in NMOs and MMOs, improving the molecular characterization of those lesions.

**Keywords:** Oral melanocytic nevi. Oral melanoma. Mucosal melanoma. BRAFV600E. Point mutation. Oncogene.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>10</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	<b>13</b>
2.1 Nevo melanocítico mucoso oral .....	13
2.2 Melanoma mucoso oral .....	16
2.3 <i>BRAF</i> e via MAPK/ERK.....	20
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>23</b>
3.1 Objetivo geral .....	23
3.2 Objetivos específicos .....	23
<b>4 METODOLOGIA</b> .....	<b>24</b>
4.1 Estudo experimental.....	24
4.1.1 Aspectos éticos .....	24
4.1.2 Obtenção da amostra .....	24
4.1.3 Processamento da amostra.....	24
4.1.3.1 Microdissecção a laser .....	24
4.1.3.2 Extração do DNA.....	25
4.1.3.3 Análise de pureza e concentração do DNA.....	25
4.1.4 Reação em cadeia da polimerase alelo-específico (PCR-AE) .....	26
4.1.5 Análise de resultados .....	26
4.2 Revisão narrativa de literatura.....	27
<b>5 RESULTADOS</b> .....	<b>29</b>
5.1 Resultados do estudo experimental .....	29
5.2 Resultados da revisão narrativa de literatura .....	30
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	<b>33</b>
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	<b>38</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>39</b>

<b>APÊNDICE A – Artigo publicado.....</b>	<b>51</b>
<b>ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) .....</b>	<b>52</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Nevos melanocíticos adquiridos comuns são neoplasias benignas de melanócitos, que se apresentam tipicamente como máculas ou pápulas de cor acastanhada. A avaliação clínica dos nevos é importante para o diagnóstico precoce do melanoma, uma neoplasia maligna agressiva que também se origina de células melanocíticas (SHAIN e BASTIAN, 2016).

Nevos melanocíticos e melanomas podem acometer diferentes sítios do corpo, sendo classificados em cutâneos, mucosos, uveais ou acrais. As lesões cutâneas são as de maior incidência (MACKIE *et al.*, 1985; RABBIE *et al.*, 2019; TUMA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). O melanoma cutâneo representa 90% de todos os melanomas diagnosticados nos Estados Unidos, considerando-se o sítio primário da doença (MCLAUGHLIN *et al.*, 2005).

Os nevos melanocíticos adquiridos comuns são entendidos como precursores de um grupo de melanomas de pele de sítios intermitentemente expostos à radiação ultravioleta (UV). Apesar disso, a taxa de transformação maligna é baixa, estimada entre 1 a cada 33.000 nevos (TSAO *et al.*, 2013). O modelo de progressão tumoral que associa essas lesões parece ter sido inicialmente proposto por Clark e colaboradores em 1984. Diversas evidências contribuem para essa elaboração, incluindo que cerca de 30% a 50% dos melanomas cutâneos surgem associados a um nevo melanocítico, e que as lesões compartilham características em nível molecular (ELDER *et al.*, 2020; PAMPENA *et al.*, 2017; PANDEYA *et al.*, 2018; SHAIN *et al.*, 2015).

Nevos e melanomas cutâneos exibem alterações na via de sinalização MAPK/ERK, (proteína-quinase ativada por mitógeno/ cinase regulada por sinal extracelular, do inglês *Mitogen Activated Protein Kinases/ Extracellular Signal-Regulated Kinases*), com frequência no gene *BRAF*. De forma individual, 80% dos nevos adquiridos comuns e 40% dos melanomas cutâneos exibem a mutação somática ativadora *BRAF* p.V600E. Braf é um componente da via de sinalização à jusante MAPK/ERK, que induz respostas celulares de crescimento e proliferação, principalmente (Cancer Genome Atlas Network, 2015; LAVOIE *et al.*, 2020; POLLOCK *et al.*, 2003; YEH, 2020). Em estudo com modelos animais, *BRAF* p.V600E promove o crescimento de neoplasias melanocíticas, semelhante a nevos,

e coopera na formação do melanoma (GOEL *et al.*, 2009). Na prática clínica, Braf é um potencial alvo terapêutico no tratamento no melanoma cutâneo avançado (SCHADENDORF *et al.*, 2018).

Os nevos melanocíticos são incomuns na cavidade bucal. E os melanomas mucosos como um todo são lesões raras. Estima-se a incidência anual do melanoma mucoso em 2 casos a cada 1 milhão de pessoas, sendo mais frequentemente encontrado no trato anogenital, cavidade nasal e bucal, nessa ordem (CHI *et al.*, 2011; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; RABBIE *et al.*, 2019). Devido à raridade e morfologia, essas lesões usualmente têm sido estudadas em conjunto.

Os MMOs em geral são diagnosticados tardiamente, de modo que cerca de 50% dos pacientes apresentam acometimento linfonodal e/ou metástases. A lesão tem um mau prognóstico com taxa de sobrevida específica à doença de 40% dos pacientes em 5 anos (GOLDEMBERG *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2017). A ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento do MMO, resultando em danos estéticos e funcionais importantes. Além disso, o envolvimento de estruturas vitais adjacentes limita o manejo cirúrgico da lesão (CHAE *et al.*, 2020; SUN *et al.*, 2012; WUSHOU e ZHAO, 2015).

Pouco se sabe sobre as condições que levam ao aparecimento de nevos melanocíticos e melanomas nas superfícies mucosas. E há investigações incipientes sobre a relação entre o NMO e o MMO (LIU *et al.*, 2020; MELETI *et al.*, 2007b; RAJ, PATIL e RAJKUMAR, 2018). No âmbito do perfil molecular dos NMOs, Cohen e colaboradores (2012) avaliaram a mutação *BRAF* p.V600E. A alteração estava presente em 60% (3/5) dos NMOs, embora o número de amostras do estudo tenha sido pequeno (n=5), e em 33% (1/3) dos MMOs (COHEN *et al.*, 2012). É importante notar que *BRAF* p.V600E é relatado frequentemente também em neoplasias não relacionadas à radiação UV, como o carcinoma colorretal e carcinoma de tireóide (ZAMAN, WU e BIVONA, 2019).

A compreensão das alterações genéticas dos melanomas mucosos tem avançado recentemente com o uso de técnicas de sequenciamento em larga escala. No entanto, a maioria dos estudos inclui melanomas de mucosas diversas dificultando a comparação de alterações entre sítios distintos, os quais provavelmente surgem em contextos biológicos que apresentam diferenças entre si. Simultaneamente à realização do presente trabalho, Nassar e Tan (2020) revisaram e resumiram as alterações genéticas de melanomas mucosos em dois grupos,

região superior e região inferior do corpo. Os autores calcularam em 6% a frequência de mutações *BRAF* p.V600 para melanomas mucosos da região superior do corpo (NASSAR e TAN, 2020). Ainda assim, não haviam dados reunidos especificamente sobre a frequência da mutação *BRAF* p.V600E entre os MMOs.

Portanto, a mutação *BRAF* p.V600E está envolvida na patogênese de cerca de 80% dos nevos adquiridos comuns e 40% dos melanomas cutâneos. É expressiva a diferença de frequência desse oncogene entre as duas lesões, sendo mais alta na neoplasia benigna (KATO *et al.*, 2016). Quanto às lesões orais, a frequência de *BRAF* p.V600E não está estabelecida, seja para NMOs ou MMOs. Assim, esse estudo auxilia na caracterização molecular de NMOs e MMOs e permite a comparação entre o padrão de frequência da mutação *BRAF* p.V600E em lesões melanocíticas benignas e malignas da boca.

Em razão da importância da alteração *BRAF* p.V600E no contexto das lesões melanocíticas cutâneas, hipotetiza-se que a mutação também possa ser recorrente em NMOs e MMOs. O presente trabalho tem como objetivo investigar a frequência da mutação oncogênica *BRAF* p.V600E em NMOs e MMOs.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Nevo melanocítico mucoso oral

Os nevos melanocíticos são proliferações benignas de células névicas. Essas células são provavelmente derivadas de melanócitos, com os quais apresentam semelhanças fenotípicas. Os melanócitos são encontrados, por exemplo, nos folículos pilosos, entre os queratinócitos basais da epiderme e das mucosas (BARRET e RAJA, 1996; BARRET e SCULLY, 1994; ROH *et al.*, 2015).

O nevo melanocítico é classificado segundo suas características clínicas e histológicas. Dois grupos podem ser definidos: os nevos adquiridos e os nevos congênitos. Nevos congênitos são nevos que surgem durante a fase intrauterina, enquanto os nevos adquiridos se desenvolvem ao longo da vida de um indivíduo. Os nevos adquiridos podem ser classificados em nevo adquirido comum, nevo azul, nevo de Spitz e nevo displásico. Cada variante está associada a diferentes mutações que foram investigadas principalmente nas lesões de pele (YEH, 2020). Na mucosa bucal o subtipo adquirido comum é o mais frequente, seguido pelo nevo azul (BUCHNER, MERREL e CARPENTER, 2004; TAVARES *et al.*, 2018).

Os nevos melanocíticos adquiridos são amplamente encontrados na pele humana, mas raramente vistos na cavidade bucal. Os pacientes apresentam em média 27 nevos cutâneos na terceira década de vida, faixa etária de maior incidência (MACKIE *et al.*, 1985; TUMA *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2016). Enquanto isso, estudos retrospectivos indicam que o número de biópsias de NMOs é inferior a 0,5% entre diversos serviços de patologia bucal, indicando uma baixa frequência relativa dessas lesões (BUCHNER, MERREL e CARPENTER, 2004; FERREIRA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2018). Em consonância, a excisão de NMOs numa população da Europa foi estimada em 4,35 casos por 10 milhões de habitantes por ano (MELETI *et al.*, 2007b).

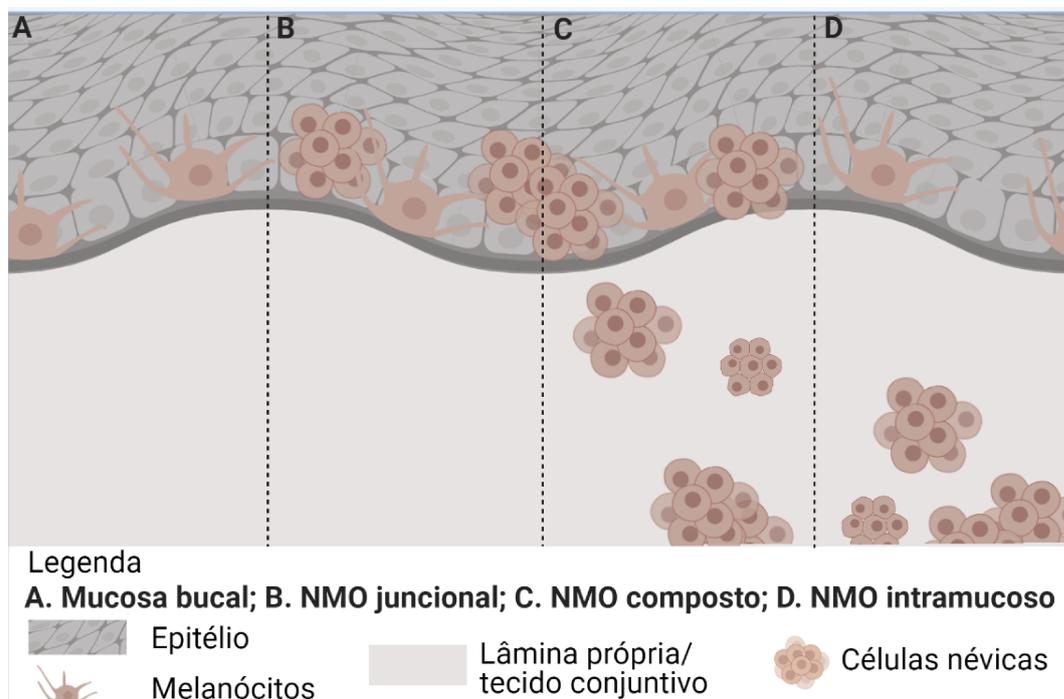
Clinicamente, o NMO apresenta-se como uma mácula ou pápula bem circunscrita, assintomática, de formato redondo a oval, de pigmentação castanha a cinzenta ou enegrecida. NMOs não-pigmentados são relatados numa frequência de 32% dos casos. A maioria dos NMOs apresenta até 0,6 cm de diâmetro (BUCHNER e HANSEN, 1987; FERREIRA *et al.*, 2015). Palato, mucosa jugal e gengiva são os

sítios mais afetados pela lesão, nessa ordem, excluídos os casos de lábio (FERREIRA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2018).

Os diagnósticos ocorrem principalmente na terceira década de vida, mas com ampla variação de faixa etária (BUCHNER *et al.*, 1987; BUCHNER, MERREL e CARPENTER, 2004; FERREIRA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2018). De 53 a 66% das biópsias de NMOs foram relatadas em indivíduos referidos como caucasianos (BUCHNER e HANSEN, 1987; FERREIRA *et al.*, 2015).

O NMO é caracterizado microscopicamente por exibir células ovóides agrupadas, com escasso citoplasma eosinofílico e grânulos focais de melanina. Seus núcleos são pequenos e uniformes. As células névicas podem estar situadas apenas no componente epitelial da mucosa, sendo o NMO classificado juncional, apenas na lâmina própria e denominado NMO intramucoso ou subepitelial, ou situado em ambos, epitélio e lâmina própria, sendo chamado NMO composto (FIGURA 1) (YEH, 2020).

**Figura 1** – Classificação histológica do nevo melanocítico adquirido comum oral (NMO)

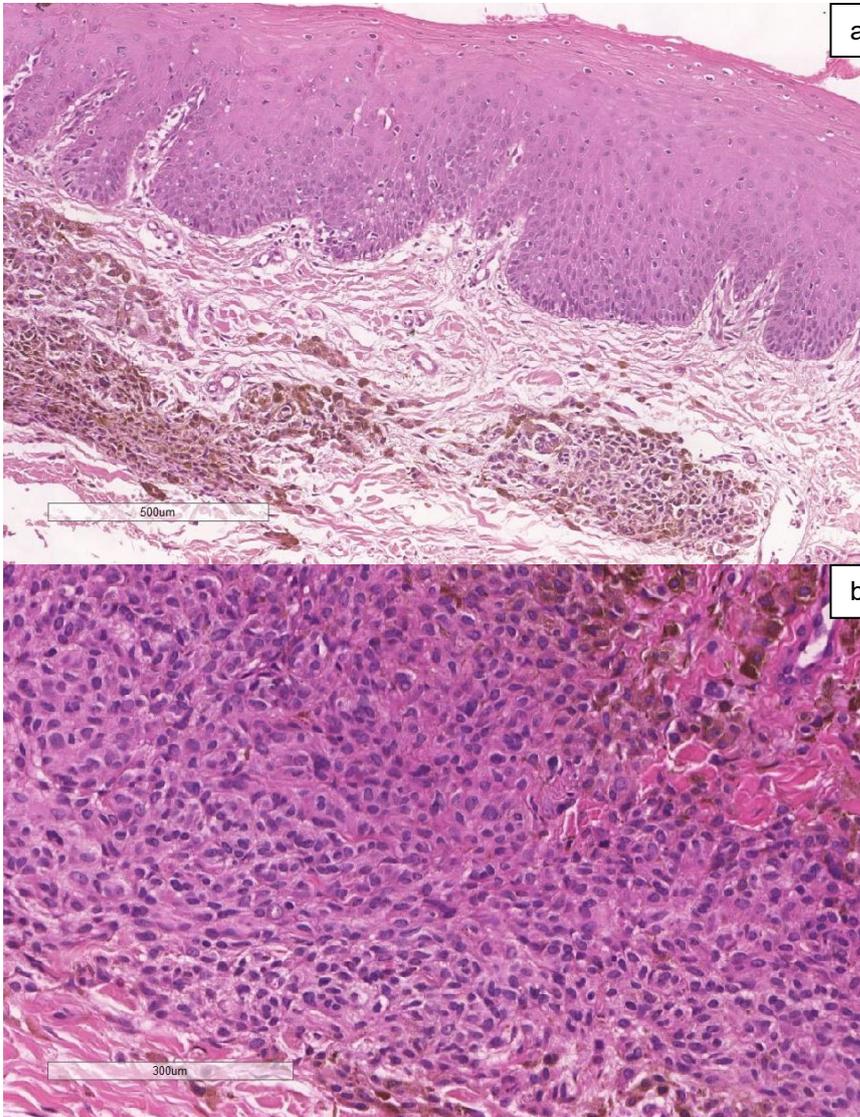


Fonte: autoral, criado com BioRender e baseado em DEHDASHTIAN *et al.*, 2018.

O NMO intramucoso (FIGURA 2) é o subtipo mais frequente, compreende de 40 a 60% dos espécimes coletados, e foi associado a uma média de idade maior àquela encontrada para os NMOs juncional e composto (BUCHNER *et al.*, 1990;

BUCHNER, MERREL e CARPENTER, 2004; FERREIRA *et al.*, 2015; TAVARES *et al.*, 2018).

**Figura 2** – Nevo melanocítico oral intramucoso



Legenda: a) Imagem microscópica de um NMO intramucoso. Proliferação de células névicas arranjadas em cordões no tecido conjuntivo (Hematoxilina e eosina 100x).  
b) Em maior aumento observam-se células redondas a ovais com citoplasma escasso e áreas focais de deposição de pigmento (Hematoxilina e eosina 400x).

Fonte: arquivo pessoal (Captura de tela obtida no aplicativo Case Viewer 2.3).

O diagnóstico diferencial de um NMO inclui o melanoma, condições benignas e pigmentações exógenas, a exemplo do melanoacantoma, mácula melanótica e tatuagem por amálgama, sendo recomendada a sua remoção e avaliação microscópica (FEMIANO *et al.*, 2008).

Enquanto a mutação *BRAF* p.V600E é encontrada em 82% dos nevos cutâneos adquiridos (POLLOCK *et al.*, 2003), e com menor frequência ocorram mutações em *NRAS* (6%) (ROH *et al.*, 2015), a caracterização molecular dos NMOs permanece incipiente. Cohen e colaboradores relataram em 2012 a presença de *BRAF* p.V600E em 3/5 NMOs intramucosos, correspondendo a 60% dos NMOs que investigou, excluindo-se uma lesão de lábio (COHEN *et al.*, 2012).

## 2.2 Melanoma mucoso oral

O MMO é uma neoplasia maligna incomum, com incidência anual estimada em 0,01 casos a cada 100.000 habitantes (SORTINO-RACHOU *et al.*, 2009). Em comparação, são diagnosticados cerca de quinze melanomas cutâneos a cada 100.000 habitantes por ano nos Estados Unidos (MCLAUGHLIN *et al.*, 2005).

Enquanto a exposição à radiação UV e a presença de múltiplos nevos melanocíticos com 2 mm ou mais de diâmetro foram identificados como fatores de risco para o melanoma cutâneo (MURALI *et al.*, 2018), não há eventos predisponentes conhecidos para o desenvolvimento do MMO. Embora tabaco e esforço mecânico crônico tenham sido especulados como possíveis fatores de risco para o MMO, as evidências são insuficientes (LIDA *et al.*, 2018; PRIETO *et al.*, 2018; RAMBHIA, STOJANOV e ARBESMAN, 2019; WILLIAMS, SPEIGHT e WENIG, 2017).

Muitos autores citam diferenças na incidência do melanoma mucoso entre grupos com descendências étnicas diferentes. No entanto, a incidência parece ser similar entre os grupos e o que parece diferir é a proporção entre melanomas cutâneos, mucosos, uveais e acrais entre populações diferentes. Por exemplo, há um elevado percentual de melanomas mucosos diagnosticados na China e no Japão, mas isso se deve à baixa incidência do melanoma cutâneo nesses países em comparação aos Estados Unidos. Apesar disso, os continentes e países não estão igualmente representados nos estudos epidemiológicos do MMO (CHI *et al.*, 2011; LIAN *et al.*, 2017; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; SORTINO-RACHOU *et al.*, 2009; TOMIZUKA, NAMIKAWA e HIGASHI, 2017).

O MMO afeta pessoas do sexo feminino e masculino numa mesma proporção e é mais frequente nos idosos, com cerca de 50% dos diagnósticos ocorrendo em pacientes com 65 anos ou mais (MCLAUGHLIN *et al.*, 2005;

SORTINO-RACHOU *et al.*, 2009). Dados do Brasil mostram prevalência por idade e sexo similares a de outros países, embora os autores tenham incluído lesões de lábio, faringe e MMO em um mesmo grupo para análise (GOLDEMBERG *et al.*, 2020). O palato é o sítio mais afetado da cavidade bucal, seguido pela gengiva (HICKS e FLAITSZ, 2000; MCLAUGHLIN *et al.*, 2005; SORTINO-RACHOU *et al.*, 2019).

Clinicamente, o MMO se apresenta como uma mácula ou nódulo hiperpigmentado, nos tons enegrecido, acastanhado, acinzentado, avermelhado e/ou esbranquiçado. Lesões amelanóticas representam de 10 a 30% dos casos e seu diagnóstico é dependente de reações imunohistoquímicas. Usualmente as lesões não apresentam sinais ou sintomas, que só aparecem em estágios mais tardios da doença, tais como ulceração e hemorragia. O diagnóstico diferencial clínico pode incluir o Sarcoma de Kaposi, tatuagem por amálgama, nevo melanocítico, mácula melanótica e pigmentações fisiológicas (ASCIERTO *et al.*, 2017; FEMIANO *et al.*, 2008).

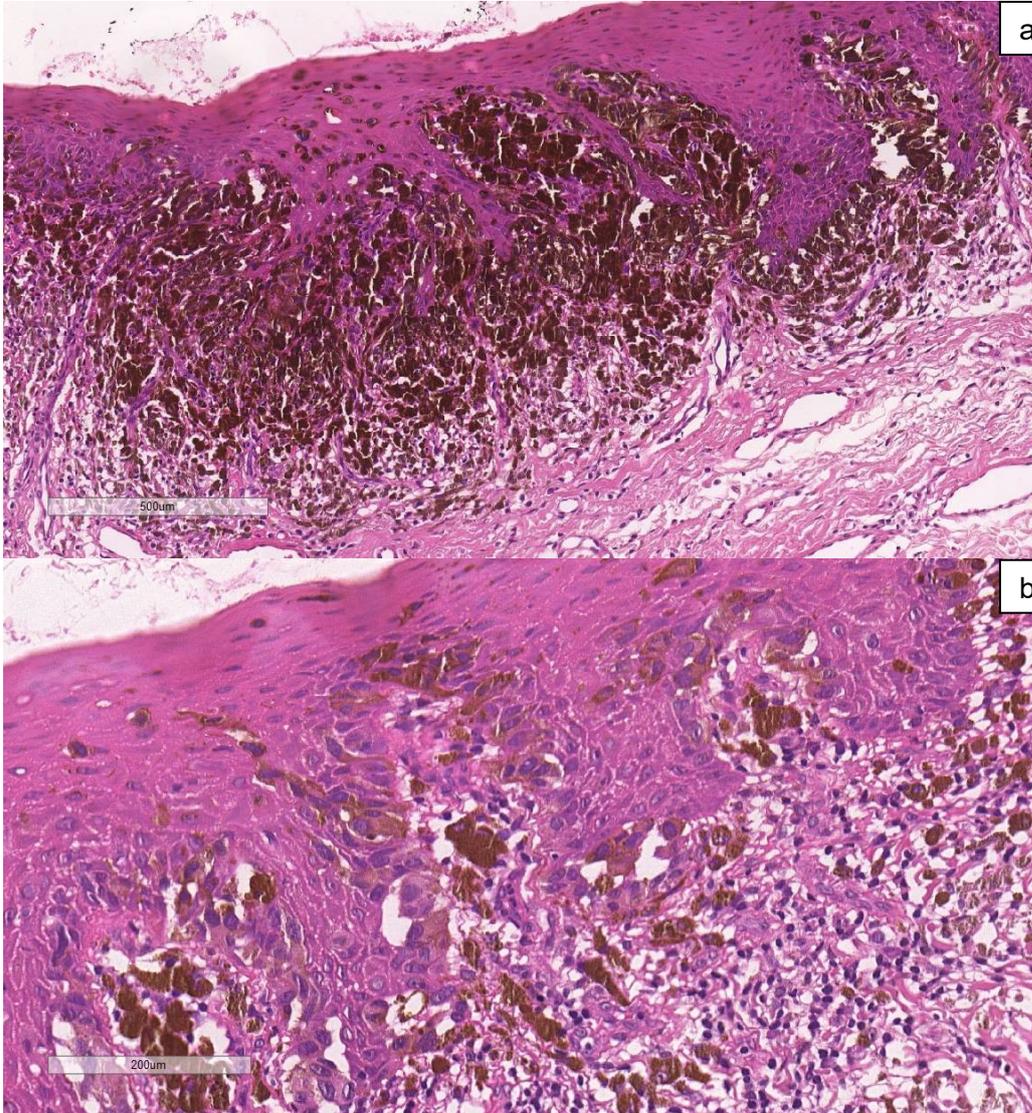
Ao exame microscópico observa-se proliferação de ilhas ou lençóis de melanócitos com atipia citoplasmática e nuclear (FIGURA 3). Os melanócitos neoplásicos podem apresentar morfologia epitelióide, fusiforme, plasmocitoide ou citoplasma claro. Uma minoria dos MMOs não possui pigmentação melânica (BARKER *et al.*, 1997; MELETI *et al.*, 2007a).

O MMO pode ser classificado histologicamente em *in situ*, quando as células da lesão estão limitadas ao epitélio e interface epitélio-conjuntivo, MMO invasivo quando as células estão localizadas apenas no tecido conjuntivo, ou MMO combinado, em que as células situam-se nos dois componentes teciduais (BARKER *et al.*, 1997). Necrose, ulceração e invasão vascular são comuns em MMOs do tipo invasivo (SONG *et al.*, 2015). Além disso, os MMOs podem ser caracterizados quanto à sua arquitetura em sólido, organóide, em lençóis ou alveolar. Melan-A, HMB-45 e S-100 são imunomarcadores úteis para diagnóstico (HICKS e FLAITSZ, 2000).

O prognóstico dos MMOs é ruim, com taxa de sobrevida geral estimada, por meio de revisões institucionais, entre 20% e 53% dos pacientes nos primeiros 5 anos após o diagnóstico. O índice de sobrevida específica à doença foi calculado em 40% para o período de 5 anos. Fatores como idade, tamanho do tumor, profundidade de invasão, presença de metástase e possibilidade de ressecção

cirúrgica influenciam o tempo de sobrevivência do paciente (CHAE *et al.*, 2020; LEE *et al.*, 2017; SUN *et al.*, 2012).

**Figura 3 – Melanoma Mucoso Oral**



Legenda: a) Imagem microscópica de melanoma oral. Proliferação de células melanocíticas atípicas e hiperpigmentadas ao longo da camada basal e superiores do epitélio, além de infiltrar o tecido conjuntivo subjacente (Hematoxilina e eosina 100x).  
b) Em maior aumento é possível observar hiper cromatismo nuclear e pleomorfismo celular, além da presença de infiltrado inflamatório crônico na lâmina própria (Hematoxilina e eosina 400x).

Fonte: arquivo pessoal (Captura de tela obtida no aplicativo Case Viewer 2.3).

Os critérios de estadiamento do melanoma mucoso primário de cabeça e pescoço estão em contínua revisão e discussão. Segundo recomendação da última edição do Comitê Americano (*American Joint Committee on Cancer*, 8ª edição), o

estadiamento deve se iniciar em T3, o que busca refletir o mau prognóstico do melanoma mucoso desses sítios (LYDIATT *et al.*, 2017). No entanto, há evidências de que o MMO restrito ao epitélio e junção epitélio-conjuntivo (*in situ*) apresente melhor desfecho clínico quando comparado a lesões invasivas, nas quais as células malignas se estendem à lâmina própria e tecidos profundos como osso e músculo esquelético (PRASAD *et al.* 2004; WU *et al.*, 2018). Wu e colaboradores (2018) avaliaram retrospectivamente 170 pacientes com MMOs. A taxa de sobrevida geral dos pacientes com lesões *in situ* foi de 89%, enquanto na lesão invasiva esse índice chegou a 35% ( $p < 0,0001$ ) (WU *et al.*, 2018).

O MMO pode surgir *de novo*, a partir da transformação de melanócitos-tronco ou de um melanócito-maduro, ou se desenvolver a partir de uma lesão melanocítica precursora (ASCIERTO *et al.*, 2017; RAJ, PATIL e RAJKUMAR, 2018). Há poucos trabalhos acerca do tema. Ao avaliar retrospectivamente NMOs, Meleti e colaboradores (2007) não encontraram associação com o risco de desenvolver MMO (MELETI *et al.*, 2007b). Ao passo que, no estudo de Liu e colaboradores (2020) apenas o NMO de subtipo juncional foi associado a esse risco (LIU *et al.*, 2020).

O melanoma cutâneo é marcado por alterações na via de sinalização MAPK/ERK, que medeia estímulos à proliferação celular. *BRAF*, *NRAS* e *NF1* estão frequentemente mutados nessas lesões (Cancer Genome Atlas Network, 2015). Mutações no gene *BRAF* aparecem entre 40% e 50% dos melanomas de pele, das quais cerca de 75% são do tipo *BRAF* p.V600E (GREAVES *et al.*, 2013). Além dessas, alterações nos genes *CDKN2A*, *PTEN*, *AKT* e *TERT* ocorrem com frequência (RABBIE *et al.*, 2019).

Em contraste à frequência nas lesões de pele, apenas 28% dos melanomas das mucosas nasal, oral e do trato gastroesofágico, apresentam mutações somáticas nos genes *BRAF*, *NRAS* e *NF1*. Mutações somáticas no códon V600 do gene *BRAF* aparecem em 6% das lesões nesse grupo (NASSAR e TAN, 2020). Revisões anteriores haviam relatado a frequência de mutações no gene *BRAF* variando de 3% e 6% nos MMOs (ABLAIN *et al.*, 2018; ÖZTÜRK-SARI *et al.*, 2017). Mutações em *KIT* ocorrem em 13% dos melanomas mucosos da região superior do corpo, frequentemente nos éxons 9, 11, 13 e 17 (NASSAR e TAN, 2020). Lyu e colaboradores (2016) relataram a alteração em 7% dos casos, ao estudarem exclusivamente MMOs. O gene *KIT* codifica um receptor tirosina cinase

transmembrana que regula a ativação de diversas vias de sinalização, como MAPK e AKT (LYU *et al.*, 2016; TODD *et al.*, 2014).

Mutações no gene *SF3B1* aparecem em 6% dos melanomas mucosos de cabeça e pescoço e trato gastrointestinal superior. O gene codifica uma proteína que participa do *splicing* de RNA mensageiro. Essas mutações podem resultar na produção de proteínas aberrantes ou regular negativamente os níveis de RNA mensageiro. Tais melanomas mucosos exibem ainda alterações variadas em outras vias de sinalização, em genes da regulação do ciclo celular e dos telômeros: ampliações do número de cópias nos genes *NOTCH2*, *CDK4*, *CCND1*, *TERT* e deleções em *CDKN2A* e *TP53* (NASSAR e TAN, 2020).

O tratamento primário dos melanomas é a excisão cirúrgica. Em caso de doença avançada locorregional ou metastática, devem ser considerados métodos adicionais, incluindo radioterapia, imunoterapia e terapias direcionadas, tais como inibidores de Braf, Mek e Kit. Há evidências limitadas acerca da efetividade dos inibidores de Braf e Mek nos melanomas mucosos de cabeça e pescoço com mutações em *BRAF*, e existe a necessidade de realização de mais ensaios clínicos incluindo pacientes com melanomas mucosos (ALICEA e REBECCA, 2020; NENCLARES *et al.*, 2020).

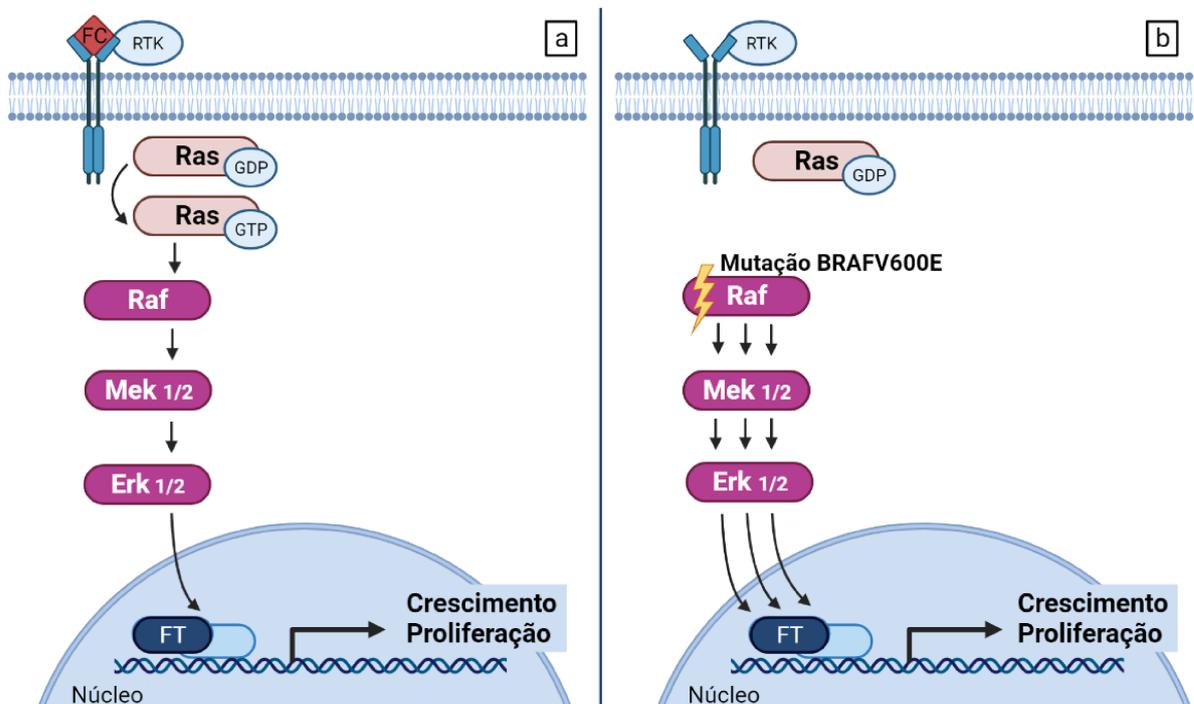
### 2.3 *BRAF* e via MAPK/ERK

A via de sinalização MAPK/ERK ou Ras/Raf/MEK/ERK é uma cascata de sinalização intracelular composta por três classes de proteínas cinases: MAPK, MAPKK e MAPKKK, além da proteína Ras (LAVOIE, GAGNON e THERRIEN, 2020).

A ativação fisiológica da via ocorre a partir da ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina cinase transmembrana. Esse evento induz a troca de GDP por GTP em Ras. Ras-GTP liga-se à proteína Raf induzindo a dimerização de Raf e sua atividade cinase. Ao interagir com Mek, Raf dimerizado promove a adição de um grupo fosfato à proteína Mek. Por fim, Mek fosforila a proteína Erk, que tem ação sobre centenas de substratos efetores. A translocação de Erk para o núcleo é fundamental em pelos menos duas respostas à via MAPK/ERK: proliferação e crescimento celulares, nos quais Erk ativa fatores de transcrição (FIGURA 4a). Além disso, diversas evidências têm sugerido que a proteína Erk está envolvida em outros processos celulares como sobrevivência, metabolismo e

migração (LAVOIE, GAGNON e THERRIEN, 2020; LAVOIE e THERRIEN, 2015; SIMANSHU, NISSLEY e MCCORMICK, 2017).

**Figura 4** – Via de sinalização MAPK/ERK



Legenda: a) Esquema de ativação fisiológica da via de sinalização MAPK/ERK. A interação entre seus componentes, aqui demonstrada, depende de um estímulo mitogênico, ou seja, a ligação de um fator de crescimento (FC) ao receptor tirosina cinase (RTK).

b) Na presença da mutação *BRAF* p.V600E, a via MAPK/ERK permanece em contínua atividade sinalizadora.

FC: fator de crescimento; RTK: receptor tirosina cinase; FT: fator de transcrição.

Fonte: autoral, criado no Biorender e baseado em Lavoie e Terrien, 2015.

A dimerização de Raf e a fosforilação de três regiões estruturais dessa proteína são mecanismos regulatórios de sua atividade. Raf requer a fosforilação da região amino-terminal, do segmento de ativação e da região carboxi-terminal para que ocorram mudanças conformacionais e atividade catalítica. A dimerização funciona como estabilizador de Raf ativa e pode ocorrer entre as três isoformas da proteína Araf, Braf e Craf - também chamado Raf-1. Entretanto, variantes oncogênicas dessa proteína demonstraram exercer sua atividade independentemente desses eventos (LAVOIE e THERRIEN, 2015).

A mutação *BRAF* p.V600E provoca a substituição de um aminoácido valina por um ácido glutâmico no resíduo 600 da proteína codificada. Essa troca está

localizada no segmento de ativação de Braf e promove a sua ativação constitutiva, atuando provavelmente como um mimético da fosforilação (FIGURA 4b) (LAVOIE e THERRIEN, 2015). A atividade cinase basal da proteína Braf<sup>V600E</sup> *in vitro* é cerca de dez vezes maior que a atividade de Braf do tipo selvagem ou endógeno (Braf<sup>Wt</sup>, do inglês *Wild-type*). Braf<sup>V600E</sup> também demonstrou ser capaz de ativar Erk em níveis superiores a Braf<sup>Wt</sup> em cultivos celulares (DAVIES *et al.*, 2002; WAN *et al.*, 2004).

Modelos de estudo em peixes-zebra, que induziram a expressão de Braf<sup>V600E</sup> em células melanocíticas, evidenciaram que a mutação dá origem a proliferações melanocíticas focais sem induzir a formação de melanoma. Já ao introduzir esse oncogene em peixes-zebra com deficiência de p53, os autores observaram a formação da neoplasia melanocítica maligna (PATTON *et al.*, 2005). Estudos experimentais em camundongos demonstraram a mesma tendência, com a expressão induzida de Braf<sup>V600E</sup> e posterior perda do gene *CDKN2A*, que é frequentemente deletado no melanoma cutâneo humano (GOEL *et al.*, 2009). Nessa linha, diversos autores buscaram entender os mecanismos que atenuam a proliferação celular nos nevos melanocíticos adquiridos e alterações que ocorrem para a progressão tumoral (DAMSKY e BOSENBERG, 2017; HUANG, CHIKEKA e HORNYAK, 2017). O estudo de nevos atípicos ou 'melanocitomas' evidenciou a presença da mutação *BRAF* p.V600E em associação a outras alterações em oncogenes e supressores tumorais (YEH, 2020). De forma que a mutação *BRAF* p.V600E parece ser suficiente para a formação do nevo (YEH, VON-DEIMLING e BASTIAN, 2013), mas dependente de alterações moleculares adicionais para a progressão para melanoma.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar a frequência da mutação oncogênica *BRAF* p.V600E em nevos melanocíticos adquiridos mucosos orais e melanomas mucosos orais.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) Analisar a presença da mutação *BRAF* p.V600E em amostras de nevos melanocíticos adquiridos orais e melanomas mucosos orais;
- b) Reunir dados da literatura de frequência da mutação *BRAF* p.V600E em nevos melanocíticos adquiridos mucosos orais e melanomas mucosos orais por meio de revisão literária narrativa.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 Estudo experimental

#### 4.1.1 Aspectos éticos

Esse projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (CEP-UFMG) identificado pelo CAAE 30178020.0.0000.5149 e aprovado sob o parecer 4133614, conforme documento apresentado no Anexo A.

#### 4.1.2 Obtenção da amostra

Uma amostra de conveniência de NMOs intramucosos e MMOs primários fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE) foi selecionada do arquivo do Laboratório de Patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG. Casos adicionais foram cedidos por pesquisadores das seguintes instituições: Universidade Federal do Rio de Janeiro (Brasil), Universidade Estadual de Campinas (Brasil), Universidad Peruana Cayetano Heredia (Peru) e Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco (México).

A disponibilidade de uma quantidade suficiente de tecido para a confecção de uma lâmina histológica corada em Hematoxilina e Eosina (H&E) e extração de DNA foram critérios iniciais de inclusão no estudo. Casos localizados em lábio foram excluídos devido à dificuldade em se diferenciar de lesões cutâneas com extensão mucosa. As amostras foram submetidas à avaliação histológica por um patologista experiente para confirmação diagnóstica e receberam um código alfa-numérico. Dezesete NMOs intramucosos e quinze MMOs primários foram selecionados.

#### 4.1.3 Processamento da amostra

##### 4.1.3.1 Microdissecção a laser

As amostras foram submetidas à microdissecção e captura a laser utilizando-se o equipamento MMI CellCut Plus (Olympus, Glattbrugg, Switzerland), software MMI CellTools v.4.0.7 RC2 (MMI Molecular Machines & Industries, Tokyo, Japan) e microscópio óptico Olympus. Na microdissecção foram selecionadas as áreas tumorais das amostras de NMOs e MMOs.

Foram obtidos cortes dos blocos de tecido FFPE na espessura de 8 micrômetros. Os cortes foram montados em uma membrana com suporte metálico (MMI Membrana Slides - Molecular Machines & Industries GmbH, Eching, Germany), desparafinizados e corados com hematoxilina. Essa membrana, já corada e seca, foi acoplada à uma lâmina de vidro convencional e levada ao microscópio. As áreas de interesse foram selecionadas no monitor do equipamento para dissecção pelo laser, sendo automaticamente coletadas em microtubos MMI IsolationCap® (Molecular Machines & Industries GmbH, Eching, Germany).

#### 4.1.3.2 Extração do DNA

O DNA genômico das amostras foi obtido utilizando-se o kit QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen, CA, EUA) de acordo com o protocolo do fabricante. A extração de DNA é composta de quatro etapas: lise celular, ligação do DNA à membrana de sílica, seguida por lavagem para remoção de proteínas, gorduras e contaminantes, e eluição, que consiste na liberação do DNA da membrana utilizando-se água ou a solução-tampão do referido kit. Foram obtidas três eluições de cada uma das amostras em solução-tampão, as quais foram codificadas e armazenadas em freezer a -20°C.

#### 4.1.3.3 Análise de pureza e concentração do DNA

As amostras de DNA foram avaliadas quanto ao grau de pureza e concentração por meio do espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EUA). Proporção de absorvância 260/280 de aproximadamente 1,8 e a razão de absorvância de 260/230 entre 1,8 e 2,2 foram os parâmetros considerados na escolha da eluição a ser utilizada na técnica de PCR-AE.

#### 4.1.4 Reação em cadeia da polimerase alelo-específico (PCR-AE)

A mutação *BRAF* p.V600E corresponde a uma transversão T>A na posição c.1799 do gene *BRAF*, localizado no braço longo do cromossomo 7. A presença dessa alteração genética foi testada por PCR-AE utilizando-se duas sondas comerciais, *BRAF\_476\_mu* (Hs00000111\_mu, Applied Biosystems, Foster City, EUA) e *BRAF\_rf* (Hs00000172\_ref, Applied Biosystems, Foster City, EUA). As reações foram padronizadas usando-se 30ng de DNA genômico de cada amostra.

A termociclagem foi realizada no equipamento StepOne Plus (Applied Biosystems), e seguiu o protocolo universal de ciclagem térmica de detecção de mutação: 95° C por 10 min; 5 ciclos: 92° C por 15s e 58° C por 1 min; 40 ciclos: 92° C por 15s e 60° C por 1 min, conforme recomendações do fabricante (BAO *et al.*, 2012; BARBANO *et al.*, 2015).

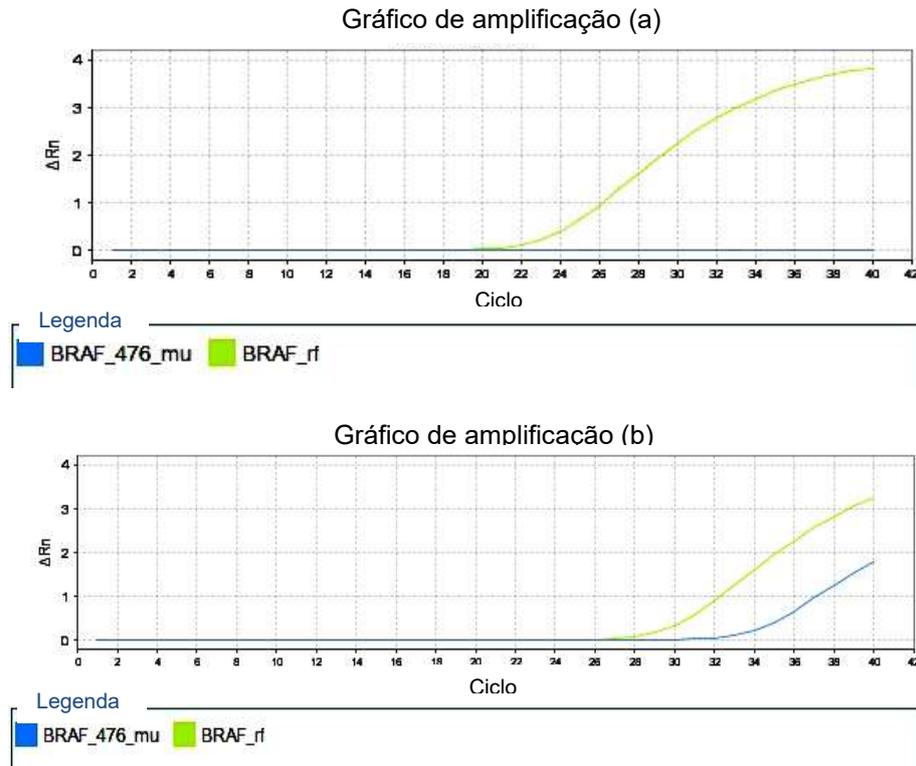
Os dados gerados nas reações de PCR-AE foram exportados para o software Taqman Mutation Detector™ (Life Technologies Corporation, Carlsbad, EUA) e analisados de acordo com o método  $C_t$  Comparativo ( $C_t$ : cycle-threshold). Para isso, o software calcula a diferença entre o valor (delta, isto é,  $\Delta$ ) de  $C_t$  do ensaio do alelo mutante e o valor de  $C_t$  do ensaio do alelo de referência ( $\Delta C_t = C_t \text{ BRAF\_476\_mu} - C_t \text{ BRAF\_rf}$ ) para uma mesma amostra. Amostras com  $\Delta C_t$  inferior a 9,96 foram consideradas mutadas para *BRAF* p.V600E enquanto amostras com  $\Delta C_t$  acima do referido valor foram consideradas indeterminadas. O *status* mutacional Wt foi indicado quando ocorreu amplificação do alelo de referência, mas não do alelo mutante. Por fim, amostras com  $C_t$  de referência maior que 34 ou  $C_t$  do alelo mutante maior que 37 foram consideradas também indeterminadas. Esses parâmetros estão de acordo com as recomendações do fabricante do ensaio de detecção utilizado.

A figura abaixo (FIGURA 5) ilustra graficamente os dados obtidos pela PCR-AE para duas amostras do estudo: um NMO negativo para a mutação *BRAF* p.V600E, e um NMO *BRAF* p.V600E.

#### 4.1.5 Análise de resultados

As informações clínicas do grupo amostral e de detecção de *BRAF* p.V600E em NMOs e MMOs foram analisadas por meio de estatística descritiva.

**Figura 5** – Exemplos de curvas de amplificação de amostras do estudo



Legenda: a) Gráfico da PCR-AE para a amostra NMO2, em que não houve amplificação do alelo mutante *BRAF* p.V600E.

b) Na segunda imagem, observa-se a curva de amplificação da PCR-AE da amostra NMO1. Nota-se a amplificação do alelo de referência para o gene *BRAF* e também do alelo mutante *BRAF* p.V600E.

Fonte: Gerado por meio de StepOne™ Software v2.3.

#### 4.2 Revisão narrativa de literatura

A revisão literária foi feita em junho de 2020 utilizando-se a busca na base de dados *Pubmed*. Não foram incluídas restrições de data de publicação. Os seguintes descritores foram utilizados na busca bibliográfica: (oral melanocytic nevi) OR (oral melanocytic nevus) OR (oral nevus) OR (oral nevi) AND *brafv600e* e (oral melanoma) OR (oral mucosal melanoma) OR (mucosal melanoma) AND *brafv600e*. O termo *braf*, sem especificação, foi adicionado à pesquisa sobre os NMOs na tentativa de expansão dos resultados: (oral melanocytic nevi) OR (oral melanocytic nevus) OR (oral nevus) OR (oral nevi) AND *braf*. Os artigos encontrados foram pré-selecionados de acordo com o resumo. A partir do manuscrito completo e materiais suplementares dos trabalhos realizou-se a seleção, observando se eles perfaziam

os critérios de inclusão. A lista de referências dos artigos incluídos foi consultada em busca de novas fontes.

Foram considerados critérios de inclusão: artigos em língua inglesa, identificação do sítio primário das amostras como sendo NMOs ou MMOs e *status* mutacional por amostra para *BRAF* p.V600E ou frequência de *BRAF* p.V600E. Além do *status* mutacional para *BRAF* p.V600E em amostras de NMOs e MMOs, foram coletadas também informações sobre idade, país ou descendência do paciente, tipo de amostra (primário, recorrência ou metástase) e técnica molecular utilizada. Amostras de lábio foram excluídas dessa revisão. Publicações duplicadas foram excluídas. Os dados obtidos foram compilados e analisados de forma descritiva.

## 5 RESULTADOS

Os resultados desse trabalho foram redigidos sob a forma de artigo científico e publicados no periódico científico *Oral Oncology* no formato Carta ao Editor, conforme Apêndice A, e estão descritos nesta seção (RESENDE *et al.*, 2021).

### 5.1 Resultados do estudo experimental

Quatorze amostras de NMOs intramucosos e sete amostras de MMOs primários atingiram os parâmetros de qualidade para a execução da PCR-AE.

Os pacientes com NMO apresentaram mediana de idade igual a 29 anos, variando de 16 a 67 anos, e eram predominantemente mulheres (n=10). Mucosa jugal (n=5) e palato duro (n=4) foram os sítios mais afetados nesse grupo. Cinco das quatorze amostras (35,7%) apresentaram a mutação *BRAF* p.V600E (TABELA 1).

**Tabela 1-** Dados clínicos e *status* mutacional de amostras de nevo melanocítico oral intramucoso

<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Localização</b>	<b><i>BRAF</i> p.V600E</b>
NMO1	F	36	Gengiva	<b>Positivo</b>
NMO2	F	26	Gengiva	Negativo
NMO3	F	45	Mucosa jugal	<b>Positivo</b>
NMO4	F	27	Palato duro	Negativo
NMO5	M	26	Mucosa jugal	Negativo
NMO6	M	16	Palato duro	<b>Positivo</b>
NMO7	F	41	SI	Negativo
NMO8	F	35	Mucosa jugal	<b>Positivo</b>
NMO9	F	25	Palato duro	Negativo
NMO10	F	SI	Palato duro	<b>Positivo</b>
NMO11	M	29	SI	Negativo
NMO12	F	67	Mucosa jugal	Negativo
NMO13	F	49	Mucosa jugal	Negativo
NMO14	M	28	SI	Negativo

Abreviações: NMO: nevo melanocítico adquirido comum oral; F: feminino; M: Masculino; SI: Sem informações

Fonte: Adaptado de RESENDE *et al.*, 2021.

Os MMOs analisados foram mais frequentes em palato duro (n=5); quatro eram de pacientes do sexo feminino e três do sexo masculino. A mediana de idade

foi de 65 anos, variando de 47 a 86 anos. Três amostras (42,8%) foram positivas para *BRAF* p.V600E (TABELA 2).

**Tabela 2** – Características clínicas e *status* mutacional dos melanomas mucosos orais

<b>Amostra</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Localização</b>	<b><i>BRAF</i> p.V600E</b>
MMO1	F	65	Palato duro	<b>Positivo</b>
MMO2	M	70	Gengiva superior	Negativo
MMO3	F	76	Palato duro e gengiva	Negativo
MMO4	F	86	Palato duro e gengiva	Negativo
MMO5	F	54	Palato duro	Negativo
MMO6	M	47	Gengiva superior	<b>Positivo</b>
MMO7	M	55	Palato duro	<b>Positivo</b>

Abreviações: MMO: melanoma mucoso oral; F: feminino; M: masculino

Fonte: Adaptado de RESENDE *et al.*, 2021

## 5.2 Resultados da revisão narrativa de literatura

Atendendo aos critérios de revisão, um artigo foi incluído para os NMOs e vinte para os MMOs (TABELA 3). No total, adicionados os resultados do presente estudo, 42,1% das amostras de NMOs (8/19) e 6,4% dos MMOs (24/374) testaram positivo para a mutação *BRAF* p.V600E. A revisão reúne amostras de países variados e de MMOs primários, recorrentes e metastáticos (TABELA 3).

Calculou-se a média de idade dos pacientes em dois grupos, Wt e *BRAF* p.V600E-positivo, para as amostras em que foi possível identificar a idade individualmente. O artigo revisado de NMOs apresentou a idade dos pacientes para cada amostra e dentre os 20 artigos de MMOs incluídos 11 (55%) apresentaram a idade de cada paciente com a lesão. A média de idade dos pacientes com NMOs positivos para *BRAF* p.V600E (n=7) foi de 35,6 anos  $\pm$ 12,8, e para os NMOs Wt (n=11) de 34,7 anos  $\pm$  13,5 anos. Para os MMOs, os casos positivos para a mutação (n=09) tiveram média de idade de 59,1  $\pm$  11,2 anos e os casos Wt (n=128) média igual a 57,4  $\pm$  14,3 anos.

**Tabela 3** – Resumo da avaliação de *BRAF* p.V600E em nevos melanocíticos adquiridos mucosos orais e melanomas mucosos orais

Trabalhos com NMO e MMO	Método de detecção		Casos intrabucais (n) <sup>d</sup>	Casos positivos para <i>BRAF</i> p.V600E	<i>BRAF</i> p.V600E %	País <sup>e</sup>	Mediana de idade <i>BRAF</i> p.V600E (anos)	Mediana de idade de amostras <i>BRAF</i> Wt (anos)	Tipo de amostra
<b>Nevos intrabucais (Intramucosos)</b>									
Cohen <i>et al.</i> , 2012 <sup>a</sup>	MALDI_TOF Sanger	MS+	5	3	60	Israel	35	32	Não se aplica
Estudo atual	PCR-AE		14	5	35,71	Brasil	35,5	28	Não se aplica
	<b>Total</b>		<b>19</b>	<b>8</b>	<b>42,1</b>				
<b>Melanoma mucoso oral</b>									
Wong C. W. <i>et al.</i> , 2005	Sanger		7	0	0	China	NI	NI	Tumores primários ou metástases
Beadling <i>et al.</i> , 2008 <sup>b</sup>	DHPLC e Sanger		7	0	0	EUA	NI	NI	Tumores primários, recorrências ou metástases
Buery <i>et al.</i> , 2011	Sanger		15	0	0	Japão	NI	NI	Tumores primários
Cohen <i>et al.</i> , <sup>a</sup>	MALDI_TOF Sanger	MS+	3	1	33,33	Israel	38	71,5	Tumores primários
Krauthammer <i>et al.</i> , 2012 <sup>a</sup>	WES e Sanger		1	0	0	EUA	NI	75	Metástases
Colombino <i>et al.</i> , 2013	Sanger		1	0	0	Itália	NI	NI	Não informado
Soma <i>et al.</i> , 2014	Pirosequenciamento		2	1	50	Itália	63	79	Tumores primários ou metástases linfonodais
Lyu <i>et al.</i> , 2016 <sup>b</sup>	HRM e Sanger		57	0	0	China	NI	NI	Tumores primários
Hsieh <i>et al.</i> , 2017	Pirosequenciamento		14	3	21,42	Brasil, Bolívia	69	63	Tumores primários
Lian <i>et al.</i> , 2017 <sup>c</sup>	Não informado		104	13	12,5	China	NI	NI	Tumores primários
Öztürk Sari <i>et al.</i> , 2017	Sanger		13	0	0	Turquia	NI	NI	Não informado
Ablain <i>et al.</i> , 2018	Sequenciamento		6	0	0	EUA	NI	64	Tumores primários

	direcionado							ou metástases	
Chen <i>et al.</i> , 2018	Sanger ou WES	8	0	0	China	NI	56,5	Tumores primários	
Gao <i>et al.</i> , 2018	Sanger	3	0	0	Taiwan	NI	NI	Tumores primários	
Lyu <i>et al.</i> , 2018 <sup>a</sup>	WES e Sanger	19	0	0	China	NI	57	Tumores primários	
Maldonado-Mendoza <i>et al.</i> , 2019	PCR-AE	25	2	8	México	NI	NI	Tumores primários	
Newell <i>et al.</i> , 2019	WGS ou WES	20	1	5	Austrália, Reino Unido, EUA	China, NI	59	51	Tumores primários, recorrências, metástases linfonodais ou à distância
Shi <i>et al.</i> , 2019	Sequenciamento direcionado	2	0	0	EUA	NI	NI	NI	Não informado
Wong K. <i>et al.</i> , 2019	WES	3	0	0	Descendentes europeus	NI	70	70	Tumores primários
Zhou <i>et al.</i> , 2019 <sup>a</sup>	WGS + Sanger	57	0	0	China	NI	57	57	Maioria de tumores primários
Estudo atual	PCR-AE	7	3	42,85	Peru (n=1), México (n=4), Brasil (n=2)	NI	55	73	Tumores primários
	<b>Total</b>	<b>374</b>	<b>24</b>	<b>6,42</b>					

<sup>a</sup> Cohen *et al.*, 2012; Krauthammer *et al.*, 2012, Lyu *et al.*, 2018 e Zhou *et al.*, 2019 utilizaram o sequenciamento de Sanger para validar as mutações encontradas.

<sup>b</sup> Apenas amostras positivas ou ambíguas in DHPLC e HRM foram sequenciadas por Sanger nos trabalhos de Beadling *et al.*, 2008 e Lyu *et al.*, 2016.

<sup>c</sup> Lian *et al.* (2017) não especificam se as mutações no gene *BRAF* detectadas eram p.V600E. Os dados foram inseridos na tabela considerando que sim.

<sup>d</sup> Amostras localizadas em lábio não foram incluídas nessa tabela quando as informações não permitiram diferenciá-la de lesões cutâneas.

<sup>e</sup> O país representa a localização da instituição dos autores quando não especificado por amostra no artigo.

O trabalho de Heppt *et al.* (2017) não foi incluído na tabela, porque os autores não especificam quantos dos 24 melanomas orais abrigam a mutação *BRAF* p.V600E. Apenas estudos com descrição exata do número de MMO investigados foram incluídos nessa tabela. NMO: nevo melanocítico adquirido mucoso oral; MMO: melamoma mucoso oral; *BRAF* Wt: *BRAF* do tipo selvagem, ou seja, não-mutado para *BRAF* p.V600E; PCR-AE: reação em cadeia da polimerase alelo-específico; DHPLC: Desnaturação em cromatografia líquida de alta performance; HRM: Análise de alta resolução por fusão (High Resolution Melt); MALDI\_TOF MS: Espectrômetro de massa de tempo de ionização e dessorção a laser assistido por matriz baseado em chip (Chip-Based Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometer) (FU *et al.*, 1998); WES: Sequenciamento do exoma (Whole Exome Sequencing); WGS: Sequenciamento do genoma (Whole Genome Sequencing); NI: Não informado por *status* mutacional.

Fonte: Adaptado de RESENDE *et al.*, 2021.

## 6 DISCUSSÃO

A mutação *BRAF* p.V600E está frequentemente envolvida na patogênese do nevo melanocítico adquirido comum e do melanoma cutâneo de sítios sem exposição solar crônica, nos quais provavelmente representa o primeiro evento oncogênico. Cerca de 80% desse subtipo de nevo e até 50% dos melanomas cutâneos exibem a alteração. Sobre essa temática molecular há evidências incipientes para duas lesões melanocíticas da mucosa bucal: NMOs e MMOs. No trabalho que se apresenta, investigou-se um grupo de 14 NMOs intramucosos e 7 MMOs primários quanto à mutação p.V600E no gene *BRAF* e revisou-se a literatura para calcular a frequência da mutação nessas lesões.

Os NMOs incluídos nesse estudo se localizaram com maior frequência em mucosa jugal e palato duro, apresentaram mediana de idade de 29 anos e essa lesão foi mais frequente em mulheres. Esses dados estão de acordo com o que é reportado na literatura para a lesão em termos de maior incidência (TAVARES *et al.*, 2018). O grupo de 7 MMOs avaliados também apresentou características clínicas compatíveis com aquelas da literatura, acometendo mais frequentemente o palato duro, em uma proporção similar entre homens e mulheres e com mediana de idade ao diagnóstico de 65 anos (SORTINO-RACHOU *et al.*, 2009).

Das 14 amostras de NMOs incluídas no presente trabalho, 35,7% exibiram a mutação *BRAF* p.V600E. Na revisão narrativa de literatura, encontrou-se apenas um trabalho que havia investigado essa mutação em NMOs, e esse apresentou frequência de 60% dos casos mutados (COHEN *et al.*, 2012). Em conjunto, 8/19 amostras de NMOs intramucosos exibiram a mutação *BRAF* p.V600E, correspondendo a 42,1% das lesões. Nevos adquiridos comuns cutâneos e da região anogenital exibem a mutação numa taxa de 80% e 73,2% (30/41), respectivamente. Os estudos de nevos da região genital incluem lesões mucosas e da pele glabra e não-glabra circundante (ICHI NAKATO *et al.*, 2006; NGUYEN *et al.*, 2010; TSENG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2007). Os resultados apontam para menor prevalência da mutação *BRAF* p.V600E em NMOs comparados a outros sítios, apesar da limitação do número de amostras bucais avaliadas. Provavelmente outras mutações somáticas ocorrem no NMO, incluindo mutações em *NRAS*, o que merece investigação.

Quando estratificados por subtipo histológico, nevos adquiridos comuns cutâneos juncionais exibem *BRAF* p.V600E menos frequentemente (20% a 35,7%) que os subtipos composto (50% a 70%) e intradérmico (63,6% a 88%) (POLLOCK *et al.*, 2003; QI *et al.*, 2011; ZALAUDEK *et al.*, 2011). O subtipo intradérmico é o correspondente histológico do NMO intramucoso, cuja frequência de *BRAF* p.V600E foi calculada em 42,1% na revisão narrativa. NMOs juncionais e compostos não foram avaliados até o momento quanto a alterações genéticas.

A média de idade não diferiu entre os pacientes com NMOs *BRAF* p.V600E (35,6 ± 12,8 anos) e NMOs Wt (34,7 ± 13,5 anos). Zalaudek *et al.* (2011) sugerem que no nevo melanocítico adquirido comum cutâneo mutações *BRAF* p.V600E sejam encontradas frequentemente em pacientes mais jovens, sendo a média de idade de 37 anos. Nos pacientes com nevos Wt a média de idade relatada no estudo supracitado foi de 44 anos. Os autores não calcularam o desvio padrão (ZALAUDEK *et al.*, 2011). Outros autores encontraram média de idade de 48 ± 16,7 anos para nevos adquiridos comuns cutâneos que expressam *BRAF*<sup>V600E</sup> e 53,5 ± 11,3 anos para nevos adquiridos comuns cutâneos que não expressam a proteína citada (KIURU *et al.*, 2018).

O cálculo da frequência da mutação *BRAF* p.V600E em 374 casos de MMOs resultou em frequência de 6,4%. Nassar e Tan (2020) indicaram recentemente que 6% dos melanomas mucosos da região superior do corpo apresentam mutações no gene *BRAF* p.V600 (NASSAR e TAN, 2020). Portanto, com base nos nossos dados e de outros estudos, o MMO exibe *BRAF* p.V600E numa frequência menor do que o melanoma cutâneo. E frequência comparável a *BRAF* p.V600 em melanomas anogenitais (3%; n= 8/249) e à frequência geral de mutações no gene *BRAF* em melanomas sinonasais (5%; n=10/214) (NASSAR e TAN, 2020; ÖZTÜRK-SARI *et al.*, 2017). Zhou *et al.* (2019 – trabalho incluído na revisão narrativa) demonstraram que mutações somáticas pontuais como um todo são menos comuns no MMO em comparação à lesão de pele. Ao passo que, rearranjos genômicos em grande escala (variação do número de cópias gênicas e variantes gênicas estruturais) ocorrem com maior frequência nos MMOs. Até o momento Zhou *et al.* (2019) obtiveram a maior amostra de MMOs para análise com tecnologia de sequenciamento de nova geração (ZHOU *et al.*, 2019).

Nota-se certa variabilidade entre o percentual de MMOs mutados para *BRAF* p.V600E entre os diversos estudos da Tabela 3. As mais altas taxas

mutado/Wt foram observadas no contexto de tamanhos amostrais limitados (COHEN *et al.*, 2012; HSIEH *et al.*, 2017; RESENDE *et al.*, 2021; SOMA *et al.*, 2014), de modo que as diferenças podem ser atribuídas, pelo menos parcialmente, ao acaso pelo número amostral. Além disso, a sensibilidade da técnica de detecção influencia as frequências mutacionais observadas. No estudo atual, identificou-se a mutação *BRAF* p.V600E em 42,8% dos MMOs. O resultado é atribuído também à alta sensibilidade do PCR-AE, uma vez que a capacidade de detecção do ensaio é de até 1 célula mutada em 1000 células Wt, de acordo com o fabricante (BAO *et al.*, 2011; BAO *et al.*, 2012).

A idade de cada paciente estava disponível em cerca de metade dos estudos de MMOs da Tabela 3, totalizando 137 amostras. Calculou-se a média separadamente para MMOs Wt e com a presença da mutação *BRAF* p.V600E. A média de idade não foi diferente entre os dois grupos, sendo de  $57,4 \pm 14,3$  anos e  $59,1 \pm 11,2$  anos, respectivamente. Nos melanomas cutâneos, idade inferior a 60 anos foi correlacionada à frequência aumentada de mutações *BRAF*. Melanomas cutâneos com a mutação *BRAF* surgem em indivíduos mais jovens quando comparados a outros subtipos moleculares do melanoma de pele (BAUER *et al.*, 2011; SHAIN e BASTIAN, 2016).

A concordância do *status* mutacional de *BRAF* entre a lesão primária do melanoma e sua metástase é de grande interesse para o uso clínico de inibidores moleculares. Além disso, esse aspecto pode fornecer indícios sobre o processo de evolução clonal do tumor. Valachis e Ullenhag (2017) estimam uma taxa de discrepância do *status BRAF* de 13,4% para melanomas cutâneos (VALACHIS e ULLENHAG, 2017). Na revisão apresentada, limitou-se a citar coletivamente a procedência dos MMOs, e a correlação do tipo de amostra com o *status* mutacional não pôde ser analisada (RESENDE *et al.*, 2021).

De acordo com a revisão narrativa (TABELA 3) a frequência da mutação *BRAF* p.V600E foi maior na lesão benigna, o NMO (42,1%), do que no MMO (6,4%), de modo semelhante ao que ocorre em nevos melanocíticos adquiridos comuns e melanomas cutâneos e nevos comuns e melanomas de regiões anogenitais - que incluem mucosa e pele adjacente (Cancer Genome Atlas Network, 2015; TSENG *et al.*, 2014; WU *et al.*, 2007; YÉLAMOS *et al.*, 2016). Diversos autores investigam o fato de que algumas neoplasias benignas exibem determinados oncogenes numa maior frequência que a neoplasia maligna de mesma origem celular (KATO *et al.*,

2016). Uma possível explicação biológica para os nevos adquiridos comuns cutâneos, que são em maioria clinicamente estáveis, é que *BRAF* p.V600E promova ativação da via MAPK/ERK, levando à proliferação celular e formação da lesão, e em seguida atuem mecanismos regulatórios da via. Há algumas evidências de senescência celular em melanócitos que expressam *Braf*<sup>V600E</sup> em cultura celular, nos modelos animais e também em amostras de nevos melanocíticos adquiridos comuns cutâneos (DAMSKY e BOSENBERG, 2017; GOEL *et al.*, 2009; HUANG *et al.*, 2017; LAVOIE, GAGNON e THERRIEN, 2020; MICHALOGLOU *et al.*, 2005).

É possível que mecanismos similares ocorram no NMO, apesar da ausência de estudos que correlacionem a presença da mutação *BRAF* p.V600E e fosforilação (ativação) de Erk nessa lesão. Meleti *et al.* (2007b) e Liu *et al.* (2020) indicam que o NMO apresenta um risco baixo ou nulo de transformação maligna (LIU *et al.*, 2020; MELETI *et al.*, 2007b). Outras publicações indicam a superexpressão em NMOs de alguns inibidores do ciclo celular, como p16 e p27 e baixa taxa proliferativa, evidenciada pelo índice de expressão de Ki-67 (<1) e ausência da expressão de ciclina D1 (AMÉRIGO-GÓNGORA *et al.*, 2017; DE ANDRADE *et al.*, 2012; DE ANDRADE *et al.*, 2013).

De modo interessante, Tang e colaboradores (2020) não encontraram a mutação *BRAF* p.V600E ao sequenciarem melanócitos individuais de diferentes sítios cutâneos. Os melanócitos apresentaram, por outro lado, algumas mutações em *BRAF* que em outros estudos mostraram a capacidade de ativar apenas fracamente a via MAPK/ERK. Esses resultados reafirmam a teoria de que a mutação *BRAF* p.V600E está diretamente implicada no desenvolvimento do nevo, dada a prevalência de *BRAF* p.V600E nessa lesão e as evidências experimentais, que indicam que a mutação confere uma vantagem de proliferação celular em relação às células inalteradas (KUHNER, KOSTADINOV e REID, 2016; POLLOCK *et al.*, 2003; TANG *et al.*, 2020).

Uribe, Andrade e Gonzalez (2006) demonstraram que 93% dos melanomas cutâneos *BRAF* p.V600E exibem fosfo-Erk (pErk) citoplasmático ou nuclear. Venesio *et al.* (2008), por outro lado, não encontraram associação estatística entre o status mutacional do melanoma cutâneo e expressão de pErk. No entanto, evidenciam que o padrão de expressão imunohistoquímica de pErk era alto ou moderado no melanoma cutâneo, indicando hiperativação da via MAPK/ERK (URIBE, ANDRADE e GONZALEZ, 2006; VENESIO *et al.*, 2008). Apesar disso, a

ativação dessa via de sinalização proliferativa é um evento esperado no melanoma e pode ser decorrente de outras alterações moleculares. Hsieh (2012) observou superexpressão dos componentes de MAPK/ERK em 35 MMOs, 82,8% exibiam marcação citoplasmática para Braf, 51,4% para Mek2 e 74,2% para Erk2 (citoplasmática e nuclear), o que pode refletir sinalização por essa cascata de MAPKs (HSIEH, 2012; HSIEH *et al.*, 2017). No entanto, as proteínas avaliadas foram as proteínas totais, sendo que a detecção das formas fosforiladas das proteínas poderia melhor ser traduzida como ativação da via.

Em resumo, ao reunir informações sobre a frequência de *BRAF* p.V600E em um sítio anteriormente pouco explorado, este trabalho fornece novas evidências sobre o envolvimento da mutação na patogênese dos nevos melanocíticos adquiridos. A partir dos resultados nota-se ainda que, semelhante ao que ocorre em outros locais do corpo, *BRAF* p.V600E é mais frequente na lesão benigna do que na neoplasia melanocítica maligna, o que põe em discussão a denominação dessa alteração como mutação *driver* (condutora) (KATO *et al.*, 2016; KUHNER, KOSTADINOV e REID, 2016).

Além disso, o estudo revelou uma baixa frequência do oncogene no MMO. E apesar de pouco numeroso, é possível que o grupo com MMO *BRAF* p.V600E se beneficie pelo uso dos já aprovados inibidores de Braf e Mek em casos de doença metastática, e estudos clínicos são encorajados (CHAPMAN *et al.*, 2011; LUKE *et al.*, 2017; NENCLARES *et al.*, 2020).

Por fim, a revisão aponta que há escassa literatura sobre os aspectos moleculares de NMOs e MMOs, cujo entendimento irá favorecer a identificação de marcadores prognósticos para o MMO e também o desenvolvimento de terapias específicas para essa lesão.

## 7 CONCLUSÃO

Em conclusão, avaliou-se a presença da mutação *BRAF* p.V600E em amostras de 14 NMOs intramucosos e 7 MMOs primários por meio da técnica PCR-AE. Os resultados experimentais foram adicionados aos dados compilados da literatura, após análise detalhada, e calculou-se que a mutação *BRAF* p.V600E ocorre em uma frequência de 42,1% dos NMOs e 6,4% dos MMOs. A frequência nas duas lesões é menor do que encontrado nos nevos melanocíticos adquiridos comuns e melanomas cutâneos (80% e 40%, respectivamente), mas de modo similar é mais elevada na lesão benigna do que na neoplasia maligna. Os resultados desse trabalho contribuem para a caracterização molecular de NMOs e MMOs, em associação a algumas informações clínicas. Outros estudos deverão melhorar a compreensão do papel de *BRAF* p.V600E no contexto da patogênese de NMOs e MMOs, assim como potencial terapêutico em um subconjunto de pacientes com a lesão maligna.

## REFERÊNCIAS

ABLAIN, J., *et al.* Human tumor genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma. **Science**, 362(6418), 1055–60, 2018.

ADASHEK, J. J., *et al.* The paradox of cancer genes in non-malignant conditions: implications for precision medicine. **Genome Medicine**, 12(1): 16, 2020. doi:10.1186/s13073-020-0714-y.

ALICEA, M.G.; V, W. REBECCA. Emerging Strategies to Treat Rare and Intractable Subtypes of Melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 2020. doi:10.1111/pcmr.12880.

ASCIERTO, P. A. *et al.* Mucosal melanoma of the head and neck. **Critical Reviews In Oncology/Hematology**, 112, 136-152, abr. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.019>.

AMÉRIGO-GÓNGORA, M., *et al.* Clinicopathological and immunohistochemical analysis of oral melanocytic nevi and review of the literature. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, 118(3), 151–155, 2017. doi:10.1016/j.jormas.2017.03.003.

BAO, Y. *et al.* Accurate and Sensitive Mutation Detection in Heterogeneous Cancer Research Specimens by castPCR Technology. Poster 3071, **American Association for Cancer Research**, 2011. Acesso em: [http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/cms\\_092764.pdf](http://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/cms_092764.pdf).

BAO, Y. *et al.* Cancer Biomarker Research using castPCR™ Technology. Poster 2100, **American Association for Cancer Research**, 2012. Acesso em: [https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/cms\\_102601.pdf](https://tools.thermofisher.com/content/sfs/posters/cms_102601.pdf). Resumo publicado, DOI: 10.1158/1538-7445.AM2012-2100. Acesso em: [https://cancerres.aacrjournals.org/content/72/8\\_Supplement/2100](https://cancerres.aacrjournals.org/content/72/8_Supplement/2100).

BARBANO, R. *et al.* Competitive allele-specific TaqMan PCR (Cast-PCR) is a sensitive, specific and fast method for *BRAF* V600 mutation detection in Melanoma patients. **Scientific Reports**, 5(1), 2015. doi:10.1038/srep18592.

BARKER, D. S. The dendritic cell system in human gingival epithelium. **Archives of Oral Biology**, 12(2), 203–IN12, 1967. doi:10.1016/0003-9969(67)90039-8.

BARKER, B.F., *et al.* Oral mucosal melanomas: the WESTOP Banff workshop proceedings. Western Society of Teachers of Oral Pathology. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, 83(6):672–9, 1997.

BARRETT, A. W.; RAJA, A. M. H. The immunohistochemical identification of human oral mucosal melanocytes. **Archives of Oral Biology**, 42(1), 77–81, 1997. doi:10.1016/s0003-9969(96)00113-6.

BARRETT, A.W.; SCULLY, C.: Human oral mucosal melanocytes: a review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 23: 97- 103, 1994.

BAUER, J., *et al.* *BRAF* mutations in cutaneous melanoma are independently associated with age, anatomic site of the primary tumor, and the degree of solar elastosis at the primary tumor site. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 24(2), 345–351, 2011. doi:10.1111/j.1755-148x.2011.00837.x.

BEADLING, C., *et al.* *KIT* gene mutations and copy number in melanoma subtypes. **Clinical Cancer Research**, 14 (21):6821–8, 2008.

BUCHNER, A.; HANSEN, L. S. Pigmented nevi of the oral mucosa: A clinicopathologic study of 36 new cases and review of 155 cases from the literature. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, 63(6), 676–682, 1987. doi:10.1016/0030-4220(87)90370-7.

BUCHNER, A., *et al.* Melanocytic nevi of the oral mucosa: a clinicopathologic study of 130 cases from northern California. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, 19(5), 197–201, 1990. doi:10.1111/j.1600-0714.1990.tb00825.x.

BUCHNER, A.; MERRELL, P. W.; CARPENTER, W. M. Relative frequency of solitary melanocytic lesions of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, 33(9), 550–557, 2004. doi:10.1111/j.1600-0714.2004.00238.x.

BUERY, R.R., *et al.* *NRAS* and *BRAF* mutation frequency in primary oral mucosal melanoma. **Oncology Reports**, 26(4): 783–7, 2011. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1385>.

Cancer Genome Atlas Network. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. **Cell**, 161(7):1681-1696, 2015. doi:10.1016/j.cell.2015.05.044.

CHAE, Y.-S., *et al.* Survival of oral mucosal melanoma according to treatment, tumour resection margin, and metastases. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, 58: 1097-1102, 2020. doi:10.1016/j.bjoms.2020.05.028.

CHANG, A. E., KARNELL, L. H., & MENCK, H. R. (1998). The National Cancer Data Base report on cutaneous and noncutaneous melanoma. **Cancer**, 83(8), 1664–1678. doi:10.1002/(sici)1097-0142(19981015)83:8<1664::aid-cnrcr23>3.0.co;2-g.

CHAPMAN, P.B., *et al.* Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAFV600E mutation. **New England Journal of Medicine**, Jun 30;364(26):2507-16, 2011. doi: 10.1056/NEJMoa1103782.

CHEN, F., *et al.* *KIT*, *NRAS*, *BRAF* and *FMNL2* mutations in oral mucosal melanoma and a systematic review of the literature. **Oncology Letters**, 15(6):9786–92, 2018. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8558>.

CHI, Z., *et al.* Clinical presentation, histology, and prognoses of malignant melanoma in ethnic Chinese: A study of 522 consecutive cases. **BMC Cancer**, 11(1), 2011. doi:10.1186/1471-2407-11-85.

CLARK, W.H., *et al.* A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human Pathology**, 15(12):1147–65, 1984.

COHEN, Y., *et al.* *BRAF* and *GNAQ* mutations in melanocytic tumors of the oral cavity. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, 114(6), 778–784, 2012. doi:10.1016/j.oooo.2012.09.001.

COLOMBINO, M., *et al.* Unexpected distribution of *cKIT* and *BRAF* mutations among Southern Italian patients with sinonasal melanoma. **Dermatology**, 226(3):279–84, 2013. <https://doi.org/10.1159/000350683>.

DAMSKY, W. E., BOSENBERG, M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. **Oncogene**, 36(42), 5771–5792, 2017. doi:10.1038/onc.2017.189.

DAVIES, H., *et al.* Mutations of the *BRAF* gene in human cancer. **Nature**, 27;417(6892):949-54, 2002. doi: 10.1038/nature00766. Epub 2002 Jun 9. PMID: 12068308.

DE ANDRADE, B. A. B., *et al.* Immunohistochemical Expression of p16, p21, p27 and Cyclin D1 in Oral Nevi and Melanoma. **Head and Neck Pathology**, 6(3), 297–304, 2012. doi:10.1007/s12105-012-0334-y.

DE ANDRADE, B. A. B., *et al.* Expression of minichromosome maintenance 2, Ki-67, and geminin in oral nevi and melanoma. **Annals of Diagnostic Pathology**, 17(1), 32–36, 2013. doi:10.1016/j.anndiagpath.2012.05.001.

DEHDASHTIAN, A. *et al.* Anatomy and physiology of the skin. In: RIKER A. I. **Melanoma: A modern multidisciplinary approach**. Louisiana State University, New Orleans, USA, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-78310-9>.

ELDER, D.E., *et al.* The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, 2020. doi:10.5858/arpa.2019-0561-ra.

FEMIANO, F., *et al.* Oral malignant melanoma: a review of the literature. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 37(7), 383–388, 2008. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00660.x.

FERREIRA, L., *et al.* Oral melanocytic nevi: a clinicopathologic study of 100 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, 120(3), 358–367, 2015. doi:10.1016/j.oooo.2015.05.008.

FU, D.-J., *et al.* Sequencing exons 5 to 8 of the p53 gene by MALDI-TOF mass spectrometry. **Nature Biotechnology**, 16(4), 381–384, 1998. doi:10.1038/nbt0498-381.

GAO, H.W., *et al.* Distinct MAPK and PI3K pathway mutations in different melanoma types in Taiwanese individuals. **European Journal of Dermatology**, 28(4):509–18, 2018. <https://doi.org/10.1684/ejd.2018.3359>.

GOEL, V.K., *et al.* Melanocytic nevuslike hyperplasia and melanoma in transgenic BRAFV600E mice. **Oncogene**, 28 (23):2289–98, 2009.

GOLDEMBERG, D.C., *et al.* Epidemiological profile of mucosal melanoma in Brazil. **Scientific Reports**, [S.L.], 10, 1, 36-42, 16 jan. 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-57253-6>.

GREAVES, W.O., *et al.* Frequency and spectrum of *BRAF* mutations in a retrospective, single-institution study of 1112 cases of melanoma. **The Journal of Molecular Diagnostics**, Mar;15(2):220-6, 2013. doi: 10.1016/j.jmoldx.2012.10.002.

HEPPT, M.V., *et al.* Prognostic factors and treatment outcomes in 444 patients with mucosal melanoma. **Europeana Journal of Cancer**, 81:36–44, 2017.

HICKS, M., FLAITZ, C. Oral mucosal melanoma: epidemiology and pathobiology. **Oral Oncology**, 36(2), 152–169, 2000. doi:10.1016/s1368-8375(99)00085-8 .

HSIEH, R. **Melanoma primário da mucosa oral: estudo imunohistoquímico e molecular da via da MAPK.** 2012. 123f. Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2012.

HSIEH, R., *et al.* Mutational status of *NRAS* and *BRAF* genes and protein expression analysis in a series of primary oral mucosal melanoma. **The American Journal of Dermatopathology**, 39(2):104–10, 2017.

HUANG, J.M., CHIKEKA, I., HORNYAK, T.J. Melanocytic Nevi and the Genetic and Epigenetic Control of Oncogene-Induced Senescence. **Dermatologic Clinics**, Jan;35(1):85-93, 2017. doi: 10.1016/j.det.2016.08.001.

ICHII-NAKATO, N,. High frequency of BRAFV600E mutation in acquired nevi and small congenital nevi, but low frequency of mutation in medium-sized congenital nevi. **Journal of Investigative Dermatology**. Sep;126(9):2111-8, 2006. doi: 10.1038/sj.jid.5700366.

KRAUTHAMMER, M., *et al.* Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. **Nature Genetics**, 44(9):1006–14, 2012.

KATO, S., *et al.* The Conundrum of Genetic “Drivers” in Benign Conditions. **Journal of the National Cancer Institute**, 108(8), 2016. doi:10.1093/jnci/djw036.

KIURU, M., *et al.* Improving classification of melanocytic nevi: Association of BRAFV600E expression with distinct histomorphologic features. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 79(2), 221–229, 2018. doi:10.1016/j.jaad.2018.03.052.

KUHNER, M. K., KOSTADINOV, R., REID, B.J. Limitations of the Driver/Passenger Model in Cancer Prevention. **Cancer Prevention Research**, May;9(5):335-8, 2016. doi: 10.1158/1940-6207.CAPR-15-0343.

LAVOIE, H.; GAGNON, J.; THERRIEN M. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, Oct;21(10):607-632, 2020. doi: 10.1038/s41580-020-0255-7.

LAVOIE, H., THERRIEN, M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, May;16(5):281-98, 2015. doi: 10.1038/nrm3979. PMID: 25907612.

LEE, R. J., *et al.* Determining the epidemiologic, outcome, and prognostic factors of oral malignant melanoma by using the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **The Journal of the American Dental Association**, 148(5), 288–297, 2017. doi:10.1016/j.adaj.2017.01.019.

LIAN, B, *et al.* The natural history and patterns of metastases from mucosal melanoma: an analysis of 706 prospectively followed patients. **Annals of Oncology**, 28(4):868–73, 2017.

LIU, W., *et al.* Potential association between oral mucosal nevus and melanoma: A preliminary clinicopathologic study. **Oral Diseases**, 2020. doi:10.1111/odi.13335.

LUKE, J.J. *et al.* Targeted agents and immunotherapies: optimizing outcomes in melanoma. **Nature Reviews Clinical Oncology**, Aug;14(8):463-482, 2017. doi: 10.1038/nrclinonc.2017.43.

LYDIATT, W.M., *et al.* Mucosal melanoma of the Head and Neck. In: AMIN M.B. **AJCC Cancer Staging Manual**. 8<sup>th</sup> edition, American College of Surgeons, Chicago, USA. Springer Nature, 2017.

LYU, J., *et al.* Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets: WES of OMM reveals genomic alterations. **The Journal of Pathology**, 244(3):358–66, 2018.

LYU, J., *et al.* Mutation scanning of *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, and *GNAQ / GNA11* in oral mucosal melanoma: a study of 57 cases. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 45(4):295–301, 2016.

IIDA, Y., *et al.* Predominance of triple wild-type and IGF2R mutations in mucosal melanomas. **BMC Cancer**, 18(1), 2018 doi:10.1186/s12885-018-4977-2.

MACKIE, R.M., *et al.* The number and distribution of benign pigmented moles (melanocytic naevi) in a healthy British population. **British Journal of Dermatology**, 113: 167–74, 1985.

MALDONADO-MENDOZA, J., *et al.* CD117 immunoexpression in oral and sinonasal mucosal melanoma does not correlate with somatic driver mutations in the MAPK pathway. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 48(5):382–8, 2019. <https://doi.org/10.1111/jop.12849>.

MCLAUGHLIN, C. C., *et al.* Incidence of noncutaneous melanomas in the U.S. **Cancer**, 103(5), 1000–1007, 2005. doi:10.1002/cncr.20866.

MELETI, M., *et al.* Oral malignant melanoma: A review of the literature. **Oral Oncology**, 43(2), 116–121, 2007a. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.04.001.

MELETI, M., *et al.* Melanocytic nevi of the oral mucosa – No evidence of increased risk for oral malignant melanoma: An analysis of 119 cases. **Oral Oncology**, 43(10), 976–981, 2007b. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.11.013.

MICHALOGLOU, C. *et al.* BRAF<sup>E600</sup>-associated senescence-like cell cycle arrest of human naevi. **Nature**, Aug 4;436(7051):720–4, 2005. doi: 10.1038/nature03890.

MURALI, S., *et al.* Melanoma Epidemiology and Prevention. In: RIKER A. I. **Melanoma: A modern multidisciplinary approach**. Louisiana State University, New Orleans, USA, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-78310-9>.

NASSAR, K. W., TAN, A. C. The Mutational Landscape of Mucosal Melanoma. **Seminars in Cancer Biology**, 61:139-148, 2020. doi:10.1016/j.semcancer.2019.09.013.

NENCLARES, P., *et al.* Head and neck mucosal melanoma: The United Kingdom national guidelines. **European Journal of Cancer**, 138, 11–18, 2020. doi:10.1016/j.ejca.2020.07.017.

NEWELL, F., *et al.* Whole genome landscape of mucosal melanoma reveals diverse drivers and therapeutic targets. **Nature Communications**, 10(1):3163, 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11107-x>.

NGUYEN, L. P. *BRAF* V600E mutation and the tumour suppressor IGFBP7 in atypical genital naevi. **British Journal of Dermatology**. Mar;162(3):677-80, 2010. doi: 10.1111/j.1365-2133.2009.09558.x.

ÖZTÜRK-SARI, S. *et al.* *BRAF*, *NRAS*, *KIT*, *TERT*, *GNAQ/GNA11* mutation profile analysis of head and neck mucosal melanomas: a study of 42 cases. **Pathology**, 49(1):55–61, 2017. doi: 10.1016/j.pathol.2016.09.065.

PAMPENA, R., *et al.* A meta-analysis of nevus-associated melanoma: Prevalence and practical implications. **Journal of the American Academy of Dermatology**, Nov;77(5):938-945, 2017.e4. doi: 10.1016/j.jaad.2017.06.149.

PANDEYA, N., *et al.* Factors Related to Nevus-Associated Cutaneous Melanoma: A Case-Case Study. **Journal of Investigative Dermatology**. Aug;138(8):1816-1824, 2018. doi: 10.1016/j.jid.2017.12.036.

PATTON, E.E., *et al.* *BRAF* mutations are sufficient to promote nevi formation and cooperate with p53 in the genesis of melanoma. **Current Biology**, 8;15(3):249-54, 2005. doi: 10.1016/j.cub.2005.01.031.

PRASAD, M. L., *et al.* Primary mucosal melanoma of the head and neck. **Cancer**, 100(8), 1657–1664, 2004. doi:10.1002/cncr.20201.

PRIETO, V.G., *et al.* Mucosal melanoma. In: ELDER DE, MASSI D, SCOLYER RA, WILLEMZE R., editors, 2018. **WHO classification of skin tumours**, 4<sup>th</sup> ed. Lyon, IARC.

POLLOCK, P. M., *et al.* High frequency of *BRAF* mutations in nevi. **Nature Genetics**, 33(1), 19–20, 2002. doi:10.1038/ng1054.

QI, R.-Q., *et al.* *BRAF* Exon 15 T1799A Mutation Is Common in Melanocytic Nevi, but Less Prevalent in Cutaneous Malignant Melanoma, in Chinese Han. **Journal of Investigative Dermatology**, 131(5), 1129–1138, 2011. doi:10.1038/jid.2010.405.

RABBIE, R., *et al.* Melanoma subtypes: Genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. **The Journal of Pathology**, 2019. doi:10.1002/path.5213.

RAJ, A. T., PATIL, S., RAJKUMAR, C. Are oral mucosal nevi potential precursors for oral mucosal melanoma? **Oral Oncology**, 79, 83, 2018. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.02.018.

RAMBHIA, P.H., STOJANOV, I.J., ARBESMAN, J. Predominance of oral mucosal melanoma in areas of high mechanical stress. **Journal of American Academy of Dermatology**, 80(4):1133-1135, 2019. doi: 10.1016/j.jaad.2018.07.064.

RESENDE, T.A.C, *et al.* BRAFV600E mutation in oral melanocytic nevus and oral mucosal melanoma. **Oral Oncology**, 114:105053, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.105053.

ROH, M. R., *et al.* Genetics of melanocytic nevi. **Pigment Cell & Melanoma Research**, 28(6), 661–672, 2015. doi:10.1111/pcmr.12412.

SCHADENDORF, D., *et al.* Melanoma. **The Lancet**, 392(10151), 971–984, 2018. doi:10.1016/s0140-6736(18)31559-9.

SIMANSHU, D. K., NISSLEY, D. V., MCCORMICK, F. RAS Proteins and Their Regulators in Human Disease. **Cell**, 170(1), 17–33, 2017. doi:10.1016/j.cell.2017.06.009.

SHAIN, A. H., BASTIAN, B. C. From melanocytes to melanomas. **Nature Reviews Cancer**, 16(6), 345–358, 2016. doi:10.1038/nrc.2016.37.

SHAIN, A. H., *et al.* The Genetic Evolution of Melanoma from Precursor Lesions. **New England Journal of Medicine**, Nov 12;373(20):1926-36, 2015. doi: 10.1056/NEJMoa1502583.

SHI, K., *et al.* Distinct genomic features in a retrospective cohort of mucosal, acral and vulvovaginal melanomas. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jaad.2019.07.017>.

SOMA, P.F., *et al.* Oral malignant melanoma: a report of two cases with *BRAF* molecular analysis. **Oncology Letters**, 8 (3):1283–6, 2014. <https://doi.org/10.3892/ol.2014.2314>.

SONG, H., *et al.* Prognostic factors of oral mucosal melanoma: histopathological analysis in a retrospective cohort of 82 cases. **Histopathology**, 67(4), 548–556, 2015. doi:10.1111/his.12692.

SORTINO-RACHOU, A. M., *et al.* Primary oral melanoma: Population-based incidence. **Oral Oncology**, 45(3), 254–258, 2009. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.04.015.

SUN, C.-Z., *et al.* Treatment and prognosis of oral mucosal melanoma. **Oral Oncology**, 48(7), 647–652, 2012. doi:10.1016/j.oraloncology.2012.01.019.

TANG, J., *et al.* The genomic landscapes of individual melanocytes from human skin. **Nature**, 586, 600-605, 2020. doi:10.1038/s41586-020-2785-8.

TAVARES, T. S., *et al.* Pigmented lesions of the oral mucosa: A cross-sectional study of 458 histopathological specimens. **Oral Diseases**, 2018. doi:10.1111/odi.12924.

TSENG, D. *et al.* Oncogenic mutations in melanomas and benign melanocytic nevi of the female genital tract. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 71(2), 229–236, 2014. doi:10.1016/j.jaad.2014.03.033.

TSAO, H., *et al.* The Transformation Rate of Moles (Melanocytic Nevi) Into Cutaneous Melanoma. **Archives of Dermatology**, 139(3), 282, 2003. doi:10.1001/archderm.139.3.282.

TODD, J. R., *et al.* The MAPK pathway functions as a redundant survival signal that reinforces the PI3K cascade in c-Kit mutant melanoma. **Oncogene**, 33(2), 236–245, 2012. doi:10.1038/onc.2012.562.

TOMIZUKA, T., NAMIKAWA, K., HIGASHI, T. Characteristics of melanoma in Japan. **Melanoma Research**, 27(5), 492–497, 2017. doi:10.1097/cmr.0000000000000375.

TUMA, B., *et al.* Dermoscopy of black skin: A cross-sectional study of clinical and dermoscopic features of melanocytic lesions in individuals with type V/VI skin compared to those with type I/II skin. **Journal of the American Academy of Dermatology**, 73(1), 114–119, 2015. doi:10.1016/j.jaad.2015.03.043.

URIBE, P., ANDRADE, L., GONZALEZ, S. Lack of Association between *BRAF* Mutation and MAPK ERK Activation in Melanocytic Nevi. **Journal of Investigative Dermatology**, 126(1), 161–166, 2006. doi:10.1038/sj.jid.5700011.

VALACHIS, A., ULLENHAG, G. J. Discrepancy in *BRAF* status among patients with metastatic malignant melanoma: A meta-analysis. **European Journal of Cancer**, 81, 106–115, 2017. doi:10.1016/j.ejca.2017.05.015.

VENESIO, T., *et al.* In melanocytic lesions the fraction of BRAFV600E alleles is associated with sun exposure but unrelated to ERK phosphorylation. **Modern Pathology**, 21(6), 716–726, 2008. doi:10.1038/modpathol.2008.41.

WAN, P. T. Mechanism of Activation of the RAF-ERK Signaling Pathway by Oncogenic Mutations of B-RAF. **Cell**, 116(6), 855–867, 2004. doi:10.1016/s0092-8674(04)00215-6.

WILLIAMS, M.D., SPEIGHT, P., WENIG, B.M. Mucosal melanoma. In: EL-NAGGAR A.K., CHAN J.K.C., GRANDIS, J. R., TAKATA T., SLOOTWEG P.J. **WHO classification of head and neck tumours**. 4<sup>th</sup> edition. IARC: Lyon 2017.

WONG, C.W., *et al.* *BRAF* and *NRAS* mutations are uncommon in melanomas arising in diverse internal organs. **Journal of Clinical Pathology**, 58:640–4, 2005. <https://doi.org/10.1136/jcp.2004.022509>.

WONG, K., *et al.* Cross-species genomic landscape comparison of human mucosal melanoma with canine oral and equine melanoma. **Nature Communications**, 10(1), 2019. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-08081-1>.

WU, J., *et al.* Distribution of *BRAF* T1799A(V600E) Mutations Across Various Types of Benign Nevi: Implications for Melanocytic Tumorigenesis. **The American Journal of Dermatopathology**, 29(6), 534–537, 2007. doi:10.1097/dad.0b013e3181584950.

WU, Y., *et al.* The existence of early stage oral mucosal melanoma: A 10-year retrospective analysis of 170 patients in a single institute. **Oral Oncology**, 87, 70–76, 2018. doi:10.1016/j.oraloncology.2018.10.022.

WUSHOU, A., ZHAO, Y.-J. The Management and Site-Specific Prognostic Factors of Primary Oral Mucosal Malignant Melanoma. **The Journal of Craniofacial Surgery**, 26(2), 430–434, 2015. doi:10.1097/scs.0000000000001328.

YÉLAMOS, O. Nonoverlapping Clinical and Mutational Patterns in Melanomas from the Female Genital Tract and Atypical Genital Nevi. **Journal of Investigative Dermatology**. Sep;136(9):1858-1865, 2016. doi: 10.1016/j.jid.2016.05.094.

YEH, I., VON DEIMLING A., BASTIAN B.C. Clonal *BRAF* mutations in melanocytic nevi and initiating role of *BRAF* in melanocytic neoplasia. **Journal of the National Cancer Institute**, 105(12): 917–9, 2013. <https://doi.org/10.1093/jnci/djt119>.

YEH, I. New and evolving concepts of melanocytic nevi and melanocytomas. **Modern Pathology**, 2020. doi:10.1038/s41379-019-0390-x.

ZALAUDEK, I., *et al.* The Dermoscopic and Histopathological Patterns of Nevi Correlate with the Frequency of *BRAF* Mutations. **Journal of Investigative Dermatology**, 131(2), 542–545, 2011. doi:10.1038/jid.2010.332.

ZAMAN, A., WU, W., BIVONA, T.G. Targeting Oncogenic *BRAF*: Past, Present, and Future. **Cancers (Basel)**, 11(8):1197, 2019. Published 2019 Aug 16. doi:10.3390/cancers11081197.

ZHANG, W., *et al.* Number, Distribution and Dermoscopic Pattern of Melanocytic Naevi in a Chinese Population. **Acta Dermato-Venereologica**, 96(1), 134–135, 2016. doi:10.2340/00015555-2172.

ZHOU, R., *et al.* Analysis of mucosal melanoma whole-genome landscapes reveals clinically relevant genomic aberrations. **Clinical Cancer Research**, 25(12):3548–60, 2019.

## APÊNDICE A – Artigo publicado

RESENDE, T.A.C., *et al.* BRAFV600E mutation in oral melanocytic nevus and oral mucosal melanoma. **Oral Oncology**, 114:105053, 2021. doi: 10.1016/j.oraloncology.2020.105053. Acesso em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1368837520304899>.



Letter to the editor

**BRAFV600E mutation in oral melanocytic nevus and oral mucosal melanoma**

ARTICLE INFO

**Keywords**  
Oral melanoma  
Oral melanocytic nevi  
Mucosal melanoma  
Oral cancer

- genomics and zebrafish modeling identify SPRED1 loss as a driver of mucosal melanoma. *Science* 2018;362(6418):1055–60.
- [4] Beadling C, Jacobson-Dunlop E, Hodi FS, Le C, Warrick A, Patterson J, et al. KIT gene mutations and copy number in melanoma subtypes. *Clin Cancer Res* 2008;14(21):6821–8.
- [5] Buery RR, Siar CH, Katase N, Gunduz M, Lefevvre M, Fujii M, et al. NRAS and BRAF mutation frequency in primary oral mucosal melanoma. *Oncol Rep* 2011;26(4):783–7. <https://doi.org/10.3892/or.2011.1385>.
- [6] Chen F, Zhang Q, Wang Y, Wang S, Feng S, Qi LY, et al. KIT, NRAS, BRAF and FHM12 mutations in oral mucosal melanoma and a systematic review of the literature. *Oncol Lett* 2018;15(6):9786–92. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.8558>.
- [7] Colombino M, Lissia A, Franco R, Botti G, Ascierio PA, Manca A, et al. Unexpected distribution of cKIT and BRAF mutations among Southern Italian patients with sinonasal melanoma. *Dermatology* 2013;226(3):279–84. <https://doi.org/10.1159/000350683>.
- [8] Gao HW, Tsai WC, Perng CL, Wang WM, Chiang CP. Distinct MAPK and PI3K pathway mutations in different melanoma types in Taiwanese individuals. *Eur J Dermatol* 2018;28(4):509–18. <https://doi.org/10.1684/ejd.2018.3359>.
- [9] Heptit MV, Roesch A, Weide B, Gutzmer R, Meier F, Loquai C, et al. Prognostic factors and treatment outcomes in 444 patients with mucosal melanoma. *Eur J Cancer* 2017;81:36–44.
- [10] Hsieh R, Nico MMS, Camillo CMC, Oliveira KK, Sanguza M, Lourenço SV. Mutational status of NRAS and BRAF genes and protein expression analysis in a series of primary oral mucosal melanoma. *Am J Dermatopathol* 2017;39(2):104–10.
- [11] Krauthammer M, Kong Y, Ha BH, Evans P, Bacchocchi A, McCusker JP, et al. Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nat Genet* 2012;44(9):1006–14.
- [12] Lyu J, Song Z, Chen J, Shepard MJ, Song H, Ren G, et al. Whole-exome sequencing of oral mucosal melanoma reveals mutational profile and therapeutic targets: WES of OMM reveals genomic alterations. *J Pathol* 2018;244(3):358–66.
- Taynara Asevedo Campos de Resende<sup>a</sup>, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade<sup>b</sup>, Vanessa Fátima Bernardes<sup>c</sup>, Bruna Pizzio Coura<sup>a</sup>, Wilson Delgado-Azãnero<sup>d</sup>, Adalberto Mosqueda-Taylor<sup>e</sup>, Oslei Paes de Almeida<sup>f</sup>, Carolina Cavaliéri Gomes<sup>g,1,\*</sup>, Ricardo Santiago Gomez<sup>h,1,\*</sup>
- <sup>a</sup> Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil  
<sup>b</sup> Department of Oral Diagnosis and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil  
<sup>c</sup> Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil  
<sup>d</sup> Department of Oral Pathology, Oral Medicine and Oral Surgery, School of Dentistry, Universidad Peruana Ceyetano Heredia, Lima, Peru  
<sup>e</sup> Health Care Department, Universidad Autónoma Metropolitana Xochimilco, Mexico City, Mexico  
<sup>f</sup> Department of Oral Diagnosis, Piracicaba Dental School, University of Campinas (UNICAMP), Piracicaba, Brazil
- \* Corresponding authors.  
 E-mail addresses: [carolinagomes@ufmg.br](mailto:carolinagomes@ufmg.br) (C.C. Gomes), [rsgomez@ufmg.br](mailto:rsgomez@ufmg.br) (R.S. Gomez).

<sup>1</sup> These authors contributed equally to this work.

## ANEXO A – Parecer consubstanciado de aprovação emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DA EMENDA

**Título da Pesquisa:** INVESTIGAÇÃO DE ALTERAÇÕES MOLECULARES EM LESÕES MELANOCÍTIAS ORAIS

**Pesquisador:** Carolina Cavaliari Gomes

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 30178020.0.0000.5149

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.294.197

#### **Apresentação do Projeto:**

Trata-se de uma emenda com o objetivo de atender às recomendações solicitadas no parecer nº 4.133.614 emitido pelo CEP/UFMG. Foram incluídos no TALE os benefícios da pesquisa; no TCUD foram incluídos os blocos de parafina e lâminas histológicas coradas em hematoxilina-eosina na descrição dos dados.

Sobre o projeto de pesquisa:

Melanomas são neoplasias malignas que apresentam curso clínico agressivo, podendo ser classificados de acordo com o tecido de origem em: melanoma cutâneo, uveal, acral e mucoso. Os melanomas cutâneos são o grupo de melanomas mais bem estudado. Entre os fatores de risco para o seu desenvolvimento estão a exposição solar e a presença de nevo melanocítico, uma neoplasia benigna. Está bem estabelecido que nevos e melanomas cutâneos compartilham mutações somáticas, em especial mutações BRAF p.V600E numa elevada frequência. Essa característica possibilitou inovações no tratamento dos melanomas cutâneos e refletiu em aumento na sobrevida dos pacientes. Investigações acerca do perfil de alterações genômicas de melanomas mucosos revelaram uma carga mutacional menor quando comparados às lesões de pele e frequência variável de mutações em BRAF entre os estudos. Os melanomas de mucosa bucal são lesões raras e pouco estudadas, sendo sua etiologia pouco entendida. Da mesma forma, pouco se sabe sobre as alterações moleculares do nevo melanocítico da cavidade bucal. Assim, o objetivo do

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sl 2005

**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901

**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE

**Telefone:** (31)3409-4592

**E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.294.197

estudo é avaliar a presença de mutações patogênicas no gene BRAF nessas lesões. O projeto será submetido para avaliação e aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG. Será utilizada uma amostra de conveniência de tecidos fixados em formol e embebidos em parafina (FFPE) de nevos melanocíticos e melanomas orais do serviço de Patologia Bucomaxilofacial da UFMG. Serão realizadas a extração de DNA genômico e a Reação em Cadeia da Polimerase quantitativo em Tempo Real (PCR em tempo real) das amostras, utilizando ensaios comerciais específicos para o alelo de interesse. A análise dos resultados e descrição poderão contribuir no entendimento da patogênese dessas lesões, diagnóstico precoce e indicar oportunidades terapêuticas.

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Investigar a presença de mutações em nevos melanocíticos adquiridos orais e melanomas mucosos orais.

**Objetivo Secundário:**

I. Investigar a presença da mutação BRAF p.V600E em NMOs.

II. Investigar a presença da mutação BRAF p.V600E em melanomas mucosos orais.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

Por não haver intervenção de procedimentos com os participantes envolvidos e apenas a utilização de materiais e dados fornecidos para fins de pesquisa, há o risco de quebra de sigilo de dados. O risco de perda de confidencialidade das informações dos pacientes será minimizado por meio da atribuição inicial de um código alfa-numérico para cada um dos participantes, assim como o compromisso dos pesquisadores em manter o sigilo de dados dos participantes, conforme TCUD assinado.

**Benefícios:**

Favorecer o delineamento de biomarcadores, estratificação de risco e estratégias precoces de intervenção de lesões melanocíticas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Pesquisa relevante para as áreas de Patologia Bucal, Estomatologia e Oncologia. Término previsto para 30/07/2021. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo departamento em 10/12/2019 e foi aprovado pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Faculdade de

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sítio 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.294.197

Odontologia - UFMG em 17/02/2020.

A presente emenda busca atender às recomendações solicitadas pelo parecer nº 4133614 emitido pelo CEP/UFMG em 03 de julho de 2020. Os (as) pesquisadores (as) realizaram as seguintes alterações:

1. Foi incluído ao TALE os benefícios da pesquisa;
2. Ao TCUD foram incluídos os blocos de parafina e lâminas histológicas coradas em hematoxilina-eosina na descrição dos dados.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Além dos documentos anexados anteriormente para a análise do projeto de pesquisa, foram anexados para a presente emenda:

- TCUD modificado;
- TALE lâminas e blocos nevos melanomas modificado;
- Carta-resposta informando sobre os objetivos da emenda;
- Informações básicas da pesquisa com as informações atualizadas da emenda.

**Recomendações:**

Recomenda-se, s.m.j., que a atual emenda ao projeto de pesquisa "Investigação de alterações moleculares em lesões melanocíticas orais" da pesquisadora responsável Profa Drª Carolina Cavalieri Gomes seja aprovada.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Emenda aprovada.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o CEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
----------------	---------	----------	-------	----------

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sl 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.294.197

Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1590284_E1.pdf	06/07/2020 18:55:14		Aceito
Outros	Carta_resposta_cep_2.pdf	06/07/2020 18:54:02	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TermoTCUD_nevosemelanomas_alt.pdf	06/07/2020 18:51:01	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TALE_laminasebloocos_nevosemelanomas_alt.pdf	06/07/2020 18:50:33	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Outros	Carta_resposta_cep.pdf	05/06/2020 18:04:33	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_laminasebloocos_maiores_de_idade_nevosemelanomas.pdf	05/06/2020 18:03:25	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_laminasebloocos_destinado_aos_pais_de_menores_de_idade_nevosemelanomas.pdf	05/06/2020 18:03:15	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Carta_justificativa_dispensa_TCLE_nevosemelanomas.pdf	05/06/2020 18:02:36	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	2020_Taynara_Resende_projeto_mestrado_alteracao.pdf	05/06/2020 18:02:21	Lucyene Miguita Luiz	Aceito
Folha de Rosto	folha_rosto_lesoes_melanociticas_taynara.pdf	12/03/2020 20:45:43	Carolina Cavalieri Gomes	Aceito
Parecer Anterior	Parecer_consubienciado_lesoes_melanociticas.pdf	09/03/2020 13:27:52	Carolina Cavalieri Gomes	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Autorizacao_L_Patologia_FO_UFMG_lesoes_melanociticas.pdf	09/03/2020 13:27:20	Carolina Cavalieri Gomes	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sl 2005  
 Bairro: Unidade Administrativa II CEP: 31.270-901  
 UF: MG Município: BELO HORIZONTE  
 Telefone: (31)3409-4592 E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 4.294.197

BELO HORIZONTE, 23 de Setembro de 2020

---

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

**Endereço:** Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2ª Ad Sl 2005  
**Bairro:** Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901  
**UF:** MG **Município:** BELO HORIZONTE  
**Telefone:** (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br