

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**  
**Instituto de Ciências Biológicas**

**Bruna Pizziolo Coura**

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS EM FOLÍCULOS DENTÁRIOS  
E TUMORES ODONTOGÊNICOS**

Belo Horizonte, MG  
2022

Bruna Pizziolo Coura

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES PATOGÊNICAS EM FOLÍCULOS DENTÁRIOS  
E TUMORES ODONTOGÊNICOS**

**Versão Final**

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

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, MG  
2022

043

Coura, Bruna Pizzolo.

Investigação de mutações patogênicas em folículos dentários e tumores odontogênicos [manuscrito] / Bruna Pizzolo Coura. – 2022.

104 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Prof. Dr. Carolina Cavaliéri Gomes. Coorientadora: Prof. Dr. Vanessa de Fátima Bernardes.

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

1. Patologia. 2. Tumores Odontogênicos. 3. Saco Dentário. 4. Mutação. 5. Carcinogênese. I. Gomes, Carolina Cavaliéri. II. Bernardes, Vanessa de Fátima. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. IV. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG

**ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO Nº 454 DE BRUNA PIZZIULO COURA**

Realizou-se, no dia 26 de setembro de 2022, às 9 horas, por videoconferência, plataforma online, a defesa de Tese, intitulada *"Investigação de Mutações Patogênicas em Folículos Dentários e Tumores Odontogênicos"*, apresentada por **Bruna Pizziole Coura**, número de registro **2018752728**, graduada no curso de **Ciências Biológicas**, como requisito parcial para a obtenção do Grau de Doutor em **PATOLOGIA**, à seguinte Comissão Examinadora: **Prof. Dr. Jean Nunes dos Santos**, Universidade Federal da Bahia; **Prof. Dr. Fabrício Passador-Santos**, Instituto e Centro de Pesquisas São Leopoldo Mandic/Campinas/SP; **Dr. Rennan Garcias Moreira**, CELAM/UFMG; **Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca**, Faculdade de Odontologia/UFMG; **Profa. Dra. Vanessa de Fátima Bernardes**, ICB/UFMG – COORIENTADORA; **Profa. Dra. Carolina Cavalieri Gomes**, ICB/UFMG – ORIENTADORA.

A Comissão considerou a Tese:

**(X) Aprovada**

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

Belo Horizonte, 26 de setembro de 2022.

\* De acordo com as Normas Gerais de Pós-Graduação da UFMG o grau de Doutor só será concedido ao aluno que entregar ao Colegiado do Curso, no prazo máximo de 60 dias, a versão final da Tese, em conformidade com as indicações da Comissão Examinadora. Após a entrega da versão final com a documentação exigida para emissão de diploma, a secretaria emitirá Certificado de Conclusão do Doutorado.



Documento assinado eletronicamente por **Vanessa de Fatima Bernardes**, Professora do Magistério Superior, em 13/10/2022, às 15:48, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavalieri Gomes**, Professora do Magistério Superior, em 13/10/2022, às 15:54, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabrício Passador Santos**, Usuário Externo, em 27/10/2022, às 11:33, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Felipe Paiva Fonseca**, Professor do Magistério Superior, em 10/11/2022, às 21:07, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Rennan Garcias Moreira**, Biólogo, em 11/11/2022, às 09:28, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Jean Nunes dos Santos, Usuário Externo**, em 22/11/2022, às 17:44, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufmg.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1827251** e o código CRC **59A4DBA0**.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre me guiar e me dar força para realizar minhas conquistas.

Aos meus pais, meus irmãos, agregados e sobrinhos, por me oferecerem o que chamo de lar, pela criação, pela torcida. Aos avós, presentes em corpo e/ou na memória, meu mais carinhoso sentimento por cada momento de aconchego e pelas orações.

À minha orientadora e professora Carolina Cavaliéri Gomes, por confiar em mim, pela dedicação, paciência, oportunidades e ensinamentos oferecidos sempre, que foram imprescindíveis ao meu crescimento profissional desde minha iniciação científica! Ao professor Ricardo Santiago Gomez, também pelas oportunidades e ensinamentos ao longo desses anos.

À minha coorientadora, professora Vanessa de Fátima Bernardes, pela valiosa contribuição de conhecimento, paciência e dedicação durante este trabalho.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Patologia Molecular (Odontologia-UFMG) e Laboratório de Biologia Integrativa do Câncer (ICB-UFMG), por toda e qualquer contribuição ao trabalho compartilhando conhecimentos e experiências. Também agradeço aos amigos do laboratório pela convivência, por compartilhar dificuldades e conquistas.

A todos os professores e profissionais que fizeram parte da minha trajetória acadêmica e que contribuíram com meu trabalho de Doutorado. Em especial aos do Departamento de Patologia Geral (ICB); aos professores Sílvia Ferreira de Sousa da Universidade Federal de Minas Gerais, Bruno Augusto Benevenuto de Andrade e Mario José Romañach da Universidade Federal do Rio de Janeiro, Helder Antônio Rebelo Pontes da Universidade Federal do Pará, Edward William Odell do King's College London/Guy's Hospital por contribuírem com amostras para o estudo; Clínica de Patologia, Estomatologia e Radiologia II e Serviço de Patologia Bucomaxilofacial (FO-UFMG) pelo apoio técnico e amostras disponibilizadas; doutor Rennan Garcias Moreira do Laboratório Multiusuários de Genômica (ICB-UFMG); Centro de Aquisição de Imagens (ICB-UFMG), pela captura de imagens digitais. Aos pacientes que gentilmente colaboraram para a realização deste estudo.

À UFMG, à agência de fomento CNPq pela concessão da bolsa e apoio financeiro durante o curso, e às agências de fomento FAPEMIG e CAPES também pelo apoio financeiro.

Obrigada a todos que estiveram comigo nessa trajetória!

“O começo de toda ciência é o espanto de as coisas serem o que são”

Aristóteles

## RESUMO

Mutações patogênicas foram descritas em neoplasias benignas, incluindo tumores odontogênicos. No entanto, a patogênese molecular dos tumores odontogênicos mistos e do ameloblastoma adenoide (AA) não foi elucidada. Os tumores odontogênicos mistos apresentam proliferação tanto dos componentes epiteliais quanto ectomesenquimais. Esse grupo é composto pelo fibroma ameloblástico (FA), neoplasia benigna que muitas vezes é precursora do fibrossarcoma ameloblástico (FSA), pelo fibrodentinoma ameloblástico (FDA) e fibro-odontoma ameloblástico (FOA), cuja natureza e classificação ainda são motivo de debate, e pelos odontomas, hamartomas. O AA é uma neoplasia epitelial odontogênica recentemente reconhecida como entidade. Ele apresenta similaridade microscópica com outros tumores odontogênicos, incluindo o ameloblastoma, causado pela mutação *BRAF* p.V600E, e o tumor odontogênico adenomatoide, cuja assinatura molecular são mutações em *KRAS*. A análise da base genética das lesões supracitadas pode aprimorar o conhecimento acerca de sua patogênese molecular, auxiliando na definição de marcadores moleculares para fins de diagnóstico. Os cistos e tumores odontogênicos podem se originar do folículo dentário, que consiste em uma estrutura embrionária. Porém, pouco se sabe a respeito dos eventos moleculares relacionados à tumorigênese nesse contexto. Mutações patogênicas em genes supressores de tumor e oncogenes foram reportadas em tecidos normais. Assim, a análise molecular de folículo dentário poderia levar a uma melhor compreensão de mudanças ocorridas em estágios iniciais da tumorigênese, podendo auxiliar indiretamente na prevenção e diretamente na detecção tumoral em estágios iniciais. Portanto, os objetivos desse estudo foram: 1) investigar mutações *hotspot* em oncogenes e genes supressores de tumor em tumores odontogênicos mistos, 2) avaliar mutações patogênicas em *KRAS* e *BRAF* no AA e 3) investigar a presença das mutações em *KRAS* e *BRAF* em folículo dentário associados a dentes inclusos, uma vez que estas mutações ocorrem em uma grande proporção de ameloblastomas e tumor odontogênico adenomatoide. Para alcançar o primeiro objetivo, foi utilizado um *cohort* de descoberta de tumores odontogênicos mistos, sequenciados por Sequenciamento de Nova Geração (NGS) utilizando um painel de mutações *hotspot* em 50 oncogenes e genes supressores de tumor. A mutação *BRAF* p.V600E detectada foi confirmada por qPCR em tempo real alelo-específico e testada em um *cohort* de validação, que incluiu 28 tumores odontogênicos mistos, em que 22 foram submetidos à microdissecção e captura a laser, permitindo-se avaliar o *status* da mutação do componente epitelial e do componente mesenquimal separadamente. A mutação *BRAF* p.V600E foi detectada por NGS em 2/4 amostras do *cohort* de descoberta, e em 4/10 (40%) FA, 2/4 (50%) FDA, 2/6 (33%) FOA e 2/3 (67%) FSA da *cohort* de validação, encontrando-se restrita ao componente mesenquimal em 7/9 dos casos com mutação. Um caso de FSA apresentou uma área remanescente de FA, sendo ambos componentes mesenquimais (FSA e FA) positivos para a mutação. Os casos de odontoma (5/5) apresentaram *status wild-type* para a mutação *BRAF*. Para responder ao segundo e terceiro objetivos, as mutações *hotspot* *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e p.G12R foram avaliadas em uma amostra de conveniência de 9 AA e 48 folículos dentários utilizando-se qPCR em tempo real alelo-específico. Todos os casos de AA (9/9) e de folículo dentário (48/48) apresentaram *status wild-type* para as mutações *BRAF* p.V600E e *KRAS* p.G12V/R. Os resultados permitem concluir que o FA, FDA, FOA e FSA apresentam mutações *BRAF* p.V600E em componentes mesenquimais e que ao menos um subgrupo dessas lesões é molecularmente distinto dos odontomas. O AA e folículos dentários não apresentam mutações *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V/R, e, se estas ocorrerem, deve ser em frequência muito baixa.

**Palavras-chave:** Tumores odontogênicos. Ameloblastoma adenoide. Tumor odontogênico misto. Folículo dentário. Alterações genéticas. Mutações. MAPK. DNA. Tumorigênese.



## ABSTRACT

Pathogenic mutations have been reported in several benign neoplasms, including odontogenic tumors. The molecular pathogenesis of mixed odontogenic tumors and adenoid ameloblastoma (AA) has not yet been elucidated. Mixed odontogenic tumors present epithelial and ectomesenchymal components proliferation. This group is composed by ameloblastic fibroma (AF), a benign neoplasm that is often a precursor of ameloblastic fibrosarcoma (AFS), ameloblastic fibrodentinoma (AFD) and ameloblastic fibro-odontoma (AFO), whose nature and classification are still a matter of debate, and odontomas, which are hamartomas. AA is an epithelial odontogenic tumor recently recognized as an entity. It shares microscopic overlapping with other odontogenic tumors, including ameloblastoma, which harbors *BRAF* p.V600E, and adenomatoid odontogenic tumor, which harbors *KRAS* mutation. The analysis of the genetic basis of these lesions could improve the knowledge about their molecular pathogenesis and help defining molecular markers for diagnostic purposes. Odontogenic tumors and cysts can originate from the dental follicle, which is an embryonic structure. However, there is little information about the molecular events that triggers tumorigenesis. Pathogenic mutations in tumor suppressor genes and oncogenes have been reported in normal tissues. Thus, the molecular analysis of dental follicle could lead to a better understanding of changes that occur in the early stages of odontogenic neoplasms and could assist indirectly in the prevention and directly in the early stages tumor detection. Therefore, the aim of this study was: 1) to investigate the profile of molecular changes in mixed odontogenic tumors, 2) to evaluate the pathogenic mutations in *KRAS* and *BRAF* in AA and 3) to investigate the mutational status of *BRAF* and *KRAS* genes in dental follicle associated with impacted teeth, since these mutations occur in a large proportion of ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumor. To achieve the first objective, a discovery cohort composed of mixed odontogenic tumors was sequenced by Next Generation Sequencing (NGS) using a hotspot mutation panel of 50 oncogenes and tumor suppressor genes. *BRAF* p.V600E was detected and confirmed by allele-specific real-time qPCR, and tested in a validation cohort, which included a total of 28 cases of mixed odontogenic tumors, with 22 being submitted to microdissection and laser capture, allowing to assess the status the mutational status of epithelial and mesenchymal components separately. The *BRAF* p.V600E pathogenic mutation was reported by the NGS in 2/4 samples from the discovery cohort. This mutation was detected in 4/10 (40%) AF, 3/4 (50%) AFD, 2/6 (33%) AFO and 2/3 (67%) AFS of the validation cohort, and it was found to be limited to the mesenchymal component in 7/9 mutation-positive cases. One case of AFS showed a remnant area of AF, with both mesenchymal components (AFS and AF) being positive for the mutation. Odontoma cases (5/5) were wild-type for the *BRAF* p.V600E mutation. To answer the second and third objectives, the *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V and p.G12R hotspot mutations were evaluated in a convenience sample of 9 AA and 48 dental follicles using allele-specific real-time qPCR. All cases of AA and dental follicle revealed wild-type status for *BRAF* p.V600E and *KRAS* p.G12V/R mutations. On the basis of the results, we conclude that AF, AFD, AFO and AFS present *BRAF* p.V600E in the mesenchymal component and that at least a subgroup of these lesions is molecularly distinct from odontomas. AA and dental follicles do not have *BRAF* p.V600E and *KRAS* p.G12V/R mutations, and if these do occur, they must occur at a very low frequency.

**Keywords:** Odontogenic tumours. Adenoid ameloblastoma. Mixed odontogenic tumour. Dental follicle. Genetic changes. Mutations. MAPK. DNA. Tumorigenesis

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Informações clínicas e resultados moleculares do qPCR em tempo real alelo-específico das amostras de tumores odontogênicos mistos.....	55
<b>Tabela 2:</b>	Análise dos resultados brutos dos tumores odontogênicos mistos da <i>cohort</i> de descoberta submetidos ao NGS.....	58
<b>Tabela 3:</b>	Caracterização das variantes SNV do tipo <i>missense</i> detectadas em tumores odontogênicos mistos da <i>cohort</i> de descoberta sequenciados por NGS utilizando o painel Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2.....	59
<b>Tabela 4:</b>	Informações clínicas e resultados moleculares do qPCR em tempo real alelo-específico das amostras de ameloblastoma adenoide.....	62
<b>Tabela 5:</b>	Dados clínicos e resultados moleculares de 48 casos de folículos dentários.....	64

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Aspecto histopatológico dos tumores odontogênicos mistos.....	18
<b>Figura 2:</b>	Aspecto histopatológico do fibrossarcoma ameloblástico.....	19
<b>Figura 3:</b>	Características radiográficas do fibroma ameloblástico.....	20
<b>Figura 4:</b>	Características radiográficas e macroscopia do odontoma.....	24
<b>Figura 5:</b>	Características clínicas e radiográficas do ameloblastoma adenoide.....	26
<b>Figura 6:</b>	Aspecto histopatológico do ameloblastoma adenoide.....	27
<b>Figura 7:</b>	Ilustração esquemática da odontogênese e padrões embriológicos histológicos observados no dente em desenvolvimento.....	28
<b>Figura 8:</b>	Via de sinalização MAPK/ERK e seus principais componentes.....	33
<b>Figura 9:</b>	Mutações patogênicas na via MAPK/ERK em tumores odontogênicos.....	36
<b>Figura 10:</b>	Diagrama esquemático da metodologia do estudo.....	44
<b>Figura 11:</b>	Microdissecção e captura a laser.....	52
<b>Figura 12:</b>	Análise dos resultados moleculares da mutação patogênica <i>BRAF</i> p.V600E em tumores odontogênicos mistos.....	60
<b>Figura 13:</b>	Análise dos resultados do NGS, variantes não patogênicas detectadas em tumores odontogênicos mistos da <i>cohort</i> de descoberta.....	61
<b>Figura 14:</b>	Análise dos resultados moleculares dos ameloblastomas adenoide.....	63
<b>Figura 15:</b>	Análise dos resultados moleculares dos remanescentes de folículos dentários.....	66

## LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ameloblastoma adenoide
<i>BRAF</i>	<i>B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
CAAE	Certificado de Apresentação de Apreciação Ética
C.C.G.	Carolina Cavaliéri Gomes
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
COSMIC	<i>Catalogue of somatic mutations in cancer</i>
CT	<i>Cycle threshold</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
FA	Fibroma ameloblástico
FD	Folículo dentário
FDA	Fibrodentínoma ameloblástico
FFPE	Amostras fixadas em formol tamponado e incluídas em parafina
FOA	Fibro-odontoma ameloblástico
FSA	Fibrossarcoma ameloblástico
GAPs	Proteína ativadora de GTPase
gDNA	Ácido desoxirribonucleico genômico
GEFs	Fatores de troca de nucleotídeos guanina
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
GTPase	Enzimas que hidrolisam o GTP.
<i>H&amp;E</i>	Hematoxilina e Eosina
<i>Hg19</i>	<i>Human Genome 19</i>
IGV	<i>Integrated Genomics Viewer</i>
JNK	<i>Jun NH2 terminal kinases</i>
KDR	<i>Kinase insert domain receptor</i>
<i>KIT</i>	<i>KIT proto-oncogene, receptor tyrosine kinase</i>

<i>KRAS</i>	<i>KRAS proto-oncogene, GTPase</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein kinases</i>
MEK	<i>Dual-specificity protein kinases</i>
<i>mTOR</i>	<i>Mammalian target of the rapamycin</i>
ng	Nanogramas
NGS	<i>Next generation sequencing</i>
OD	Odontoma
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCGA	<i>Pre-Cancer Genome Atlas</i>
PDX	Xenoinxerto derivado de paciente
PIK3CA	<i>Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>
<i>PolyPhen2</i>	<i>Polymorphism phenotyping v2</i>
pM	Picomolar
<i>Q score</i>	<i>Phred quality score</i>
R.S.G.	Ricardo Santiago Gomez
<i>SIFT</i>	<i>Sorting Intolerant From Tolerant</i>
SNV	Variante de nucleotídeo único
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único
TP53	<i>Tumor protein p53</i>
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
V.F.B.	Vanessa de Fátima Bernardes

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 Tumores odontogênicos.....	16
2.1.1 Tumores odontogênicos mistos.....	16
2.1.1.1 Fibroma ameloblástico (FA) e fibrossarcoma ameloblástico (FSA) .....	20
2.1.1.2 Fibrodentinoma ameloblástico (FDA) e fibro-odontoma ameloblástico (FOA)..	21
2.1.1.3 Odontomas.....	23
2.1.2 Ameloblastoma adenoide.....	25
2.2 Folículo dentário.....	28
2.3 Mutações patogênicas e via MAPK.....	30
2.3.1 Mutações patogênicas .....	30
2.3.2 Via das MAPKs, com enfoque na MAPK/ERK.....	30
2.3.2.2 Cross-talk entre a via MAPK e outras vias .....	34
2.3.3 Mutações patogênicas na via MAPK em tumores odontogênicos.....	35
2.3.3.1 Mutações patogênicas em RAS.....	36
2.3.3.2 Mutações patogênicas em RAF .....	38
2.3.4 Terapia alvo com inibidores de componentes da via MAPK .....	39
2.3.5 Mutações patogênicas em contexto não neoplásico.....	40
2.3.6 Detecção de mutações patogênicas por NGS.....	41
3. OBJETIVOS .....	43
3.1 Objetivo principal.....	43
3.2 Objetivos secundários.....	43
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	44
4.1 Aspectos Éticos .....	45
4.2 Seleção e inclusão das amostras .....	45
4.2.1 Tumores mistos.....	45
4.2.1.1 Cohort de descoberta .....	45
4.2.1.2 Cohort de validação .....	45
4.2.2 Ameloblastoma adenoide.....	46
4.2.3 Remanescente de folículo dentário associado a dente incluso.....	46
4.3 Extração de DNA.....	46

4.4 Análise de variantes.....	47
4.4.1 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) .....	47
4.4.1.1 Preparo da amostra.....	48
4.4.1.2 Construção de template .....	49
4.4.1.3 Análise bioinformática .....	49
4.4.1.4 Análise in silico .....	50
4.4.2 Microdissecção e captura a laser.....	51
4.4.3 qPCR em tempo real alelo-específico .....	52
4.4.4 Sequenciamento de Sanger.....	54
5. RESULTADOS .....	55
5.1 Tumores mistos .....	55
5.1.1 Caracterização das amostras .....	56
5.1.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS) .....	56
5.1.3 Detecção da mutação BRAF p.V600E por qPCR em tempo real alelo-específico .....	57
5.2 Ameloblastoma adenoide .....	62
5.2.1 Caracterização das amostras .....	62
5.2.2 Análise molecular por meio de qPCR em tempo real alelo-específico .....	63
5.3 Remanescente de folículo dentário associado a dente incluso .....	63
5.3.1 Caracterização das amostras .....	65
5.3.2 Análise molecular por meio de qPCR em tempo real alelo-específico .....	65
5.3.3 Análise molecular por meio de sequenciamento de Sanger .....	65
6. DISCUSSÃO .....	67
7. CONCLUSÃO.....	73
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	74
APÊNDICES .....	85

## 1. INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos são um grupo heterogêneo de lesões com comportamento clínico e tipos histológicos diversos. De acordo com o componente proliferativo da lesão, os tumores podem ser classificados em tumores odontogênicos ectomesenquimais, epiteliais e mistos (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

Os tumores odontogênicos mistos são caracterizados por proliferação epitelial e ectomesenquimal de tecidos odontogênicos. O epitélio proliferativo pode apresentar efeito indutor no ectomesênquima em que se encontra embebido, podendo levar à formação de matriz de esmalte e matriz dentinoide. Algumas dessas lesões são classificadas como neoplasias verdadeiras, outras apenas como anomalias do desenvolvimento, enquanto um terceiro grupo apresenta natureza e classificação incerta até o momento (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017). O fibroma ameloblástico (FA), fibrodentinoma ameloblástico (FDA), fibro-odontoma ameloblástico (FOA), fibrossarcoma ameloblástico (FSA) e odontomas são tumores odontogênicos mistos, e podem apresentar características similares (PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017). Por isso, o diagnóstico dessas lesões pode ser desafiador, sendo necessária análise clínica e radiográfica juntamente com achados histopatológicos da peça cirúrgica (TAKEDA, 1999; CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

Os tumores odontogênicos epiteliais se desenvolvem a partir do epitélio odontogênico, e, nesse caso, não há proliferação neoplásica das células mesenquimais (TAKATA & SLOOTWEG, 2017). Recentemente, foi incluído na classificação dos tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial de Saúde (OMS) o ameloblastoma adenoide. O ameloblastoma adenoide consiste em uma neoplasia odontogênica epitelial muito rara. É uma lesão localmente invasiva e apresenta comportamento agressivo, demonstrando altas taxas de recidiva após tratamento conservador (LOYOLA *et al.*, 2015; ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018). O ameloblastoma adenoide compartilha características histopatológicas com ameloblastoma e tumor odontogênico adenomatoide (LOYOLA *et al.*, 2015; ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018), e também pode apresentar similaridade microscópicas com lesões odontogênicas ricas em células fantasmas, como cisto odontogênico calcificante, tumor dentinogênico de células fantasmas e carcinoma odontogênico de células fantasmas (LOYOLA *et al.*, 2015).



O folículo dentário é uma estrutura embriológica conjuntiva formada por células que apresentam potencial para se diferenciarem em estruturas de suporte para o dente: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (KATCHBURIAN & ARANA, 2004; NANCI, 2013). O folículo dentário ajuda no processo de erupção do dente e se mantém retido em caso de dentes inclusos (KATCHBURIAN & ARANA, 2004; DOROTHEOU *et al.*, 2013; NANCI, 2013; HAGHANIFAR *et al.*, 2014). Em estudos retrospectivos, são eventualmente diagnosticados cistos e tumores odontogênicos, além de carcinomas, em regiões adjacentes associadas a remanescentes de folículos dentários que envolvem dentes impactados, o que indica um potencial importante dessas estruturas no desenvolvimento de doenças (CURRAN *et al.*, 2002; YILDIRIM *et al.*, 2008; SLATER, 2009). Porém, os eventos moleculares que ocorrem no folículo dentário associado a dentes inclusos ao longo da vida do indivíduo são pouco estudados e ainda não foram elucidados.

Mutações patogênicas, que já foram consideradas *hallmarks* exclusivamente de cânceres (HANAHAN & WEINBERG, 2000; LAZEBNIK, 2010), têm sido descritas em diversas neoplasias benignas, incluindo tumores odontogênicos, porém a patogênese molecular de muitas delas ainda não foi elucidada (MARINO-ENRIQUEZ & FLETCHER, 2014; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017; GOMES, 2022). Como exemplo, podemos observar alta prevalência de mutações patogênicas em genes da via MAPK em tumores odontogênicos, incluindo: *BRAF* p.V600E em ameloblastomas (KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015) e mutação *KRAS* p.G12V e p.G12R em tumores odontogênicos adenomatoides (GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019). Esses estudos têm ajudado a esclarecer a patogênese de algumas neoplasias, demonstrando algum potencial em auxiliar patologistas em diagnósticos difíceis (DINIZ *et al.*, 2017; GOMES, 2022). Além disso, mutações em componentes de outras vias que podem realizar *cross-talk* com a via MAPK/ERK, incluindo a via WNT/ $\beta$ -catenina, também foram descritas em frequência variada em lesões benignas e malignas (SEKINE *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2014; YUKIMORI *et al.*, 2017; JEONG *et al.*, 2018).

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Tumores odontogênicos

Os tumores odontogênicos são um grupo raro e complexo de tumores dos maxilares que englobam lesões neoplásicas e hamartomatosas. Apresentam-se com maior frequência como lesões benignas, porém podem apresentar características de agressividade, como crescimento local infiltrativo e alta taxa de recorrência. Estes tumores derivam de elementos epiteliais e/ou ectomesenquimais que participam da odontogênese. De acordo com o componente proliferativo da lesão, os tumores podem ser classificados em tumores odontogênicos ectomesenquimais, epiteliais e mistos, embora algumas lesões tenham sofrido reclassificações ao longo dos anos como reflexo do melhor entendimento sobre interações entre epitélio mesênquima e dados genéticos e moleculares de cada lesão (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017). O objeto de estudo deste trabalho são os tumores odontogênicos mistos e o ameloblastoma adenoide.

#### 2.1.1 Tumores odontogênicos mistos

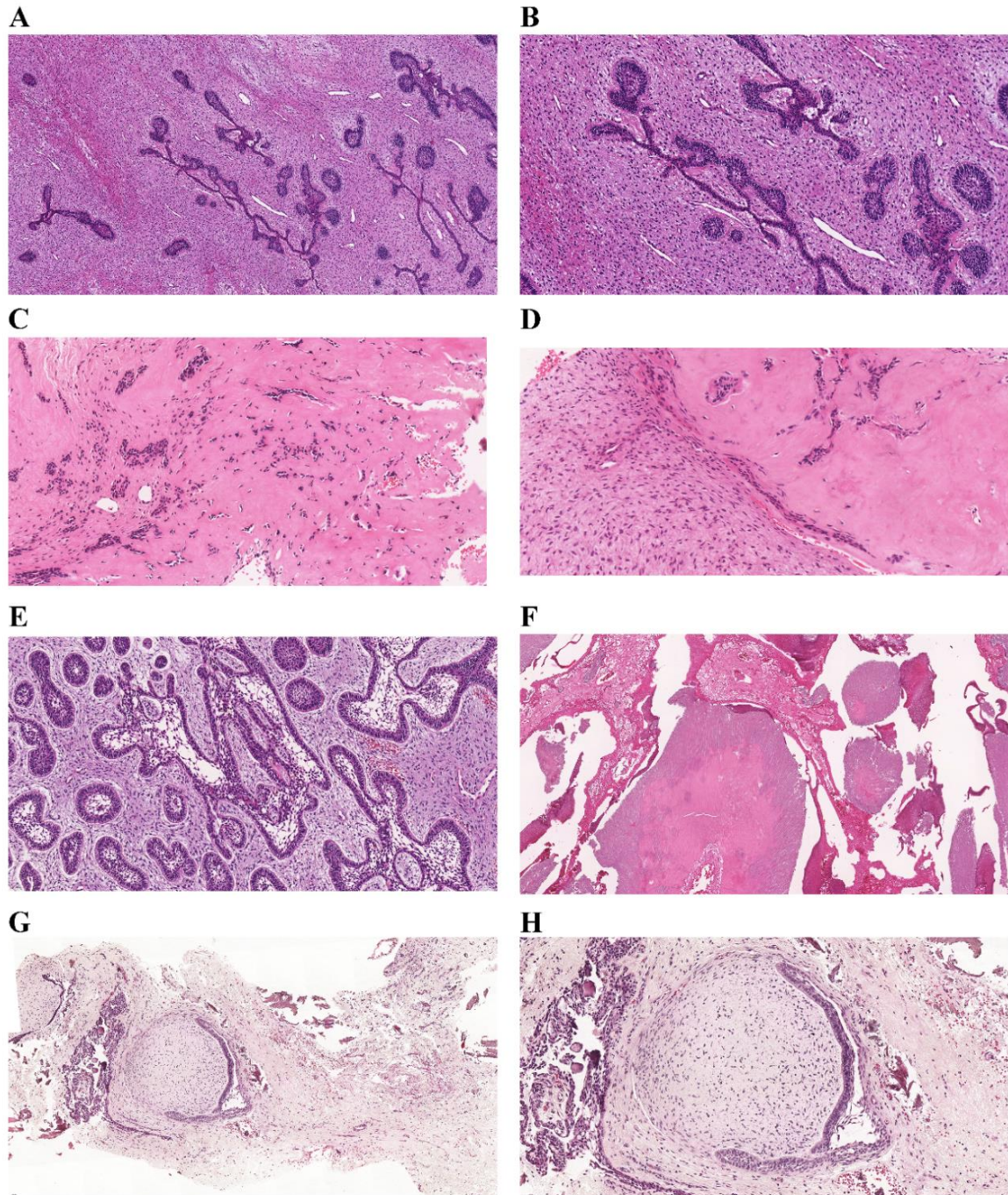
Os tumores odontogênicos mistos são lesões que apresentam proliferação epitelial e ectomesenquimal de tecidos odontogênicos. Esse grupo é caracterizado por um epitélio proliferativo embebido em um ectomesênquima semelhante à papila dentária que, assim como na odontogênese normal, apresentam interações indutivas em diferentes níveis. Dessa forma, o epitélio da lesão pode apresentar efeito indutor no ectomesênquima no qual se prolifera, podendo levar à formação de tecido dental duro, como por exemplo matriz de esmalte e matriz dentinoide (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017). Algumas dessas lesões são classificadas como neoplasias verdadeiras, sejam elas benignas ou malignas, outras apenas como anomalias do desenvolvimento, enquanto outras apresentam natureza e classificação incerta até o momento (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

FA e FSA são considerados neoplasias verdadeiras, sendo o FA muitas vezes precursor do FSA, enquanto o odontoma é definido como lesão hamartomatosa. FDA e FOA, por sua vez, permanecem como lesões de natureza incerta (CHRCANOVIC *et al.*, 2017; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; SPEIGHT & TAKATA, 2018).

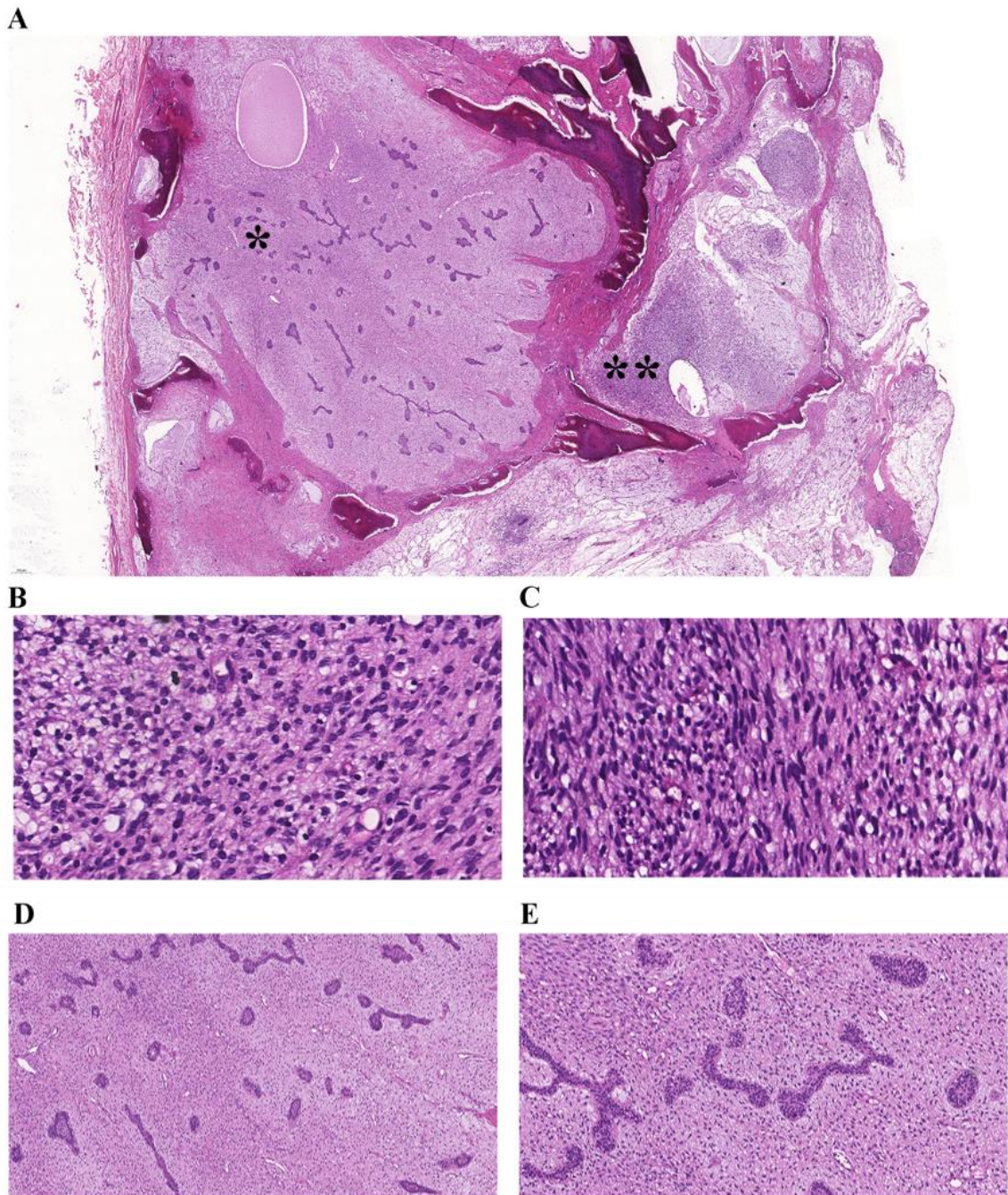
Em 1971, o FA foi classificado pela OMS como uma lesão benigna (KRAMER *et al.*, 1992), e desde então a natureza e comportamento biológico desse tumor e de algumas lesões

relacionadas têm sido debatidos (SLOOTWEG, 1981; PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA, 1999; TOMICH, 1999; CHEN *et al.*, 2005; CHRCANOVIC *et al.*, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018). Essas lesões podem apresentar em alguns casos características histopatológicas semelhantes (TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017), as quais podem ser observadas na Figura 1 e Figura 2, e estão descritas nos respectivos itens abaixo. Portanto, o diagnóstico dessas lesões pode ser desafiador e é de extrema importância a análise clínica e radiográfica juntamente com achados histopatológicos da peça cirúrgica (TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2016; CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

Estudos iniciais analisaram alterações moleculares em tumores mistos, incluindo alterações em *TP53*, *cKIT*, *PRKARIA* (BERNARDES *et al.*, 2012; SOUSA *et al.*, 2015) e *BRAF* (BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; YOU *et al.*, 2019; AGAIMY *et al.*, 2020). Ainda assim, existem poucos dados moleculares dos tumores odontogênicos mistos na literatura e não há dados suficientes para estabelecer a patogênese molecular de várias entidades. Um melhor entendimento de suas características moleculares poderia auxiliar no diagnóstico e talvez na classificação dessas lesões. O diagnóstico assertivo de tumores do grupo FA em seu estágio inicial, juntamente com realização de tratamento mais adequado, poderia diminuir a taxa de recorrência e reduzir o risco de crescimento excessivo do tumor. Dessa forma, diminui-se também a chance de haver consequências nocivas comprometimento funcional e deformidade estética do indivíduo (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018).



**Figura 1: Aspecto histopatológico dos tumores odontogênicos mistos.** Fotomicrografias representativas do fibroma ameloblástico (A e B), fibrodentinoma ameloblástico (C e D), fibro-odontoma ameloblástico (E e F) e odontoma (G e H). Histologicamente, os tumores odontogênicos mistos exibem ninhos e cordões de epitélio odontogênico embebidos em um tecido conjuntivo rico em células e de origem ectomesenquimal (A-E). Observa-se áreas compostas por produtos mineralizados que lembram matriz dentinoide presentes em fibrodentinoma ameloblástico (C, D) e fibro-odontoma ameloblástico (F), além de áreas basofílicas semelhantes a matriz de esmalte presentes em fibro-odontoma ameloblástico (F). Na figura também estão representados os componentes de tecido mole do fibro-odontoma ameloblástico (E). Nos odontomas são observadas áreas basofílicas compostas por material mineralizado compatível com matriz de esmalte, e áreas de organização semelhante ao órgão de esmalte, que se encontram adjacentes ao tecido celular semelhante à papila dentária (G e H). Coloração em Hematoxilina & Eosina. (aumento 50X em A, E, F e G), (aumento 200X em B e H), (aumento 400X em C e D). Fonte: COURA *et al.*, 2020.

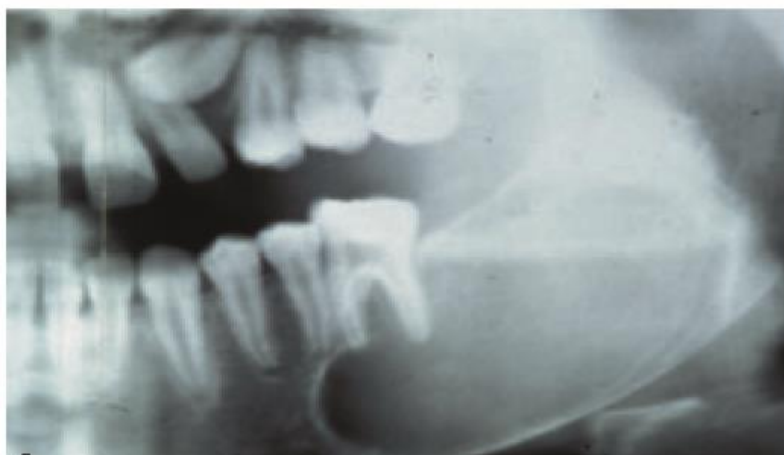


**Figura 2: Aspecto histopatológico do fibrossarcoma ameloblástico.** Nessa imagem observam-se características microscópicas representativas de uma das amostras de fibrossarcoma ameloblástico (#FSA1) em menor e maior aumento, demonstrando área sarcomatosa com alta celularidade e presença de núcleos hiper cromáticos, atipia celular e figuras mitóticas (A-C). Essa amostra apresentou área remanescente de fibroma ameloblástico (\*) além da área típica do tumor maligno (\*\*). Na área benigna, portanto, o componente epitelial e mesenquimal apresentaram aspectos histopatológicos característicos de neoplasia benigna e consistentes com fibroma ameloblástico (D e E). Coloração em Hematoxilina & Eosina. (aumento 50X em A e D), (aumento 100X em E), (aumento 200X em B), (aumento 400X em C). Fonte: COURA *et al.*, 2020.

### 2.1.1.1 Fibroma ameloblástico (FA) e fibrossarcoma ameloblástico (FSA)

O FA é um tumor benigno misto verdadeiro que não apresenta formação de tecido duro dental, sendo raro e correspondendo aproximadamente a 1,5 a 6,5% dos tumores odontogênicos (TAKATA & SLOOTWEG, 2017). Esta lesão pode ou não apresentar cápsula fibrosa. O FA acomete na maioria das vezes indivíduos jovens, geralmente com menos de 22 anos, em uma proporção de 1,4 homem para cada mulher. 82% dos casos de FA ocorrem na região posterior dos maxilares, sendo mais comum sua ocorrência na mandíbula (PHILIPSEN *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

Radiograficamente, o FA se apresenta na maioria das vezes como uma lesão unilocular radiolúcida (Figura 3), bem definida e pequena, e, em 80% dos casos, encontra-se associado a um dente não erupcionado (geralmente o primeiro ou segundo molar permanente). Em alguns casos, observam-se lesões multiloculares, podendo haver expansão da mandíbula; raramente pode apresentar grandes dimensões e deformidade facial (PHILIPSEN *et al.*, 1997; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).



**Figura 3: Características radiográficas do fibroma ameloblástico.** A imagem representa uma radiografia de fibroma ameloblástico, demonstrando uma lesão unilocular radiolúcida, circunscrita por uma borda esclerótica bem definida, na região posterior da mandíbula. Fonte: BARNES *et al.*, 2005.

Do ponto de vista histológico, representado na Figura 1, podem-se observar no FA cordões e ninhos de epitélio odontogênico neoplásico, que se assemelham à lâmina dentária e ao órgão de esmalte, em meio ao ectomesênquima, semelhante à papila dentária. Os cordões são estruturas longas e delgadas, compostas por duas camadas de células cuboidais ou colunares justapostas, e os ninhos são ilhas pequenas e discretas, formadas por células epiteliais colunares periféricas que envolvem células epiteliais arranjadas frouxamente. O componente ectomesenquimal do tumor contém células ovoides e estreladas em uma matriz frouxa. Por conta das suas similaridades histológicas com os odontomas em estágio inicial de

desenvolvimento, seu diagnóstico diferencial é muitas vezes difícil (PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

Nos casos que os tumores se apresentam como uma lesão pequena e assintomática, principalmente em crianças, o tratamento mais utilizado é a remoção conservadora, com a taxa de recidiva de 16% (TAKATA & SLOOTWEG, 2017). Nos casos de lesões com grandes dimensões ou recorrência, recomenda-se tratamento cirúrgico mais radical. Raras são as vezes em que pode ocorrer transformação maligna do tumor no componente mesenquimal, tendo como consequência a contraparte maligna do FA, o FSA, que está associado a um pior prognóstico. Por isso, é recomendado um longo acompanhamento no caso de ocorrência de FA (PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018). A taxa de recidiva e a possibilidade de transformação maligna ressaltam a importância do estudo dos FA (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018).

Estima-se que entre 25% e 50% dos casos de FSA se desenvolvam a partir de recidiva ou mesmo em sítio de FA prévio (TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018), o que condiz com o fato do FSA geralmente acometer a mandíbula de indivíduos jovens, porém, mais velhos dos que são acometidos pelo FA. Clinicamente, o FSA apresenta-se como uma lesão mais agressiva, sintomática, associado à expansão óssea e crescimento relativamente rápido. Nas imagens radiográficas de FSA, é comum serem encontrados múltiplos focos radiolúcidos com presença de bordas pouco definidas, muitas vezes indicando ocorrência de destruição óssea. Do ponto de vista histológico, a porção do epitélio apresenta características que lembram o aspecto do epitélio benigno também presente no FA. Na porção mesenquimal, podem ser observadas áreas de infiltração de tecidos moles adjacentes e altamente celularizadas, onde evidenciam-se atipias celulares, núcleos hipercromáticos e algumas figuras mitóticas, achados histopatológicos típicos de tumores malignos (Figura 2). Uma vez confirmado o diagnóstico, tratamentos mais agressivos são a melhor escolha, sendo recomendada ressecção segmentar e longo tempo de acompanhamento (CHEN *et al.*, 2005; CHEN *et al.*, 2007; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018).

#### 2.1.1.2 Fibrodentinoma ameloblástico (FDA) e fibro-odontoma ameloblástico (FOA)

O FDA e FOA são lesões raras e pouco caracterizadas, principalmente quando considerados os aspectos clínicos/radiográficos, cuja classificação e natureza ainda têm sido

debatidas na literatura. Em 2017, a Classificação dos tumores de cabeça e pescoço da OMS não incluiu o FDA e FOA como variantes raras de FA que demonstravam formação de tecido duro, como em edições prévias da classificação. Assim, nesta classificação elaborada para auxiliar o patologista generalista, optou-se por não classificar esses dois tumores como entidades distintas. Além disso, apesar de ainda haver opiniões controversas na literatura, foi levantada a possibilidade de grande parte das lesões diagnosticadas como FDA e FOA corresponderem a odontoma em desenvolvimento em diferentes estágios de maturação, embora ainda permaneçam dúvidas quanto à natureza e classificação dessas lesões (MOSQUEDA-TAYLOR, 2008; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; SPEIGHT & TAKATA, 2018). Mesmo que ainda exista a ideia de que um subgrupo desses casos representaria entidades distintas, tal classificação evitaria um tratamento agressivo e sequelas desnecessárias em grande parte dos pacientes. A classificação dos tumores de cabeça e pescoço da OMS de 2022 não apresentou mudanças em relação à classificação dessas lesões (WHO, 2022).

O FDA e o FOA geralmente acometem indivíduos até a segunda década de vida, dificilmente sendo encontrados em adultos. Há uma maior proporção de indivíduos afetados do sexo masculino e da região posterior da mandíbula. Na maioria das vezes, essas lesões apresentam tamanhos similares, e taxas de recorrências semelhantes entre si, porém menores e menos agressivas quando comparadas com FA (CHEN *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2016; CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

Radiograficamente, apresentam-se como lesão radiolúcida unilocular bem delimitada, com reabsorção de raiz de dente adjacente, presença de radiopacidade em níveis variados e associação com dente incluso (CHRCANOVIC *et al.*, 2017). Em 2018, um artigo de revisão sistemática apontou que 60% dos FDA analisados eram lesões uniloculares e 46% delas apresentaram radiopacidade, enquanto 87% dos FOA eram lesões uniloculares com presença de radiopacidade em 86% dos casos (CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

Histologicamente, o FDA e FOA são considerados intermediários entre FA e odontoma. Podem-se observar aspectos gerais extremamente semelhantes aos FA, principalmente ao observar o epitélio proliferativo, destacando-se pela formação de tecido dental duro com a deposição de material semelhante à dentina (FDA e FOA) e/ou material semelhante ao esmalte (FOA), o que se assemelha a um odontoma com menos material duro e menor grau de organização, como ilustrado na Figura 1 (PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA,



1999; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2017; VERED & WRIGHT, 2022). No entanto, o componente mesenquimal dos FA é mais celularizado e difere dos FDA e FOA. Por essas e outras questões, alguns autores ainda questionam se essas lesões representam entidades separadas, se seriam variantes raras de FA, ou até se seriam realmente consideradas como o estágio inicial de um odontoma em desenvolvimento (PHILIPSEN *et al.*, 1997; TAKEDA, 1999; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2017).

### 2.1.1.3 Odontomas

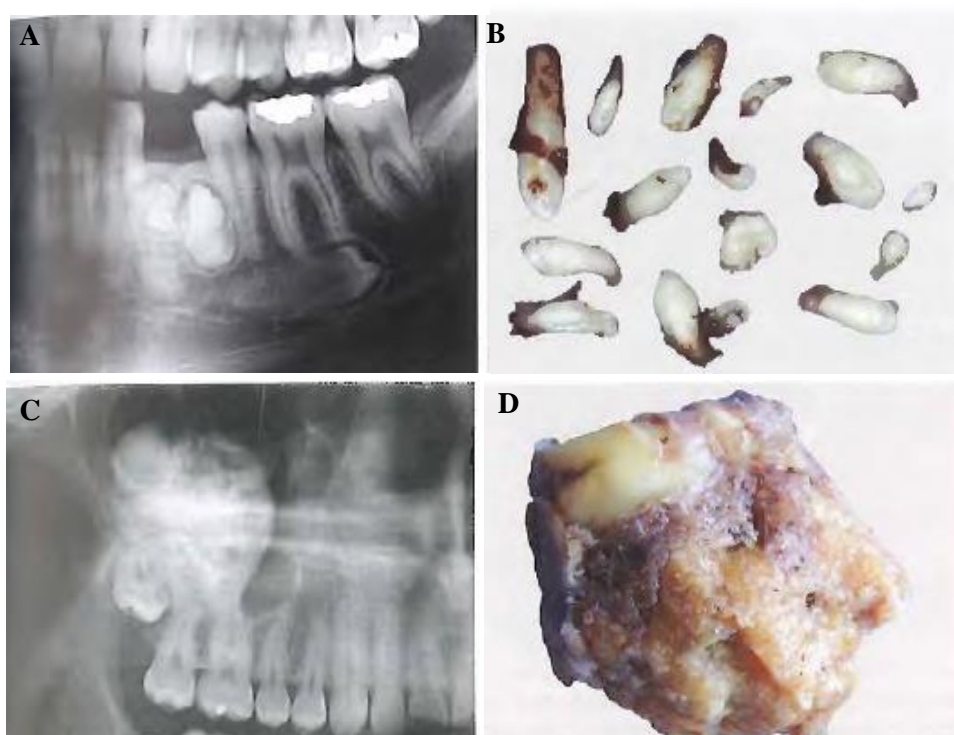
Os odontomas representam a maior parte do grupo dos tumores odontogênicos, porém não são considerados neoplasias verdadeiras e, sim, hamartomas, e são classificados em odontoma complexo e odontoma composto (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

Os odontomas são relativamente pequenos e geralmente são diagnosticados nas primeiras duas décadas de vida durante radiografias de rotina, já que grande parte dos casos são assintomáticos e de crescimento lento. Os odontomas não demonstram predileção por gênero, podem estar associados a um dente incluso e são encontrados tanto em mandíbula quanto em maxila. Enquanto odontomas complexos são mais frequentemente observados na região posterior da mandíbula, odontomas compostos usualmente acometem a região anterior da maxila (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

Considerando suas características radiográficas (Figura 4), a lesão inicialmente se apresenta como uma área radiolúcida com pontos de calcificação que se desenvolve em uma área radiopaca bem definida, circunscrita por borda radiolúcida. A radiopacidade dos odontomas se justifica devido à produção de material mineralizado: os odontomas complexos apresentam uma massa aglomerada de tecido calcificado, e podem ser facilmente confundidos com outras lesões ósseas muito calcificadas, enquanto odontomas compostos apresentam várias pequenas estruturas semelhantes ao dente, e por isso são mais fáceis de serem diagnosticados (CHEN *et al.*, 2005; NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

Histologicamente, os odontomas apresentam quantidade variável de epitélio e mesênquima odontogênico proliferativo em diferentes estágios do seu desenvolvimento, sendo possível observar estruturas semelhantes ao órgão de esmalte adjacentes a tecido

celular semelhante à papila dentária (Figura 1). O odontoma em seu estágio inicial apresenta tecidos que lembram o germe dentário, com produção pontual de material mineralizado. Quando em estágio mais avançado do processo de maturação, essas lesões apresentam áreas basofílicas que demonstram formação de tecidos que se assemelham aos tecidos dentários (matriz de esmalte, material dentinoide e cementoide) dispostos de maneira desorganizada formando estruturas amorfas (odontoma complexo), ou que se apresentam morfológicamente organizados, sendo eventualmente possível observar presença de dentículos (odontoma composto), como podemos observar na Figura 4 (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).



**Figura 4: Características radiográficas e macroscopia do odontoma.** Odontoma composto apresentando-se como lesão radiopaca com limites bem definidos, associada a dente incluído, acometendo a mandíbula entre as raízes de dentes e com aparente formação de estruturas semelhantes ao dente (A). Por vezes é possível observar essas estruturas macroscopicamente semelhantes ao dente, formando dentes rudimentares, também chamados de dentículos (B). Na imagem, observa-se também a radiografia de um odontoma complexo bem delimitado, localizado na maxila com associação a dente incluído e com presença de radiopacidade devido à produção de material mineralizado homogêneo disposto de maneira desorganizada (C). Visão macroscópica de uma massa de tecido calcificado proveniente de odontoma complexo anexado a um dente (D). Fonte: TAKATA & SLOOTWEG, 2017.

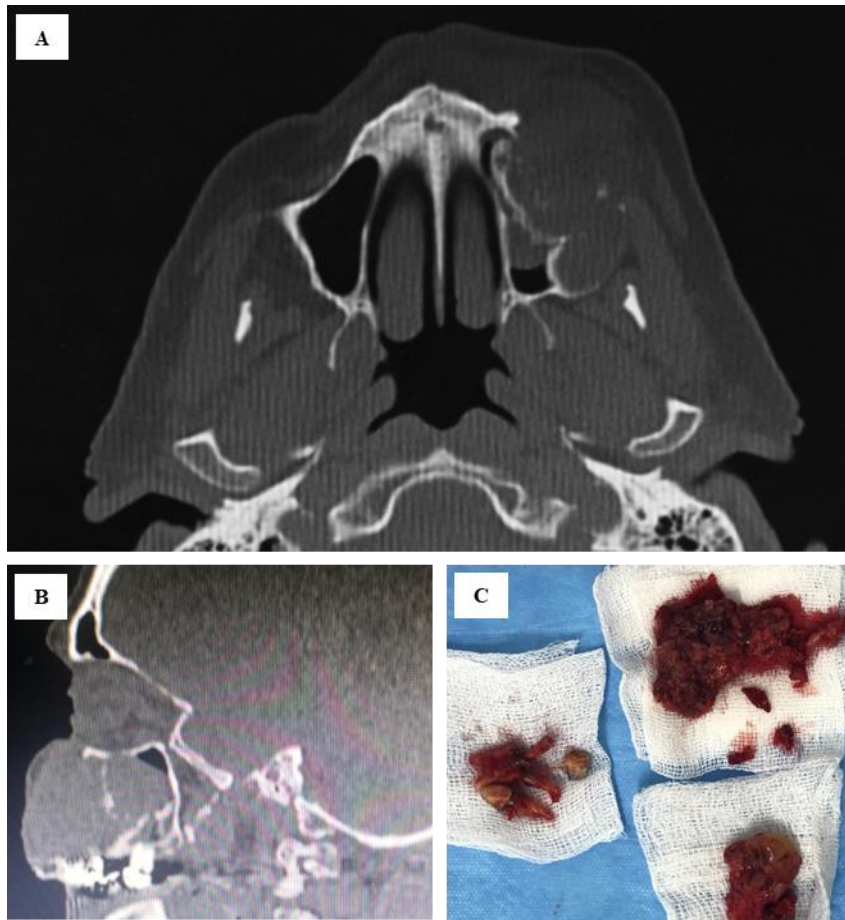
O tratamento convencional após diagnóstico do odontoma é a cirurgia conservadora. Recorrências são raras e, por isso, essas lesões apresentam um bom prognóstico (NEVILLE *et al.*, 2016; TAKATA & SLOOTWEG, 2017).

### 2.1.2 Ameloblastoma adenoide

A lesão foi descrita pela primeira vez em 1994 por Brannon (BRANNON, 1994) e, até meados de 2022, era sugerido que o ameloblastoma adenoide representasse uma variante histológica agressiva do ameloblastoma. O ameloblastoma adenoide é uma neoplasia epitelial muito rarae foi reconhecida pela primeira vez como uma entidade clínico-patológica distinta pela classificação clássica dos tumores de cabeça e pescoço a ser publicada em 2022 (MATSUMOTO *et al.*, 2001; SAXENA *et al.*, 2012; LOYOLA *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019; THAVARAJ & BILODEAU, 2022). É possível que alguns casos já tenham sido diagnosticados forma equivocada como outro tipo de tumor odontogênico, como, por exemplo, outros tipos de ameloblastomas ou até mesmo tumor odontogênico adenomatoide (MATSUMOTO *et al.*, 2001; SAXENA *et al.*, 2012; LOYOLA *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019).

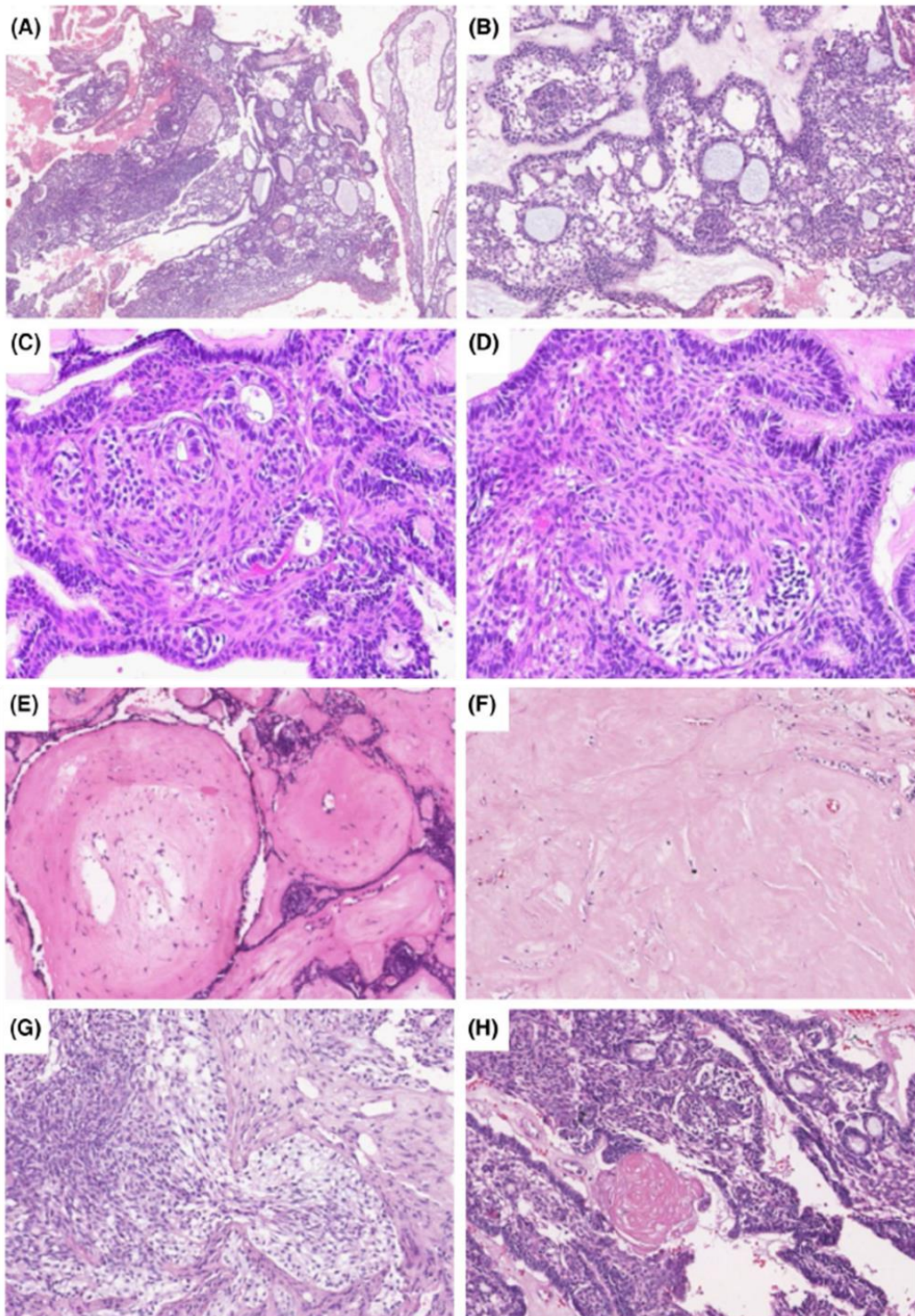
Clinicamente, o ameloblastoma adenoide manifesta-se como uma tumefação indolor, eventualmente exibindo quadro de dor e parestesia, e pode apresentar invasão local e taxa de recorrência de aproximadamente 70% após enucleação. É uma lesão que afeta indivíduos da segunda à quinta década de vida, com pico de incidência na quarta década, demonstrando taxa de prevalência discretamente mais alta em homens (H:M= 1,3:1) e propensão ao acometimento da região da mandíbula (64,7%) (LOYOLA *et al.*, 2015; THAVARAJ & BILODEAU, 2022).

Análises de imagens radiográficas de ameloblastoma adenoide indicam lesões hipodensas (82%), podendo ser bem definidas ou difusas, com possíveis áreas focais hiperdensas, destruição óssea e reabsorção da raiz de dentes adjacentes, como representado na Figura 5 (MATSUMOTO *et al.*, 2001; SAXENA *et al.*, 2012; LOYOLA *et al.*, 2015; ARRUDA *et al.*, 2019; MARTINS-CHAVES *et al.*, 2021; VERED & WRIGHT, 2021).



**Figura 5: Características clínicas e radiográficas do ameloblastoma adenoide.** Vista axial (A) e sagital (B) de tomografia computadorizada de um dos ameloblastomas adenoide analisados (#AA5). Observa-se lesão unilocular expansiva na maxila superior esquerda, composta por massa hipodensa, com alguns pontos sugestivos de calcificações internas, ocupando grande parte do seio maxilar, provocando reabsorção óssea na região e invasão da cavidade nasal. Material proveniente de ressecção da lesão e ostectomia periférica reforçando o comportamento agressivo da lesão (C). Fonte: Cortesia professor Júlio César Tanos de Lacerda.

Histopatologicamente, na nova classificação dos tumores de cabeça e pescoço da OMS foram propostos critérios essenciais para o diagnóstico do ameloblastoma adenoide (THAVARAJ & BILODEAU, 2022). Os critérios essenciais incluem: a presença de componente semelhante a ameloblastoma, estruturas semelhantes a ductos, conferindo um aspecto cribiforme à lesão, e formação de redemoinhos ou mórulas. Além desses critérios essenciais para diagnóstico do ameloblastoma adenoide, há os critérios desejáveis para o diagnóstico, incluindo-se a presença de material dentinoide, células claras e áreas focais de células fantasmas queratinizadas (THAVARAJ & BILODEAU, 2022). Tais características podem ser observadas na Figura 6.

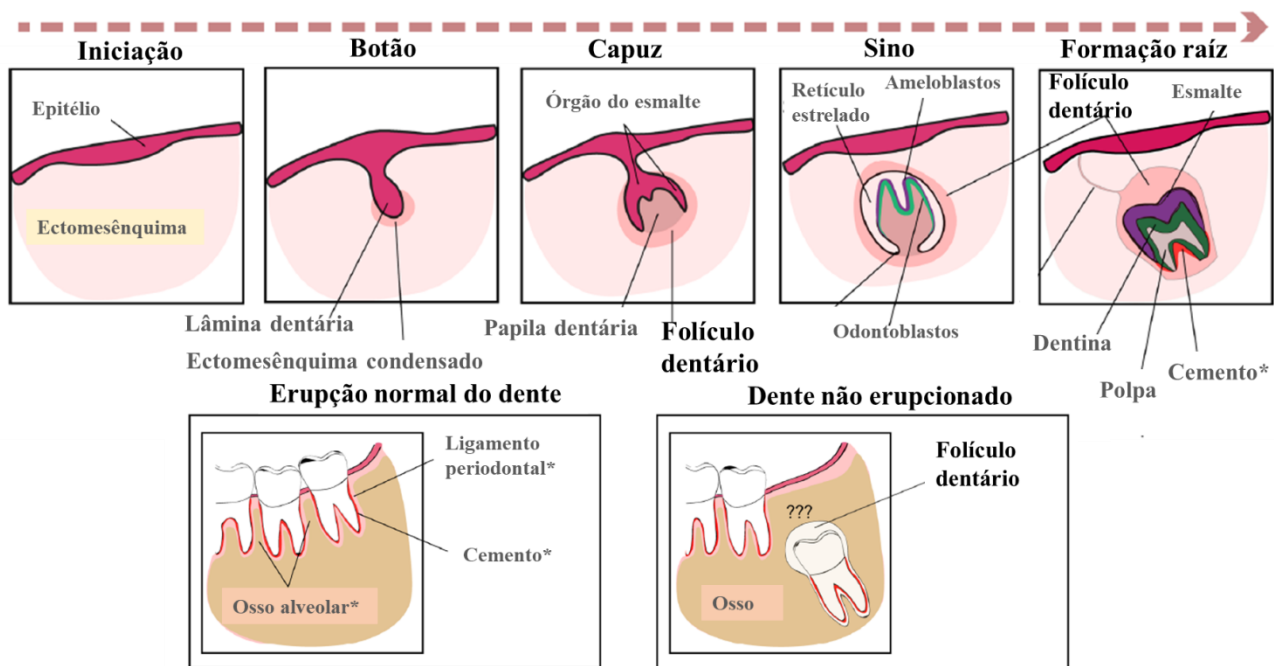


**Figura 6: Aspecto histopatológico do ameloblastoma adenoide.** Fotomicrografias representativas demonstrando características histopatológicas do ameloblastoma adenoide (A-H). Nota-se disposição cribriforme na região em destaque (A e B) e, em todos os casos estudados, presença de estruturas semelhantes a ductos que podem conter material basofílico mucoide em seu interior (A e B) e formação de redemoinhos ou mórulas (C e D). Adicionalmente, na maioria dos casos foram observados depósitos de material dentinoide (E), por vezes em associação com áreas focais de células claras (F e G). Em um dos casos, foi possível observar célula fantasma queratinizada (H). Fonte: COURA *et al.*, 2021.

Tendo em vista que poucos estudos abordaram investigações de alterações genéticas nestas lesões, pouco se sabe a respeito do seu perfil molecular.

## 2.2 Folículo dentário

O folículo dentário consiste em uma estrutura embriológica conjuntiva, derivada do ectomesênquima odontogênico. A formação do folículo dentário ocorre no estágio de capuz da odontogênese, devido à hipercondensação do ectomesênquima em torno do germe dentário em desenvolvimento (as fases da odontogênese estão ilustradas na Figura 7). Dessa forma, o folículo dentário reveste a superfície externa ao órgão do esmalte e à papila dentária, formando uma cápsula na periferia que separa essa região das outras. Suas células se diferenciaram em estruturas de suporte para o dente: cimento, ligamento periodontal e osso alveolar (KATCHBURIAN & ARANA, 2004; NANCI, 2013).



**Figura 7: Ilustração esquemática da odontogênese e padrões embriológicos histológicos observados no dente em desenvolvimento.** Resumidamente, o desenvolvimento dos dentes é dividido nas etapas de iniciação, botão, capuz e estágio de campânula, culminando em formação dos componentes dentários (esmalte, dentina, polpa). O folículo dentário (em negrito) é formado no estágio de capuz devido à hipercondensação do ectomesênquima odontogênico em torno do germe dentário em desenvolvimento. Ele reveste a superfície externa do órgão do esmalte e a papila dentária formando uma cápsula na periferia, responsável por separar essa região das outras. No estágio de capuz, também é possível observar as seguintes estruturas: os componentes dos germes dentários, que se desenvolvem a partir do epitélio do órgão do esmalte e mesênquima (papila dentária); o epitélio interno do órgão do esmalte, formado pelas células presentes na concavidade adjacente ao mesênquima condensado e que, posteriormente, vão se diferenciar em ameloblastos e o epitélio externo do órgão do esmalte; retículo estrelado, que consiste em células epiteliais em formato de estrelas formadas na região central do órgão do esmalte. Nesta figura, os tecidos que surgem do folículo dentário são indicados por um asterisco (\*). Fonte: BASTOS *et al.*, 2022a adaptado.

O folículo dentário participa do processo de erupção do dente, que está relacionado à reabsorção óssea. Acredita-se que a regulação da osteoclastogênese e osteogênese ocorra através da sinalização entre o epitélio reduzido do esmalte e o folículo dentário. Em caso de dentes inclusos, remanescentes do folículo dentário se mantêm retidos, o que cria a possibilidade de estudo desses remanescentes dos tecidos embriológicos na extração do terceiro molar ou em outro dente impactado (KATCHBURIAN & ARANA, 2004; DOROTHEOU *et al.*, 2013; NANCI, 2013; HAGHANIFAR *et al.*, 2014; BASTOS *et al.*, 2022a).

Dentes inclusos são altamente prevalentes no mundo, demonstrando incidência variável na população jovem/adulta, sendo o terceiro molar o que se encontra mais frequentemente impactado, seguido do canino. Apesar de demonstrar prevalência em até 35% da população dependendo do dente analisado, os folículos dentários associados a eles têm sido negligenciados (DACHI & HOWELL, 1961; CHU *et al.*, 2003; CELIKOGLU *et al.*, 2010; AL-ZOUBI *et al.*, 2017; MELLO *et al.*, 2019).

Enquanto o componente epitelial dos folículos dentários tende a desaparecer com a idade, em alguns indivíduos as células do epitélio ou o até mesmo do ectomesênquima (em casos cujo motivo ainda é desconhecido), permanecem presentes e mantêm sua capacidade proliferativa de diferenciação, podendo culminar em formação de cistos e tumores (HANKEY & PEDLER, 1957; WILLIAMS & NEWMAN, 1963; KRAMER & SCRIBNER, 1965; STANLEY *et al.*, 1965; MEADOW, 1966; LEE & LOKE, 1967; CHRETIEN *et al.*, 1970; GARDNER, 1975; WALDRON & MUSTOE, 1989; MANGANARO *et al.*, 1997; GLOSSER & CAMPBELL, 1999; IDE *et al.*, 1999; BODNER *et al.*, 2011; COLBERT *et al.*, 2012; ARAUJO *et al.*, 2014; GAY-ESCODA *et al.*, 2015; COȘARCĂ *et al.*, 2016; PANNEERSELVAM *et al.*, 2017). Em estudos retrospectivos de folículos dentários submetidos à avaliação histopatológica, são eventualmente diagnosticados cistos e tumores odontogênicos (em destaque ameloblastomas), além de carcinomas, o que indica um potencial importante dessas estruturas no desenvolvimento de doenças (CURRAN *et al.*, 2002; YILDIRIM *et al.*, 2008; SLATER, 2009; MELLO *et al.*, 2019; BASTOS *et al.*, 2022a).

Os eventos moleculares que ocorrem no folículo dentário associado a dentes inclusos ao longo da vida do indivíduo ainda não foram elucidados. Partindo do pressuposto de que indivíduos saudáveis acumulam mutações genéticas e de vários estudos experimentais que demonstraram que tecidos normais também podem exibir mutações genéticas

(MARTINCORENA *et al.*, 2015; BLOKZIJL *et al.*, 2016; MYERS *et al.*, 2016; RISQUES & KENNEDY, 2018), é possível que esse mesmo fato ocorra em folículo dentário. Desta forma, é importante entender se os folículos dentários acumulam mutações, em especial as mutações patogênicas previamente observadas em cistos e tumores odontogênicos, como *BRAF* p.V600E (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014); *KRAS* p.G12V (GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019) e *KRAS* p.G12R (COURA *et al.*, 2019).

## 2.3 Mutações patogênicas e via MAPK

### 2.3.1 Mutações patogênicas

Mutações patogênicas até pouco tempo eram consideradas *hallmarks* do câncer (HANAHAN & WEINBERG, 2000; LAZEBNIK, 2010), e hoje têm sido descritas e estudadas no caso de tumores benignos e até mesmo em condições potencialmente malignas e tecidos normais (GOMES, 2022). O estudo de mutações patogênicas em neoplasias benignas e em condições pré-neoplásicas tem se demonstrado um forte aliado no entendimento da complexa rede dos eventos que participam no processo da oncogênese (DHILLON *et al.*, 2007; MARINO-ENRIQUEZ & FLETCHER, 2014; MYERS *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017).

Com o intuito de aprofundar o estudo da biologia das lesões “pré-malignas”, tem sido proposto o desenvolvimento do “Pre-Cancer Genome Atlas (PCGA)”, um projeto internacional similar ao conhecido “The Cancer Genome Atlas” (TCGA), embora ainda seja uma proposta teórica não colocada em prática. O PCGA baseia-se na geração de dados provindos de várias pesquisas, construindo-se dessa forma um perfil de alterações moleculares encontrados em condições pré-malignas, incluindo estudos em neoplasias benignas e em contexto não neoplásico (CAMPBELL *et al.*, 2016). Afinal, a elucidação das possíveis mudanças moleculares e celulares centrais que desencadeiam estágios iniciais da tumorigênese e progressão neoplásica poderia auxiliar o desenvolvimento de novas estratégias de detecção e prevenção do câncer (MARINO-ENRIQUEZ & FLETCHER, 2014; CAMPBELL *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017).

### 2.3.2 Via das MAPKs, com enfoque na MAPK/ERK

A via das MAPKs (*Mitogen-Activated Protein kinases*), é uma via de sinalização intracelular que apresenta papel chave na regulação de uma gama de funções das células eucarióticas. Esta via é responsável pela transdução de sinais extracelulares específicos que

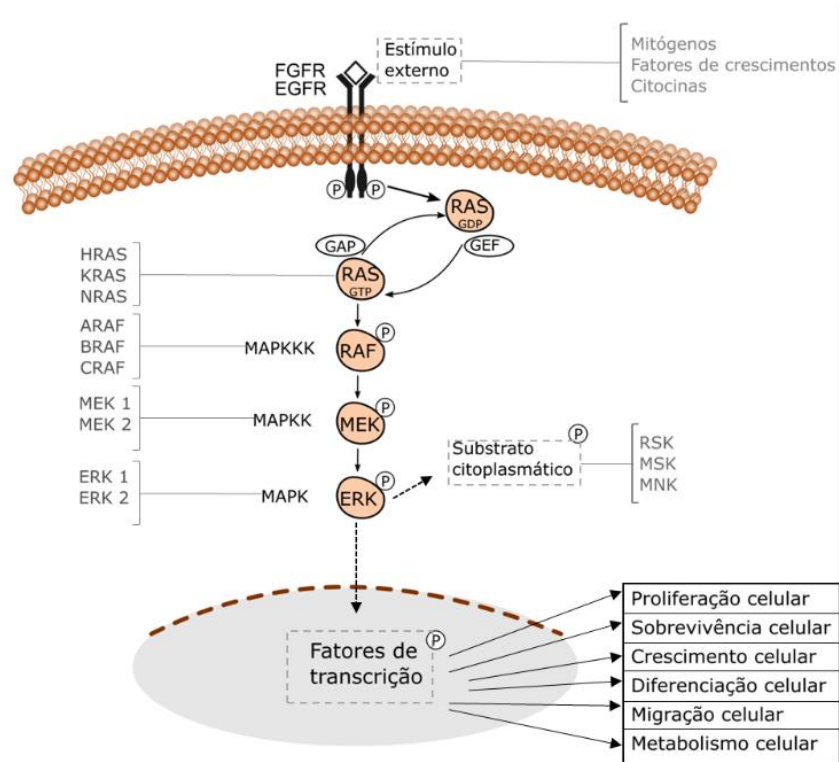


chegam até os receptores posicionados na membrana extracelular, capazes de reconhecer diversos estímulos como fatores de crescimento, mitógenos e citocinas inflamatórias, e ativar cascata de fosforilação (MARSHALL, 1996; KRISHNA & NARANG, 2008; LAVOIE *et al.*, 2020). A regulação dessa via está intimamente ligada à proliferação, sobrevivência, crescimento, diferenciação, migração e metabolismo celular, e comumente se encontram desregulados tanto em cânceres, neoplasias benignas e até mesmo em condições não neoplásicas, em especial sua via canônica MAPK/ERK (DHILLON *et al.*, 2007; MYERS *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017; LAVOIE *et al.*, 2020). Além disso, salienta-se que o prognóstico e fatores preditivos relacionados à presença de cada mutação é contexto-dependente (LAVOIE *et al.*, 2020).

Há pelo menos sete vias MAPK, denominadas de acordo com seu componente efetor final (CARGNELLO & ROUX, 2011). Dentre elas, incluem-se aquelas classificadas como convencional ou atípica, sendo as convencionais as mais amplamente estudadas: ERK1/2, JNK1/2/3, p38  $\alpha/\beta/\gamma/\delta$  (KRISHNA & NARANG, 2008; CARGNELLO & ROUX, 2011; LAVOIE *et al.*, 2020). Embora cada uma dessas vias seja única, elas dependem da ação de três efetores intracelulares evolutivamente conservados, sendo eles proteínas quinases genericamente conhecidas como MAPKKK, MAPKK e MAPK (WIDMANN *et al.*, 1999; KRISHNA & NARANG, 2008; LAVOIE *et al.*, 2020). Devido aos seus diferentes modos de ativação e funções *downstream*, cada uma dessas vias tem demonstrado respostas celulares diferentes de acordo com os fatores únicos envolvidos, como expressão de proteínas, compartimentalização subcelular, interação entre complexos proteicos (*scaffolds proteins*) e mecanismos substrato-alvo (LAVOIE *et al.*, 2020).

A sinalização intracelular da via MAPK/ERK, ilustrada na Figura 8, é amplamente modulada por RAS GTPases, que mantêm o equilíbrio através da alternância entre seu estado inativo (ligada ao GDP) e estado ativo (ligada ao GTP). As proteínas RAS apresentam-se no citoplasma em sua forma estável quiescente que, após sinais dos receptores de membrana, é convertida para a forma ativa através da reação de fosforilação reversível catalisada por GEFs (fatores de troca de nucleotídeos guanina). A RAS fosforilada desencadeia a atividade da cascata de fosforilação *downstream* da via, envolvendo as proteínas RAF (MAPKKK), MEK (MAPKK) e ERK (MAPK), sequencialmente. Isso ocorre devido ao recrutamento e ativação da RAF, que depende da interação direta entre a RAF inativa com a RAS-GTP e, através de processos complexos, culminam em uma dimerização do domínio de ligação RAF-RAS. A RAF ativada, por sua vez, recruta e ativa o efetor intracelular consequente (MEK), formando

um complexo proteico tridimensional capaz de recrutar e ativar a ERK, proteína final reguladora responsável pela nomenclatura da via canônica. A ativação de ERK ocorre, portanto, devido à mudança conformacional do seu domínio catalítico após reconhecimento e fosforilação por MEK em dois sítios. A ERK fosforilada, por sua vez, interage com seus substratos citoplasmáticos RSK, MSK e MNK e em seguida transloca-se para o núcleo por difusão passiva utilizando complexo de poro nuclear, ou por transporte ativo. Uma vez no núcleo, a ERK ativada atua diretamente, e/ou com colaboração dos seus substratos citoplasmáticos, em seus alvos nucleares, que correspondem a fatores de transcrição e outras proteínas (incluindo proteínas do citoesqueleto ou outras proteínas quinases). Em condições de homeostase, após cessar o sinal extracelular, proteínas chamadas GAPs (proteína ativadora de GTPase) interagem com RAS através do complexo RAS-GAP e promovem hidrólise de GTP, culminando na conversão da forma ativa para sua forma inativa ligada ao GDP. Atividade das GAPs, seguida de desfosforilação e *feedback* negativo são mecanismos essenciais para inativação da via (MARSHALL, 1996; SCHEFFZEK *et al.*, 1997; PEYSSONNAUX & EYCHÈNE, 2001; KUMAR *et al.*, 2005; YOON & SEGER 2006; DHILLON *et al.*, 2007; NIKIFOROV 2008; LAVOIE *et al.*, 2020).



**Figura 8: Via de sinalização MAPK/ERK e seus principais componentes.** Figura esquemática representando a atividade da via: estímulos externos atuam em um receptor transmembrana, culminando na ativação da proteína citoplasmática RAS. Em seguida, devido à ação da RAS ativada (ligada ao GTP), ocorre recrutamento e ativação da RAF, MEK e ERK, sequencialmente. A ERK fosforilada interage com seus substratos citoplasmáticos e transloca-se para o núcleo, agindo nos seus substratos nucleares, que inclui os fatores de transcrição. Conseqüentemente, há ativação da via MAPK e regulação de importantes funções celulares. Fonte: Própria autoria.

Embora a atividade da via pareça se basear em ações bioquímicas lineares e unidirecionais promovidas pelas quinases, seu funcionamento e regulação são altamente intrincados (WELLBROCK *et al.*, 2004; YOON & SEGER 2006; KRISHNA & NARANG, 2008; LAVOIE *et al.*, 2020). Além das interações entre os fatores únicos envolvidos já citados que levam ao destaque de uma via para a outra, a complexidade e o pleiotropismo da via MAPK/ERK estão ligados principalmente à grande variedade de substratos efetores de ERK e a grande variedade de isoformas dos componentes presentes na via. Dessa forma, cada tipo, duração e intensidade de estímulo culmina em ativação de diferentes genes responsáveis por funções celulares essenciais, como, por exemplo, genes relacionados à regulação da mitose e genes relacionados ao controle do ciclo celular (WELLBROCK *et al.*, 2004; YOON & SEGER 2006; KRISHNA & NARANG, 2008; LAVOIE *et al.*, 2020).

Desde o início dos anos 80, têm sido realizados diversos estudos dos mecanismos de ativação da via das MAPKs e o seu papel no desenvolvimento normal e em condições patológicas. Mutações patogênicas em diversos pontos da via resultam em codificação de proteínas de sinalização intracelular mutadas, com consequente hiperatividade da via desregulando funções celulares importantes (POLLOCK *et al.*, 2003; KUMAR *et al.*, 2005; DHILLON *et al.*, 2007). Apesar dessas mutações estarem relacionadas com alterações essenciais para o sucesso de muitas células cancerosas, não se sabe ao certo sua importância no contexto dos tumores benignos ou em condições pré-neoplásicas (SCHEFFZEK *et al.*, 1997; DHILLON *et al.*, 2007; MARINO-ENRIQUEZ & FLETCHER, 2014; MYERS *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017; LAVOIE *et al.*, 2020).

#### 2.3.2.2 Cross-talk entre a via MAPK e outras vias

A atividade da via MAPK pode interagir com outras vias de sinalização, incluindo a via PIK3-mTOR e WNT/ $\beta$ -catenina, através de interações dinâmicas e complexas (YOON & SEGER 2006; MENDONZA *et al.*, 2011; ZHANG *et al.*, 2014; JEONG *et al.*, 2018; LAVOIE *et al.*, 2020).

O *cross-talk* entre a atividade da via MAPK e PIK3-mTOR envolve alguns pontos principais: ativação cruzada devido a um looping positivo relacionado à ativação de PI3K e diminuição dos níveis celulares de RAS inativa; ativação de mTORC1 e inativação de TSC2; convergência dos mesmos substratos, como, por exemplo, os fatores de transcrição FOXO e c-Myc (YOON & SEGER 2006; MENDONZA *et al.*, 2011; LAVOIE *et al.*, 2020). Por outro lado, em destaque, a via WNT/ $\beta$ -catenina, apresenta papel na regulação da via MAPK/ERK através da degradação de RAS. Nesse caso, nota-se a presença de um complexo destrutivo composto por GSK3 $\beta$  ativo (ligado à  $\beta$ -catenina, APC e AXIN), que leva à fosforilação da proteína RAS e interfere, dessa forma, na sua disponibilidade no citoplasma (ZHANG *et al.*, 2014; JEONG *et al.*, 2018).

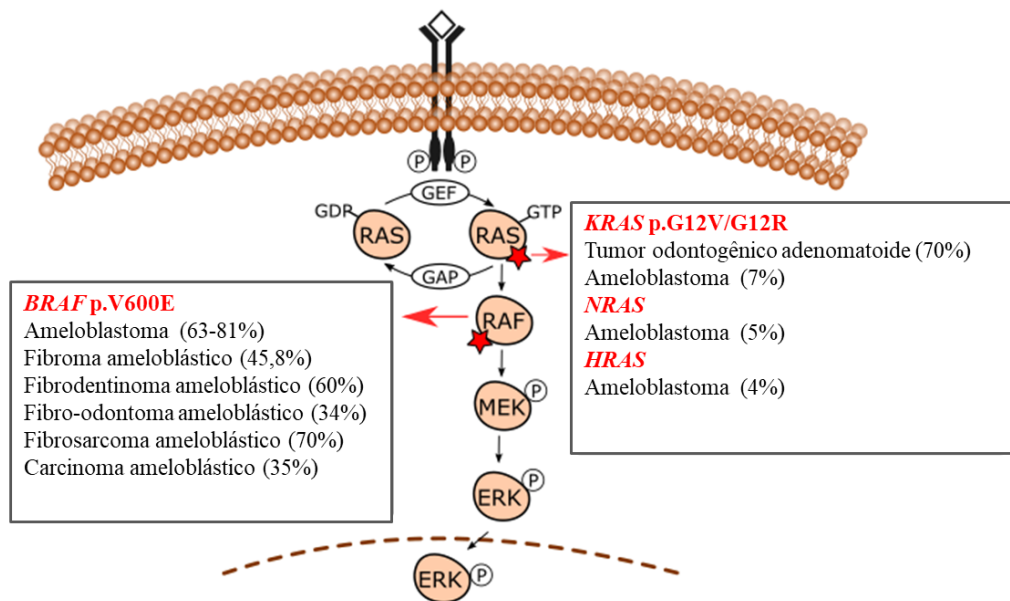
A  $\beta$ -catenina é uma proteína citoplasmática codificada pelo gene *CTNNB1*, que possui papel chave no processo de transdução do sinal da via de sinalização intracelular WNT, relacionada à manutenção da homeostase do organismo, em especial a via canônica WNT/ $\beta$ -catenina, relacionada à transcrição e adesão celular (GAO *et al.*, 2017). Sua atividade é regulada por um complexo dinâmico e multiproteico chamado de complexo de destruição, constituído principalmente por APC, AXIN-1, AXIN-2, CK-1, PP2A e a enzima glicogênio sintase quinase-3 beta (GSK-3B), além da  $\beta$ -catenina (STAMOS & WEIS, 2013; GAO *et al.*,

2017). Em situação de normalidade e ausência de ligantes da via Wnt/bcatenina, a  $\beta$ -catenina é principalmente expressa associada à membrana celular, apresentando concentração citoplasmática baixa e sendo regulada pelo complexo destrutivo, que atua especificamente no sítio de fosforilação presente na região N-terminal da proteína (GAO *et al.*, 2017). Esta região é formada por uma calda que apresenta resíduos serina-treonina e, uma vez fosforilada, leva ao reconhecimento e consequente degradação da  $\beta$ -catenina pelo proteassomo (GAO *et al.*, 2017). Quando há ativação da via por ligante externo, ocorre inativação do complexo de destruição devido a estímulo de proteínas transmembrana presentes na via, o que inibe a fosforilação e degradação da  $\beta$ -catenina (GAO *et al.*, 2017). Dessa forma, há um acúmulo de  $\beta$ -catenina dissociada no citoplasma, que eventualmente transloca-se para o núcleo, tendo importante papel de co-ativador transcricional de genes alvos da via, incluindo *Cyclin D1* e *c-myc* (GAO *et al.*, 2017; KIM & JEONG, 2018). Mutações no gene *CTNBI* podem acarretar ativação constitutiva da via (GAO *et al.*, 2017), e geralmente são mutações *missense* que ocorrem no hotspot exon 3 (GAO *et al.*, 2017; KIM & JEONG, 2018). Elas podem ser encontradas de forma exclusiva ou em combinação com outras alterações em outros componentes do complexo destrutivo (GAO *et al.*, 2017; KIM & JEONG, 2018), sendo as mais comuns aquelas relacionadas à ativação da  $\beta$ -catenina e inativação do APC, levando à mudança na localização celular e nos níveis de expressão da  $\beta$ -catenina (GAO *et al.*, 2017). Mutações em componentes da via WNT/ $\beta$ -catenina foram descritas em alta proporção de alguns tumores, incluindo câncer colorretal, câncer endometrial, câncer hepático e melanoma (GAO *et al.*, 2017; KIM & JEONG, 2018), e em proporção variada em cistos odontogênicos calcificantes (SEKINE *et al.*, 2003; YUKIMORI *et al.*, 2017). Embora os mecanismos associados à patogênese tumoral ainda não estejam completamente elucidados, sugere-se que a desregulação da via MAPK/ERK em associação com a hiperativação da via WNT/ $\beta$ -catenina tem cooperado com a tumorigênese de algumas lesões (ZHANG *et al.*, 2014; JEONG *et al.*, 2018).

### 2.3.3 Mutações patogênicas na via MAPK em tumores odontogênicos

Estudos utilizando diferentes técnicas moleculares revelaram uma frequência alta, porém variada, de mutações patogênicas em componentes da via MAPK em diferentes tumores odontogênicos. Dentre essas técnicas, inclui-se qPCR em tempo real alelo-específico, Sequenciamento de Nova Geração (NGS), sequenciamento direto, bem como imunohistoquímica (GUIMARÃES *et al.*, 2021). A Figura 9 adaptada de Guimarães *et al.*, 2021

ilustra mutações patogênicas encontradas em componentes da via MAPK e suas respectivas frequências nos tumores odontogênicos.



**Figura 9: Mutações patogênicas na via MAPK/ERK em tumores odontogênicos.** Imagem representativa com o resumo das mutações reportadas em genes da via MAPK/ERK tumores odontogênicos e suas respectivas frequências. Fibromas ameloblásticos, fibrodentinomas ameloblásticos, fibro-odontomas ameloblásticos, carcinomas ameloblásticos e fibrossarcomas ameloblásticos, apresentam mutação patogênica *BRAF* p.V600E em alta frequência. Ameloblastomas apresentam alta prevalência da mutação *BRAF* p.V600E, e, por vezes, podem apresentar mutações *KRAS* p.G12V/R, *NRAS* e *HRAS* em baixa frequência em casos com *status wild-type* para *BRAF*. Mutações *hotspot* no códon 12 foram reportadas em alta frequência em tumores odontogênicos adenomatoides. Fonte: GUIMARÃES *et al.*, 2021 adaptado.

### 2.3.3.1 Mutações patogênicas em *RAS*

As proteínas *RAS*, componentes da via MAPK, são proteínas G monoméricas altamente homólogas codificadas pela superfamília *RAS* (*KRAS*, *NRAS* e *HRAS*). Elas apresentam papel central no complexo tridimensional *RAS*, cuja atividade é relativamente ordenada, porém transitória devido a sua alternância do estado ligado ao GTP e ligado ao GDP. O complexo *RAS*-GDP representa a forma estável e inativa, pois a presença de apenas dois fosfatos na estrutura do GDP torna-a menos compacta, e em um estado “aberto”. Conseqüentemente, não há interação dos componentes da cascata de fosforilação responsável pela atividade da via (*RAS*, *RAF*, *MEK*, *ERK*). Por outro lado, quando ligado ao GTP, o complexo *RAS*-GTP apresenta-se em um estado mais compacto devido à interação do terceiro

fosfato da estrutura GTP com o switch 2 da proteína RAS. Dessa maneira, todos os elementos desse quebra cabeça tridimensional são mantidos unidos, o que é essencial para a atividade da via. Por isso, a hidrólise de GTP culmina na conversão da forma ativa para a forma inativa do complexo e, apesar de dificultar estudos substanciais, essa natureza dinâmica é uma questão chave para sua função biológica (SCHEFFZEK *et al.*, 1997; LU *et al.*, 2016; MENYHÁRD *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2020).

Mutações *RAS* afetam diretamente a regulação da via MAPK ao promover desbalanço entre a forma inativa e ativa de RAS. Mutação *missense* nessas proteínas, principalmente mutações nos códons 12 e 13, resultam em uma mudança conformacional no sítio de ligação com consequente resistência da proteína mutada à GAP. Dessa forma, a proteína mutada apresenta perda da capacidade de hidrólise efetiva, o que leva a um aumento de afinidade com GTP, acarretando alteração do balanço homeostático entre RAS-GTP (forma ativa) e RAS-GDP (forma inativa). Em decorrência, há um favorecimento da sua forma ativa com consequente ativação constitutiva da via MAPK/ERK (NIKIFOROV, 2008; PRIOR *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016; ANGLESIO *et al.*, 2017; HAIGIS, 2017).

Das três isoformas de *RAS*, o *KRAS* tem se destacado por ser o proto-oncogene com maior frequência de mutação em neoplasias humanas (PRIOR *et al.*, 2012; KATO *et al.*, 2016; HAIGIS, 2017). Mutações em *KRAS* já foram descritas em alta frequência em tumores com comportamento agressivo, como, por exemplo, adenocarcinoma pancreático (SMIT *et al.*, 1988; HAIGIS, 2017), câncer colorretal (BOS *et al.*, 1987; FORRESTER *et al.*, 1987; HAIGIS, 2017), câncer de células não pequenas de pulmão (RODENHUIS *et al.*, 1987; HAIGIS, 2017). Além disso, tais mutações também já foram reportadas em tumores benignos, como por exemplo em tumor odontogênico adenomatoide (GOMES *et al.*, 2016; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2019; COURA *et al.*, 2019) e por vezes ameloblastomas (BROWN *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014).

O códon 12, seguido dos códons 13 e 61, são os mais frequentemente alterados (PRIOR *et al.*, 2012; KATO *et al.*, 2016; HAIGIS, 2017), e dentre as alterações descritas em *KRAS* presentes no códon 12, estão as mutações p.G12V e p.G12R. A mutação *missense* *KRAS* p.G12V (c.35G>T) resulta em uma substituição do aminoácido glicina (G) pelo aminoácido valina (V), enquanto a mutação *missense* *KRAS* p.G12R (c.34G>C) resulta em uma substituição do aminoácido glicina (G) pelo aminoácido arginina (R) (NIKIFOROV, 2008; PRIOR *et al.*, 2012; ZHOU *et al.*, 2016; ANGLESIO *et al.*, 2017), ambas já descritas

na maior parte dos tumores malignos e benignos supracitados (GOMES *et al.*, 2016; revisto por HAIGIS, 2017; COURA *et al.*, 2019).

### 2.3.3.2 Mutações patogênicas em RAF

Outro componente da MAPK/ERK cuja mutação está relacionada à desregulação da via são as RAFs, que são proteínas quinases homólogas e codificadas por proto-oncogenes de mesmo nome: *BRAF*, *ARAF* e *RAF1* (também conhecido como *CRAF*). Apesar de suas estruturas serem similares, a *BRAF* é apontada na literatura como a principal isoforma ligada ao desenvolvimento tumoral (WELLBROCK *et al.*, 2004; YOON & SEGER, 2006; DHILLON *et al.*, 2007; NIKIFOROV, 2008; OIKONOMOU *et al.*, 2014; LAVOIE & THERRIEN, 2015). Mutações em *BRAF* levam a um aumento de afinidade entre RAF e RAS, modificando o equilíbrio entre a RAF quiescente presente no citoplasma e podendo induzir um estado de hiperatividade *downstream* da via (WELLBROCK *et al.*, 2004; YOON & SEGER, 2006; OIKONOMOU *et al.*, 2014; LAVOIE & THERRIEN, 2015).

A mutação ativadora *BRAF* p.V600E (c.1799T>A) resulta na substituição do aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E) no códon 600 (POLLOCK *et al.*, 2003). Essa mutação tem sido reportada em diversas neoplasias, sejam elas neoplasias malignas, como o carcinoma papilar de tireoide (CAPPER *et al.*, 2011), adenocarcinoma de pulmão (SASAKI *et al.*, 2013), melanoma (UGUEN *et al.*, 2015; THIEL *et al.*, 2015) e adenocarcinoma colorretal (ESTRELLA *et al.*, 2015; HANG *et al.*, 2015), ou neoplasias benignas, incluindo nevos melanocíticos (POLLOCK *et al.*, 2003), tumor melanótico neuroectodérmico da infância (GOMES *et al.*, 2015) e pólipos do intestino grosso (KIM *et al.*, 2013).

Na última década, *BRAF* p.V600E também foi reportada em vários tumores odontogênicos que apresentam células semelhantes a ameloblastos, como pode ser observado em maiores detalhes na Tabela 1, estando presente em uma alta proporção (60% a 80%) de ameloblastomas (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015). Além disso, recentemente a mutação *BRAF* p.V600E foi reportada em tumores odontogênicos mistos, incluindo FA (BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; YOU *et al.*, 2019), FOA (BRUNNER *et al.*, 2015), um caso FDA (BROWN *et al.*, 2014) e FSA (AGAIMY *et al.*, 2020). Porém, uma lacuna não preenchida por esses trabalhos prévios é em qual componente da lesão a mutação está presente, pois grande parte deles analisaram o *status* da mutação na lesão como um todo, sem analisar o *status* de mutação do componente epitelial e do componente mesenquimal separadamente.



### 2.3.4 Terapia alvo com inibidores de componentes da via MAPK

Nos últimos anos, alguns foram realizados testes *in vivo* e *in vitro* para a análise da ação de inibidores para *BRAF* em ameloblastomas com *status* mutante para *BRAF*. Dentre os medicamentos analisados, inclui-se vemurafenib e dabrafenib quando em monoterapia, mais trametinib (anti-MEK) quando em tratamento dual. Resultados demonstraram regressão significativa no tamanho tumoral, o que sugere sensibilidade de ameloblastomas com *status* mutante para *BRAF* para terapias com inibidores de BRAF ou BRAF/MEK, mesmo em casos de lesões agressivas, destrutivas, em estágio avançado e/ou recorrentes. Adicionalmente, dados preliminares constataram efetividade em tratamento conservador, com utilização de inibidores de via MAPK seguida de cirurgia completa não mutilante nos casos estudados (KAYE *et al.*, 2014; FADEN *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018; BROUDIC-GUIBERT *et al.*, 2019; BRUNET *et al.*, 2019; VANELLA *et al.*, 2019; HIRSCHHORN *et al.*, 2021; ZLOTOGORSKI-HURVITZ *et al.*, 2022). Ainda no âmbito de terapia alvo de tumores odontogênicos, estudo piloto sugeriu haver ativação MAPK/ERK em casos de mixomas odontogênicos. Esse mesmo estudo demonstrou, por meio de testes com modelo de cultura celular e PDX, que o fármaco U0126 (anti-MEK) é um candidato em potencial para terapia alvo, de maneira dose-dependente, em casos de mixomas odontogênicos agressivos (PEREIRA *et al.*, 2019).

Embora seja um componente importante da via e tenha sido um dos primeiros oncogenes identificados, mutações em *RAS* ainda eram consideradas “*undruggable*” até pouco tempo. Muito provavelmente em razão de sua atividade envolver complexos transitórios e instáveis além de interações proteína/proteína, levando a uma dificuldade maior de seu isolamento para estudo e reconhecimento de sítio alostérico. Portanto, até então, esforços para desenvolvimento de terapia-alvo estiveram concentrados em componentes *downstream* da via até então. Pequenas moléculas inibidoras competitivas de GTP têm sido utilizadas para investigação de novas técnicas de terapia tendo como alvo *RAS*. Porém ainda não há estudos envolvendo o uso de inibidores de *RAS* em tumores odontogênicos (OSTREM *et al.*, 2013; HUNTER *et al.*, 2014; OSTREM & SHOKAT., 2016; LU *et al.*, 2016; CANON *et al.*, 2019; FELL *et al.*, 2020; ZENG *et al.*, 2020).

Os resultados dessas pesquisas demonstraram boa resposta terapêutica e benefícios clínicos incluindo: diminuição de morbidade, alteração da extensão cirúrgica dos pacientes afetados, solução alternativa nos casos de limitação cirúrgica, diminuição da taxa de

recorrência pós-cirúrgica e diminuição de alteração funcional e estética. No entanto, embora tais achados tenham demonstrado relevância para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas relacionadas a essas lesões, ressalta-se que foram indicadas apenas em caso de tumores agressivos, difíceis de serem removidos cirurgicamente ou recorrentes, pois foram observados efeitos colaterais significativos. Além disso, ainda há poucas informações acerca dessa linha terapêutica, sendo necessários, dessa forma, mais estudos (GOMES *et al.*, 2014; KAYE *et al.*, 2014; FADEN *et al.*, 2016; TAN *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018; BROUDIC-GUIBERT *et al.*, 2019; BRUNET *et al.*, 2019; VANELLA *et al.*, 2019; HIRSCHHORN *et al.*, 2021; ZLOTOGORSKI-HURVITZ *et al.*, 2022).

### 2.3.5 Mutações patogênicas em contexto não neoplásico

Nos últimos anos, demonstrou-se que indivíduos saudáveis também podem acumular mutações somáticas em diversos tecidos ao longo dos anos, o que pode estar relacionado principalmente a fatores como taxa de replicação do tecido, incidência de luz UV e idade do indivíduo (MARTINCORENA *et al.*, 2015; MYERS *et al.*, 2016; BLOKZIIL *et al.*, 2017; RISQUES & KENNEDY, 2018).

A hematopoiese clonal apresenta mutações que são associadas à leucemia mielóide aguda (como por exemplo mutações nos modificadores epigenéticos *DNMT3A* e *TET2*) na grande maioria dos indivíduos entre a quinta e sexta décadas de vida (YOUNG *et al.*, 2016). Além disso, foram descritas mutações ativadoras no gene supressor de tumor *TP53* em fluido peritoneal, sangue periférico (KRIMMEL *et al.*, 2016), e em pele de indivíduos sem câncer; nesse último caso, principalmente em regiões com maior exposição à luz UV ao longo dos anos (NAKAZAWA *et al.*, 1994; JONASON *et al.*, 1996; LING *et al.*, 2001). Adicionalmente às mutações em *TP53*, Martincorena e colegas observaram a presença de várias outras mutações em epitélio normal de região das pálpebras, portanto uma região com demasiada exposição ao sol (MARTINCORENA *et al.*, 2015), e do esôfago (MARTINCORENA *et al.*, 2018), incluindo alterações nos genes *NOTCH1* e *FAT1*, sendo que ambos os estudos demonstraram que o acúmulo de mutações aumentou com a idade (MARTINCORENA *et al.*, 2015; MARTINCORENA *et al.*, 2018). Além de trabalhos investigativos como esses citados, modelos matemáticos sugerem que aproximadamente metade das mutações somáticas específicas de tumores em tecidos autorrenováveis ocorrem antes da tumorigênese, isto é, em tecidos normais, e que o acúmulo dessas mutações está relacionado de forma diretamente proporcional à idade do paciente (TOMASETTI *et al.*, 2013).

Enquanto algumas dessas mutações podem ser irrelevantes, outras podem apresentar um papel crucial no desenvolvimento tumoral. Portanto, presença de mutações somáticas, em um microambiente apropriado e principalmente quando consideramos indivíduos adultos mais velhos, podem ser fatores que influenciam na tumorigênese (CURTIUS *et al.*, 2018).

### 2.3.6 Detecção de mutações patogênicas por NGS

O NGS surgiu no mercado no início dos anos 2000, tem sido aprimorado desde então e abrange técnicas que permitem a análise precisa e simultânea e de vários genes ou regiões de genes em um único teste, responsável por reduzir consideravelmente os custos e o tempo para a realização de sequenciamento quando comparado aos métodos tradicionais de sequenciamento. Isso tornou o sequenciamento em larga escala mais rápido, barato e acessível, permitindo a utilização do NGS em diversos projetos e, conseqüentemente, possibilitando a geração de uma quantidade massiva de dados. Em razão disso, desde seu desenvolvimento, as técnicas de NGS permitiram grandes avanços nos estudos de mutações patogênicas (REUTER *et al.*, 2015; YOHE & THYAGARAJAN., 2017).

Atualmente, estão disponíveis diversas plataformas e painéis capazes de cobrir milhares de mutações *hotspot* presentes em oncogenes e genes supressores de tumor já descritas no banco de dados COSMIC (Catálogo de mutações somáticas em câncer- <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>), incluindo plataformas comerciais frequentemente utilizadas em pesquisas como Illumina e Ion Torrent. Por isso, existem diferentes procedimentos para a realização do NGS, e a escolha dos métodos empregados no sequenciamento influencia diretamente na qualidade do resultado. É de extrema importância a análise do objetivo e da plataforma escolhida em cada estudo para a determinação dos procedimentos mais adequados a serem seguidos (REUTER *et al.*, 2015; YOHE & THYAGARAJAN., 2017).

A plataforma Illumina utiliza tecnologia de amplificação clonal seguida de reconhecimento de sinal fluorescente, relativamente semelhante a outras tecnologias previamente utilizadas no mercado como, por exemplo, o sequenciamento de Sanger. Já a plataforma Ion Torrent, que teve sua comercialização iniciada em 2010, foi pioneira em empregar métodos que não recorrem a leitor óptico para distinção dos nucleotídeos incorporados, o que torna o sequenciamento relativamente mais barato e mais rápido quando comparado com tecnologias anteriores. O NGS realizado através da Ion Torrent conta com uma metodologia baseada em semicondutores, capaz de gerar informação através da detecção

da alteração de pH, após a liberação de íon  $H^+$  de acordo com a incorporação de diferentes nucleotídeos no nanoporo do chip semicondutor a cada ciclo (REUTER *et al.*, 2015).

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo principal

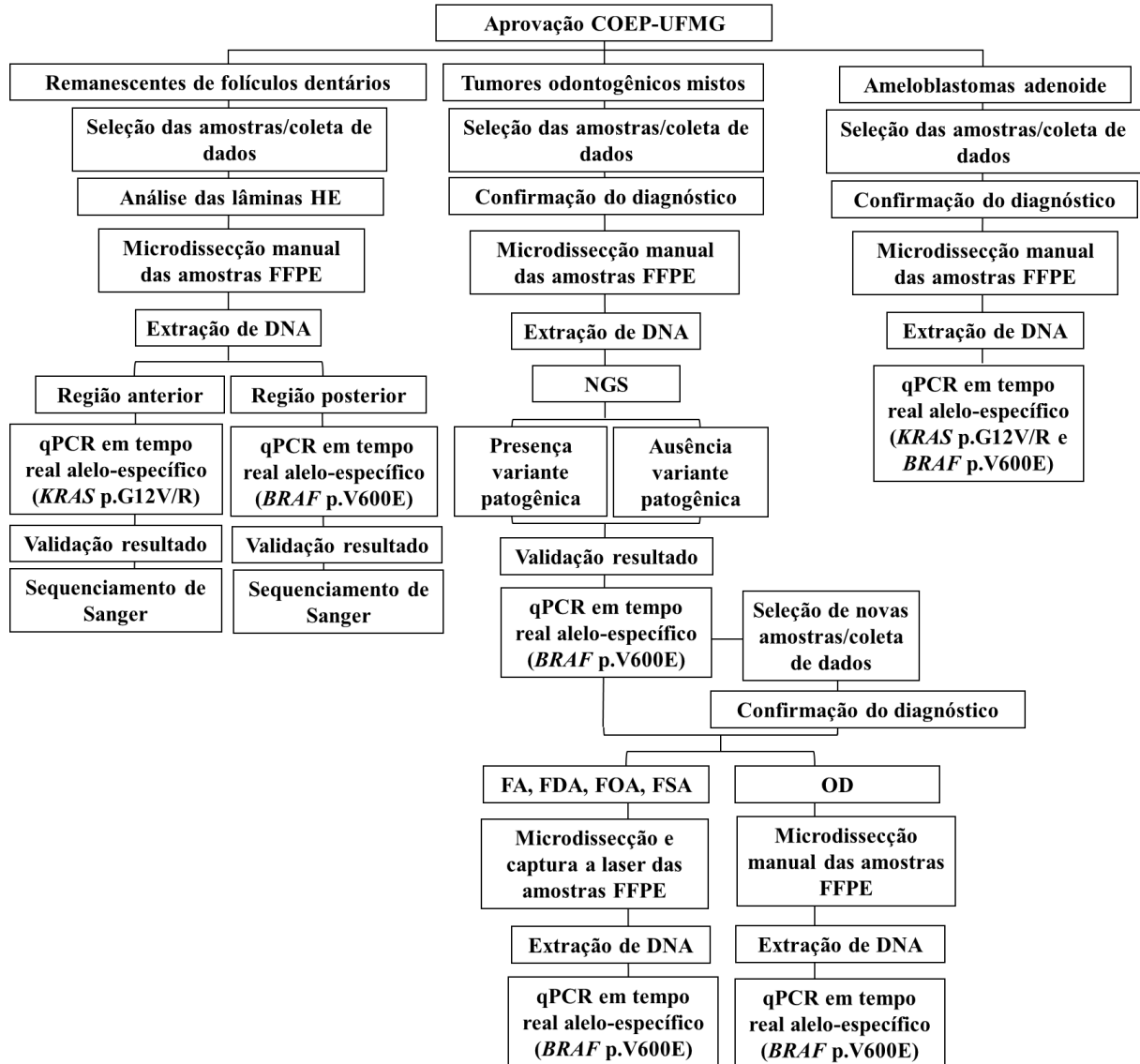
Analisar perfil de alterações moleculares em tumores odontogênicos mistos, ameloblastoma adenoide e folículos dentários associados a dentes inclusos.

#### 3.2 Objetivos secundários

- a) Avaliar em tumores odontogênicos mistos a presença de mutações patogênicas em um painel de oncogenes e genes supressores de tumor por meio de NGS;
- b) Validar as mutações patogênicas reportadas pelo NGS através de qPCR em tempo real alelo-específico;
- c) Expandir o *cohort* de amostras de tumores odontogênicos mistos (FA, FDA, FOA, FSA) e odontoma, para validar e avaliar a frequência das mutações selecionadas na etapa de NGS através de qPCR em tempo real alelo-específico;
- d) No caso dos tumores mistos, investigar em qual componente do tumor as mutações ocorreram, utilizando-se para isto a microdissecção a laser;
- e) Avaliar a presença das mutações ativadoras *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R e sua frequência em folículo dentário através de qPCR em tempo real alelo-específico e sequenciamento de Sanger.
- f) Avaliar a presença das mutações ativadoras *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R e sua frequência em ameloblastoma adenoide através de qPCR em tempo real alelo-específico.

#### 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Na Figura 10, observa-se o diagrama esquemático dos métodos utilizados no presente trabalho, que será detalhado nas subseções seguintes.



**Figura 10: Diagrama esquemático da metodologia do estudo.** A Figura representa um fluxograma com a sequência dos procedimentos realizados na metodologia do presente trabalho. Fonte: Própria autoria.

## 4.1 Aspectos Éticos

Esse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) (CAAE: 30556120.0.0000.5149; Parecer: 4.228.043).

## 4.2 Seleção e inclusão das amostras

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) e os dados clínicos e exames complementares de imagem de todos os casos foram analisadas. Foram selecionados apenas aqueles casos cujo diagnóstico foi confirmado por patologistas bucais (C.C.G., R.S.G., V.F.B.) e que exibiram quantidade considerada suficiente de tecido a ser analisado.

O estudo foi realizado com amostras coletadas de tecidos frescos durante o procedimento cirúrgico na Clínica de Patologia, Estomatologia e Radiologia II da Faculdade de Odontologia da UFMG, e com amostras fixadas em formol tamponado a 10% pH 7,4 e incluídas em parafina (FFPE) obtidas do acervo do Serviço de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais e de departamentos de outras seis instituições: Universidade Federal do Rio de Janeiro, Universidade Federal do Pará, King's College London/Guy's Hospital, Universidade Federal da Bahia, Universidade Federal de Juiz de Fora e Universidade de Campinas .

### 4.2.1 Tumores mistos

#### 4.2.1.1 Cohort de descoberta

Para a análise no NGS, foi selecionada a *cohort* de descoberta, formada inicialmente por uma amostra de conveniência de 11 tumores odontogênicos mistos (FA, FSA, FOA, FDA). Com o objetivo de assegurar a qualidade e o sucesso do experimento, o gDNA obtido após extração e o material gerado após construção biblioteca foram analisados e, apenas quatro amostras passaram no controle de qualidade (descritos nos itens 4.3 e 4.4.1.1) e foram utilizados no NGS, sendo elas: duas amostras FFPE e uma amostra de tecido fresco coletada e congelada rapidamente de FA, e uma amostra FFPE de FDA.

#### 4.2.1.2 Cohort de validação

Com intuito de validar o resultado do NGS, foi selecionada a *cohort* de validação, formada pela *cohort* de descoberta (n=4) mais a *cohort* de expansão (n=24). A *cohort* de expansão se resume em uma amostra de conveniência, que inicialmente apresentou 28

amostras de tumores odontogênicos mistos incluindo FA, FDA, FOA, FSA e odontoma. Porém, quatro amostras foram excluídas, dentre elas um FA, um FDA e dois odontomas, devido à baixa quantidade de tecido presente, baixa qualidade do DNA obtido e/ou apresentaram características clínico-radiográficas que poderiam mimetizar um odontoma em desenvolvimento.

Portanto, 28 casos de tumores odontogênicos mistos foram incluídos na *cohort* de validação utilizada na análise final deste estudo, incluindo 10 FA, quatro FDA, seis FOA, três FSA e cinco odontomas.

#### 4.2.2 *Ameloblastoma adenoide*

Foi selecionada uma amostra de conveniência de 14 casos de ameloblastoma adenoide. Porém, cinco amostras foram excluídas devido à falta de estruturas semelhantes a ductos ou formação de redemoinhos, critérios essenciais ao diagnóstico do ameloblastoma adenoide (THAVARAJ & BILODEAU, 2022). Portanto, nove casos de ameloblastomas adenoide foram incluídos na análise molecular final do presente estudo.

#### 4.2.3 *Remanescente de folículo dentário associado a dente incluso*

Foi selecionada uma amostra de conveniência de 77 casos de remanescentes de folículos dentários de indivíduos saudáveis submetidos à exodontia de caninos e terceiros molares impactados. Porém, 29 amostras foram excluídas devido à baixa quantidade de tecido presente, baixa qualidade do DNA obtido e/ou se apresentaram associados a alguma outra alteração histológica, como, por exemplo, lesão tumoral ou presença de inflamação.

Portanto, 48 amostras de remanescentes de folículos dentários foram incluídas na análise final deste estudo, sendo 16 delas de casos de folículos dentários associados a dentes anteriores e 32 delas associadas a terceiro molar impactado.

### **4.3 Extração de DNA**

As amostras foram submetidas à extração de DNA genômico (gDNA), utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen Inc, Valencia, CA, USA - amostras FFPE) ou DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen - amostras de tecido fresco), conforme protocolos propostos pelo fabricante. Ambos os kits comerciais utilizam processo de extração de gDNA por digestão enzimática, realizada por meio da proteinase K e do tampão de lise ATL, utilizado para purificação de ácidos nucleicos.



22 amostras FFPE de tumores mistos foram submetidas à microdissecção e captura a laser, utilizando 3 a 6 cortes de 8 µm de espessura cada, enquanto 6 amostras FFPE de tumores mistos (uma amostra FA e todos os odontomas) e as amostras FFPE de folículo dentário foram cortadas manualmente em micrótomo, utilizando de 5 a 10 cortes de 8 µm cada. Foi utilizado xilol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) para o processo de desparafinização desses cortes.

Após essa etapa, foi feita a quantificação e análise da qualidade do gDNA extraído de acordo com as diferentes técnicas moleculares a serem realizadas. No caso do qPCR em tempo real alelo-específico e sequenciamento de Sanger, a análise de quantidade e qualidade do gDNA foi realizada por espectrofotometria, utilizando NanoDrop 2000 Instrument (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA) (WILFINGER *et al.*, 1997) e/ ou por fluorescência utilizando Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). No caso do NGS, a análise foi realizada por fluorescência, utilizando Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies).

Os resultados gerados pelo NanoDrop e/ou Qubit foram analisados, e o gDNA de cada amostra escolhido para a realização das próximas etapas. Ao realizar a quantificação através do NanoDrop 2000 Instrument (Thermo Fisher Scientific), as amostras com gDNA em condições suficientes para dar prosseguimento ao estudo foram aquelas que apresentaram o valor da relação 260/280 entre 1,8 e 2,0, e valor da relação 260/230 entre 2,0 e 2,2, de acordo com o sugerido no protocolo (WILFINGER *et al.*, 1997). Na quantificação realizada através do Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies), as amostras viáveis para dar procedimento ao estudo foram aquelas consideradas de alto rendimento e alta concentração de gDNA, cujo valor mínimo determinado como ideal no atual estudo foi de 10 ng/µL.

#### **4.4 Análise de variantes**

##### *4.4.1 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)*

Foi realizado NGS para análise de variantes da *cohort* de descoberta de tumores odontogênicos mistos.

A análise de alteração molecular foi realizada utilizando a plataforma de sequenciamento Ion Torrent (Thermo Fisher Scientific Inc Ion, Waltham, MA, USA). Além disso, foi utilizado o painel Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific), que investiga 2.856 mutações *hotspot* já descritas no banco de dados COSMIC

(Catalogue of Somatic Mutations in Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, último acesso em Julho de 2020) em 50 oncogenes e genes supressores de tumor frequentemente mutados em câncer. Esse painel inclui vários genes presentes na via MAPK, dentre outros: *ABL1*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNF1A*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MPL*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RBI*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53*, *VHL*.

Em resumo, o fluxo de trabalho da técnica compreende principalmente em preparo da amostra (com a construção da biblioteca e preparo do *template*), sequenciamento e análise de resultados. Essas etapas são descritas a seguir.

#### 4.4.1.1 Preparo da amostra

A construção das bibliotecas de DNA consiste basicamente na fragmentação do gDNA, isolamento das regiões gênicas de interesse e inserção de sequências de nucleotídeo conhecidas ('barcodes') para a identificação de cada amostra separadamente.

Foi utilizado o kit Ion AmpliSeq™ Library 2.0 (Thermo Fisher Scientific), composto pelos reagentes iniciais da construção das bibliotecas. Foi realizada uma amplificação das regiões de interesse do gDNA utilizando PCR convencional multiplex, levando em consideração o painel escolhido para o trabalho. Para isso, foram adicionados os reagentes Ion AmpliSeq™ HiFi Mix, Ion AmpliSeq™ Primer Pool (Thermo Fisher Scientific) em 30ng de gDNA e o reagente *FuPa*, responsável pela digestão parcial dos amplicons. Adicionalmente, para que fosse possível processar mais de uma amostra por corrida de sequenciamento, foi utilizado o kit IonXpress™ Barcode Adapters 1-16 (Thermo Fisher Scientific), adicionando-se adaptadores de DNA com sequência de bases conhecidas, garantindo um código de identificação para cada amostra (barcodes). Para a realização da ligação dos adaptadores aos amplicons, foram utilizados os reagentes *Switch Solution*, *barcode adapter mix* e *DNA Ligase* (Thermo Fisher Scientific).

Em seguida, cada biblioteca foi purificada utilizando o reagente Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Inc. Indianapolis, IN, USA), etanol 70% e uma rack magnética. Para finalizar essa etapa, foi feita a quantificação de cada biblioteca através de qPCR em tempo real com o kit Ion Library TaqMan™ Quantitation (Thermo Fisher Scientific). A

concentração final ideal que indicou uma boa qualidade de cada biblioteca, e consequentemente um possível sucesso do experimento, foi de no mínimo 100pM.

#### 4.4.1.2 Construção de *template*

As bibliotecas que apresentaram boa qualidade foram encaminhadas para a próxima etapa, a construção de *template*. Nessa etapa foram utilizados 5µL de cada biblioteca para a formação de um *pool* dessas bibliotecas, através de amplificação clonal dentro de micelas, em um PCR em emulsão (ePCR) realizada no aparelho Ion OneTouch 2 (Thermo Fisher Scientific) que compõe o sistema Ion OneTouch™ 2 (Thermo Fisher Scientific). Para finalizar a construção da *template*, sua qualidade foi analisada após o qPCR utilizando o kit Ion Sphere™ (ISP) Quality control (Thermo Fisher Scientific) e foi realizado um enriquecimento com Ion Sphere para separar os fragmentos de DNA prontos para o sequenciamento dos reagentes não ligados ao DNA, de acordo com instrução do fabricante.

Uma vez finalizado o preparo do *template*, foi feito o carregamento do chip semicondutor Ion 316™ chip kit v2 (Thermo Fisher Scientific) e as amostras devidamente preparadas foram sequenciadas no equipamento ION Personal Genome Machine® Sequencer (Thermo Fisher Scientific) utilizando o Ion Torrent PGM system (Thermo Fisher Scientific).

#### 4.4.1.3 Análise bioinformática

Ao final da corrida, os dados brutos obtidos pelo servidor *Torrent Suite Software* (Thermo Fisher Scientific) foram processados e disponibilizados no Ion Reporter™ Software 5.2 (Thermo Fisher Scientific). Antes da análise das sequências das amostras, os valores de alguns parâmetros foram checados no intuito de garantir a qualidade das sequências geradas e confiabilidade da chamada de variantes, incluindo a porcentagem do carregamento do chip e a quantidade de bases lidas durante o sequenciamento (deve ser próxima à capacidade total do chip).

Os arquivos foram importados para o software Ion Reporter™ Software 5.2 (Thermo Fisher Scientific), responsável por filtrar e detectar as variantes, e foi feito o alinhamento das leituras do sequenciamento ao genoma humano de referência Human Genome version 19 (hg19). As variantes foram filtradas de acordo com o tipo de variação: variante de nucleotídeo único (SNV), variante de nucleotídeo múltiplo (MNV) e inserção/deleção de nucleotídeos (INDEL). As variantes também foram filtradas quanto ao efeito da variação, incluindo variante

*missense*, *nonframeshift*, *frameshift*, *nonsense* e *stoploss* (mutações silenciosas não foram filtradas).

As variantes reportadas pelo software Ion Reporter™ Software 5.2 (Thermo Fisher Scientific) que apresentaram profundidade maior que 300 e a frequência maior que 5% foram selecionadas. Em seguida, arquivos BAM gerados no sequenciamento foram visualizados e analisadas manualmente alinhando as sequências geradas com a sequência referência Hg19 através do software *Integrative Genomics Viewer 2.3 (IGV, versão 2.3)* (Broad Institute, Cambridge, MA), excluindo assim falsas variantes. Nesse caso, foi observada a confirmação da concordância entre sequências *forward* e *reverse*, confirmação da frequência maior do que 5% e a região em que se encontrava (próxima à área de deleção, ou no início ou final do amplicon).

#### 4.4.1.4 Análise *in silico*

Foi realizada predição *in silico* para análise do possível efeito funcional das proteínas relacionadas às variantes selecionadas seguindo os critérios supraescritos, através do SIFT (acessado pelo <http://sift-dna.org>) e PolyPhen-2 (acessado pelo <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>). O escore do SIFT varia de 0.0 a 1.0, sendo que valores de escore de 0.0 a 0.5 indicam efeito deletério e de 0.5 a 1.0 indicam efeito tolerável. O escore do PolyPhen-2 também varia de 0.0 a 1.0, porém os valores são interpretados de forma inversa: quanto mais próximo de 0.0, maior a chance de o efeito da proteína ser considerado benigno, e quanto mais próximo de 1.0, maior a probabilidade de apresentar um efeito danoso (0.15 a 0.85 considera-se possivelmente danoso, 0.85 a 1.0 considera-se certamente danoso).

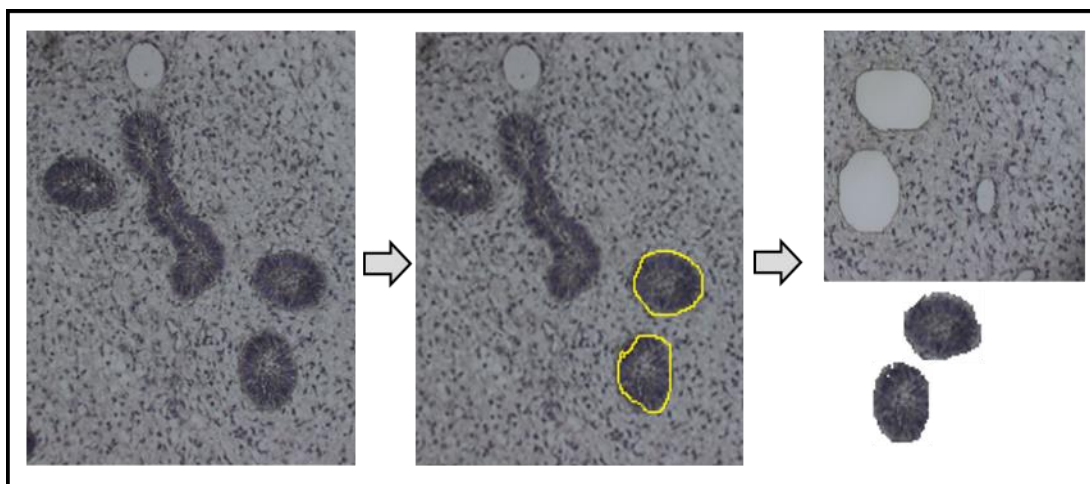
Além disso, foi utilizado ClinVar (acessado pelo <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) para análise *in silico* do impacto clínico das variantes selecionadas nos seres humanos. ClinVar é uma base de dados livre que agrega informações de vários trabalhos combinando informações de variações genéticas provindas de diferentes tipos de doença, cuja interpretação dos dados varia entre benigno, provavelmente benigno, responsivo a drogas, patogênico, provavelmente patogênico, efeito não fornecido, dentre outros.

As variantes selecionadas para etapa de validação foram aquelas indicadas na análise bioinformática, e que foram classificadas como danosas e de efeito deletério pelo SIFT/PolyPhen-2, ou reportadas como patogênicas no ClinVar.

#### 4.4.2 *Microdissecção e captura a laser*

22 amostras FFPE da *cohort* de validação de tumores odontogênicos mistos foram submetidas à microdissecção e captura a laser utilizando o sistema MMI CellCut com software MMI CellTools v.4.0.7 RC2 (MMI Molecular Machines & Industries, Tokyo, Japan) e microscópio óptico Olympus. Essa técnica foi realizada no CAPI (Centro de Aquisição e Processamento de Imagens-ICB/UFMG) e permite isolar pequenas áreas sob a visão microscópica. Tais amostras podem ser observadas na Tabela 1 presente no item “5. Resultados”.

Foi utilizada a tecnologia MMI Membrana Slides, na qual foram realizados três cortes histológicos de 8 µm de cada amostra FFPE, que foram montados em uma lâmina composta por um suporte metálico e uma membrana transparente. Em seguida, as lâminas passaram pelo procedimento de coloração: foi retirada a parafina utilizando Xilol (Merck), o tecido foi reidratado com banhos de Etanol (Merck), a coloração foi realizada com Hematoxilina de Mayer por 10 segundos e por fim foi realizada a desidratação com Etanol (Merck) graduado. As regiões de interesse foram selecionadas na tela do computador e cortadas de forma precisa com feixe de laser em estado sólido. Sendo assim, o componente epitelial e o componente mesenquimal foram microdissecados e coletados separadamente em tubos estéreis antes da extração de DNA. Portanto, foi possível analisar de forma separada o *status* da mutação em diferentes componentes do tecido tumoral (Figura 11).



**Figura 11: Microdissecção e captura a laser.** A técnica microdissecção e captura a laser foi utilizada com intuito de microdissecar as amostras separando as células tumorais epiteliais e mesenquimais antes da extração de DNA. Na figura estão representadas as etapas realizadas, em que pode ser observado o corte histológico submetido à demarcação da área de interesse e o corte com laser de forma precisa dessas áreas selecionadas. Por fim, o material de cada componente tecidual dos casos cortados foi coletado em tubos estéreis separados (aumento 200X). Fonte: Própria autoria.

Uma amostra de FSA (#FSA1) mostrou uma área remanescente de FA além da área de tumor maligno (Figura 4). Nesse caso, três diferentes componentes teciduais foram isolados por microdissecção e captura a laser: componentes epiteliais e mesenquimais da área de FA e o componente sarcomatoso mesenquimal.

#### 4.4.3 qPCR em tempo real alelo-específico

O qPCR em tempo real alelo-específico é uma reação altamente específica e sensível. Segundo protocolo do fabricante, a sensibilidade da técnica é de até 0,001, podendo, dessa forma, detectar baixas quantidades de DNA mutado em meio a um *background* de DNA selvagem (Applied Biosystems, Foster City, USA).

Para a reação de qPCR em tempo real alelo-específico, foi acrescentado ao gDNA de cada amostra sondas de hidrólise Taqman® sequência específica para detecção do alelo mutado e alelo referência, não mutado (Applied biosystems), de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi realizada no instrumento StepOne Plus (Applied Biosystems) segundo o protocolo de ciclo térmico *mutation detection* universal: primeira fase 95 °C por 10 minutos, um ciclo; segunda fase 92 °C por 15 segundos e 58 °C por 1 minuto, 5 ciclos; terceira fase 92 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, 40 ciclos. Por fim, os arquivos contendo os resultados com os valores de CT (do inglês, *cycle threshold*) foram importados para o software Taqman Mutation Detector™ v.2.0 (Life Technologies Corporation, Carlsbad, USA).

O software analisa o *status* de mutação não só pela detecção da amplificação do alelo mutante, mas também de acordo com a comparação do Delta CT da reação com um valor de Delta CT específico para cada sonda, considerado um valor de corte de detecção que já é pré-determinado pelo fabricante. O Delta CT é calculado pela diferença entre o valor de CT do alelo mutante e o valor de CT do alelo do gene referência. No presente estudo, o valor de corte de Delta CT foi de 9,96, portando os casos que apresentaram valores menores de Delta CT tiveram *status* de mutação positivo. Já os casos que apresentaram valores de Delta CT maiores do que 9,96 tiveram os resultados considerados como não interpretáveis. Além disso, para confirmar o resultado, levou-se em consideração o CT individual de cada amostra em cada reação, de forma que o valor máximo permitido para o CT nas reações com as sondas específicas para alelo selvagem foi 34, e o valor máximo permitido para CT nas reações com as sondas específicas para alelo mutado foi 37. Os casos que apresentaram CT maior que esses valores de corte pré-determinados, também tiveram os resultados considerados como não interpretáveis.

Foram excluídas da análise final as amostras que não amplificaram ou que os resultados foram considerados como não interpretáveis duas vezes. Ressalta-se que as amostras submetidas à microdissecção e captura a laser só foram excluídas caso apresentassem esses critérios de exclusão em ambos os componentes (epitelial e mesenquimal).

A única variante patogênica detectada pelo NGS na *cohort* de descoberta de tumores odontogênicos mistos foi a mutação *BRAF* p.V600E, e foi possível validar e observar a frequência dessa variante na *cohort* de validação de tumores odontogênicos mistos através do qPCR em tempo real alelo-específico. Portanto, nessa etapa de análise de variantes foram utilizadas as sondas de hidrólise Taqman® para detecção do alelo mutado (*BRAF\_476\_mu*) e não mutado (*BRAF\_rf*) (Applied Biosystems).

As amostras de ameloblastoma adenoide foram testadas para as mutações *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R.

As amostras de folículos dentários associados a dente impactado da região posterior da mandíbula e maxila também foram testados para mutação *BRAF* p.V600E, além disso, as amostras de folículos dentários associados a dente impactado da região anterior da mandíbula e maxila foram testados para as mutações *KRAS* p.G12V/G12R. Essa escolha se deveu ao fato de a maioria dos casos de ameloblastoma ocorrerem na região posterior, sendo que os

ameloblastomas apresentam alta prevalência de mutação *BRAF* p.V600E. Em contrapartida, o tumor odontogênico adenomatoide, é mais frequente na região anterior dos maxilares e apresenta alta prevalência das mutações de *KRAS* p.G12V/G12R.

As reações de qPCR em tempo real alelo-específico foram realizadas utilizando as sondas de sequência específica para detecção do alelo mutado e alelo referência, respectivamente: mutação *BRAF* p.V600E, sondas *BRAF\_476\_mu* e *BRAF\_rf* (Applied biosystems); mutação *KRAS* p.G12V, sondas *KRAS\_520\_mu* e *KRAS\_rf* (Applied biosystems); mutação *KRAS* p.G12R, sondas *KRAS\_518\_mu* e *KRAS\_rf* (Applied biosystems).

#### 4.4.4 Sequenciamento de Sanger

Seis amostras de folículo dentário foram escolhidas de forma aleatória e foram submetidas a sequenciamento de Sanger para confirmação do resultado gerado através do qPCR em tempo real alelo-específico.

Para isso, foi realizada PCR convencional com as amostras, cujos produtos foram purificados utilizando o reagente de limpeza ExoSAP-IT™ (78200.200) (Affymetrix INC, CA, USA) seguindo as instruções do fabricante, e os produtos de PCR convencional purificados foram sequenciados. Para acessar mutações *KRAS* no códon 12, foi utilizado o seguinte par de primer para amplificar o DNA de três amostras: *Forward* 5'-AAAAGGTACTGGTGGAGTATTTGA-3', *Reverse* 5'-TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'. Enquanto outras três amostras foram testadas para a mutação *BRAF* p.V600E utilizado o seguinte par de primer para amplificação do gDNA: *Forward* 5'-TCATAATGCTTGCTCTGATAGGA-3', *Reverse* 5'-CCAAAATTTAATCAGTGGA-3'. Resumidamente, as reações de sequenciamento foram realizadas por eletroforese capilar no aparelho ABI3730 (Life Technologies), com o reagente BigDye v3.1 (Applied Biosystems) e foi utilizado POP7 como polímero. Os cromatogramas foram interpretados através do software livre SnapGene® (versão 4.2 da GSL Biotech; disponível em [snapgene.com](http://snapgene.com)). Os cromatogramas foram manualmente analisados utilizando a sequência referência do *KRAS* (NG\_007524.1) e a sequência referência do *BRAF* (NG\_007873.3), ambas obtidas na base de dados *Ensembl* (acessado pelo <http://www.ensembl.org/>).



## 5. RESULTADOS

### 5.1 Tumores mistos

Os dados clínicos e os resultados moleculares de cada amostra podem ser observados na Tabela 1 e serão descritos nos itens abaixo.

**Tabela 1: Informações clínicas e resultados moleculares do qPCR em tempo real alelo-específico das amostras de tumores odontogênicos mistos**

Amostra	Informação clínica			Status <i>BRAF</i> p.V600E / Componente histopatológico da lesão			
	Idade (anos)	Sexo	Localização	Epitelial e mesenquimal (sem MCL)	Epitelial	Mesenquimal	Mesenquimal maligno
<b>Fibroma ameloblástico</b>							
FA1*	23	F	Mandíbula, posterior	<b>Mutante*</b>	Na	Na	Na
FA2*	5	M	Maxila, posterior	<b>Mutante*</b>	<b>Mutante</b>	<b>Mutante</b>	Na
FA3	14	F	Mandíbula, anterior	Na	Un	<b>Mutante</b>	Na
FA4	6	F	Mandíbula, corpo e ramo	Na	Un	<b>Mutante</b>	Na
FA5	12	F	Mandíbula, corpo e ramo	Na	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FA6	12	M	Mandíbula, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FA7	9	M	Mandíbula, corpo e ramo	Na	Un	<i>Wild-type</i>	Na
FA8	3	M	Mandíbula, corpo e ramo	Na	Un	<i>Wild-type</i>	Na
FA9*	7	F	Mandíbula, corpo e ramo	<i>Wild-type*</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FA10	14	F	Mandíbula, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	Un	Na
<b>Fibro-dentinoma ameloblástico</b>							
FDA1†	23	F	Mandíbula, corpo e ramo	Na	<i>Wild-type</i>	<b>Mutante</b>	Na
AFD1†					<i>Wild-type</i>	<b>Mutante</b>	Na
FDA2	8	F	Mandíbula, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	<b>Mutante</b>	Na
FDA3	11	M	Maxila, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	Un	Na
FDA4*	9	M	Maxila, anterior	<i>Wild-type*</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
<b>Fibro-odontoma ameloblástico</b>							
FOA1	9	M	Mandíbula, região premolar	Na	<i>Wild-type</i>	<b>Mutante</b>	Na
FOA2	10	F	Maxila, posterior	Na	<b>Mutante</b>	<b>Mutante</b>	Na

FOA3	23	M	Maxila, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FOA4	9	M	Mandíbula, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FOA5	16	M	Mandíbula, corpo e ramo	Na	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FOA6†	14	M	Mandíbula, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
FOA6†					<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	Na
<b>Fibrossarcoma ameloblástico</b>							
FSA1	14	F	Mandíbula, anterior e corpo	Na	<i>Wild-type</i>	<b>Mutante</b>	<b>Mutante</b>
FSA2	32	F	Mandíbula, posterior	Na	<i>Wild-type</i>	Na	<b>Mutante</b>
FSA3	25	M	Mandíbula, posterior	Na	Un	Na	<i>Wild-type</i>
<b>Odontoma</b>							
OD1	14	M	Maxila	<i>Wild-type</i>	Na	Na	Na
OD2	14	F	Mandíbula	<i>Wild-type</i>	Na	Na	Na
OD3	12	M	Mandíbula	<i>Wild-type</i>	Na	Na	Na
OD4	15	F	Mandíbula	<i>Wild-type</i>	Na	Na	Na
OD5	14	F	Mandíbula	<i>Wild-type</i>	Na	Na	Na

\*essas amostras foram sequenciadas por NGS sem separação de componente tecidual, e os resultados foram confirmados por qPCR em tempo real alelo-específico; †Biópsia incisional e excisional dos mesmos casos que demonstraram resultados concordantes; Un= resultados não interpretáveis, com amplificação em um alto CT ou com ausência de amplificação; Na= dado não aplicável ou quesito não testado; F= sexo feminino; M= sexo masculino; MCL= Microdissecção e captura a laser.

### 5.1.1 Caracterização das amostras

28 amostras de tumores odontogênicos mistos compõem a *cohort* de validação incluída na análise final do estudo: quatro amostras da *cohort* de descoberta mais 24 amostras da *cohort* de expansão. Metade das amostras (n=14) foram coletadas de indivíduos do sexo masculino e a outra metade (n=14) do sexo feminino, com variação de idade entre 3 e 32 anos (média de 13 anos), e maioria dos casos acometeram a mandíbula (n=22).

### 5.1.2 Sequenciamento de Nova Geração (NGS)

O número de bases sequenciadas variou de 26.380.356 a 39.113.444 com a maioria das bases com Phred quality score (Q score)  $\geq$ Q20 (medida de qualidade, um parâmetro que indica a precisão de base de 99%), e o número de leituras (do inglês *reads*) variou de 240.490 a 356.680 (Tabela 2).

Após análise dos resultados brutos das quatro amostras sequenciadas com sucesso e da aplicação dos filtros, cinco variantes de nucleotídeo único (SNV) do tipo *missense* foram identificadas, e elas foram sequenciadas com profundidade de leitura acima de 300 (>300x) e com frequência maior do que 5%. Essas e outras informações mais detalhadas sobre cada variante estão descritas na Tabela 3.

Apenas uma SNV foi predita *in silico* como patogênica: *BRAF* p.V600E (c.1799T>A), reportada em 2/3 FA (amostras FA1 e FA2), porém não foi reportada no FDA analisado nessa etapa. As outras quatro variantes reportadas apresentaram  $MAF > 0,01$ : *KDR* p.Q472H reportada em 1/3 FA e 1/1 FDA; *TP53* p.P72R, reportada em 1/3 FA e 1/1 FDA; *KIT* p.M541L e *PIK3CA* p.I391M, reportadas em 1/1 FDA.

Os resultados estão representados na Figura 12 (variante patogênica *BRAF* p.V600E) e na Figura 13 (variantes não patogênicas), nas quais pode-se observar captura de tela dos resultados do IGV.

### 5.1.3 Detecção da mutação *BRAF* p.V600E por qPCR em tempo real alelo-específico

Nessa etapa, foi confirmado o resultado obtido pelo NGS de *status* mutante dos dois casos de FA que tiveram a variante *BRAF* p.V600E reportada (amostras FA1 e FA2), e também foi confirmado o *status* selvagem (do inglês *wild-type*) da amostra FA9 e FDA4 também em concordância com o resultado do NGS. Em seguida, o restante das amostras foi testado para mutação *BRAF* p.V600E.

Considerando a *cohort* de validação total, ou seja, incluindo a *cohort* de descoberta mais a *cohort* de expansão, observou-se que a mutação ativadora *BRAF* p.V600E foi detectada em 4/10 (40%) FA, 2/4 (50%) FDA, 2/6 (33%) FOA e 2/3 (67%) FSA. Enquanto 5/5 (100%) odontomas foram considerados *wild-type* para a mutação. Em dois casos (#FDA1 e #FOA6) foram obtidas biópsias incisional e excisional, sendo que os testes foram realizados nas duas biópsias e ambos apresentaram concordância no resultado. O resultado positivo para a mutação está representado na Figura 12.

O *status* de mutação de cada componente das amostras pode ser observado separadamente na Tabela 1. A mutação foi detectada nos componentes mesenquimais de todos os casos determinados como mutantes, apesar de também ter sido detectada no tecido epitelial de dois desses casos, FA2 e FOA2. Destaca-se que o FSA (#FSA1) cujos dois componentes mesenquimais foram testados, da região maligna e região benigna,

demonstraram presença da mutação ativadora em ambos e ausência da mutação no componente epitelial.

A média de idade dos casos mutantes e *wild-type* foi semelhante.

**Tabela 2- Análise dos resultados brutos dos tumores odontogênicos mistos da *cohort* de descoberta submetidos ao NGS**

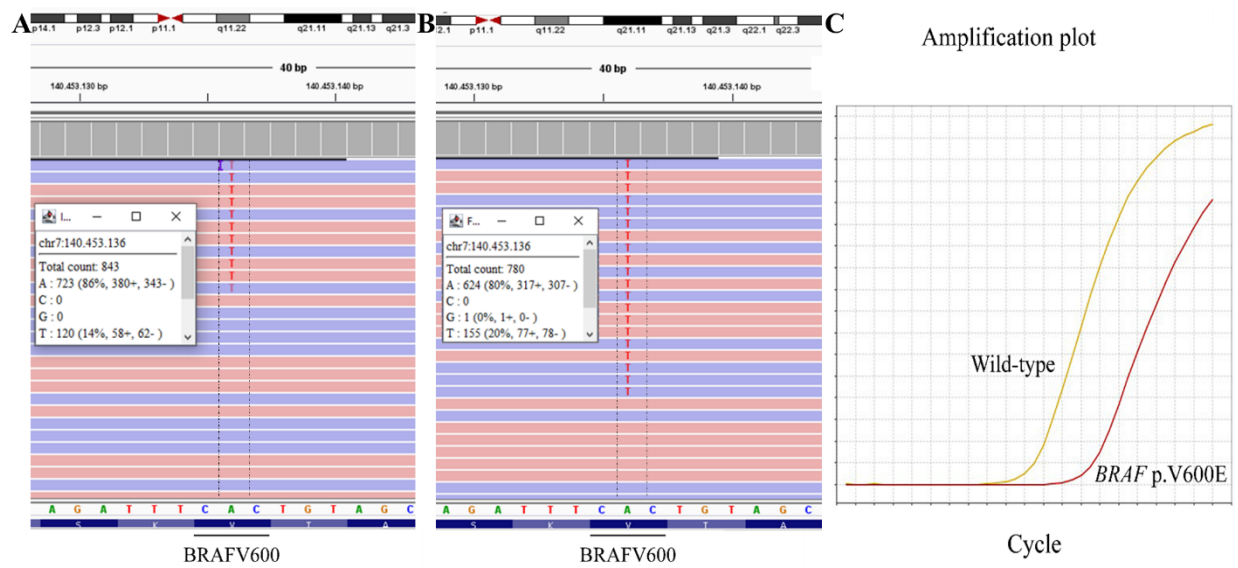
Amostra	Número de bases sequenciadas	Número de bases sequenciadas com $\geq Q20$	Número de leituras	Profundidade média de leitura
FA1	26.380.356	25.416.604	240.490	110 pb
FA2	28.620.453	27.328.593	232.071	123 pb
FA9	33.675.194	27.328.593	303.539	111 pb
FDA4	39.113.444	32.384.054	356.680	110 pb

$\geq Q20$ = Phred quality score (Q score) maior ou igual a 20, um parâmetro e medida de qualidade que indica a precisão de base de 99%.

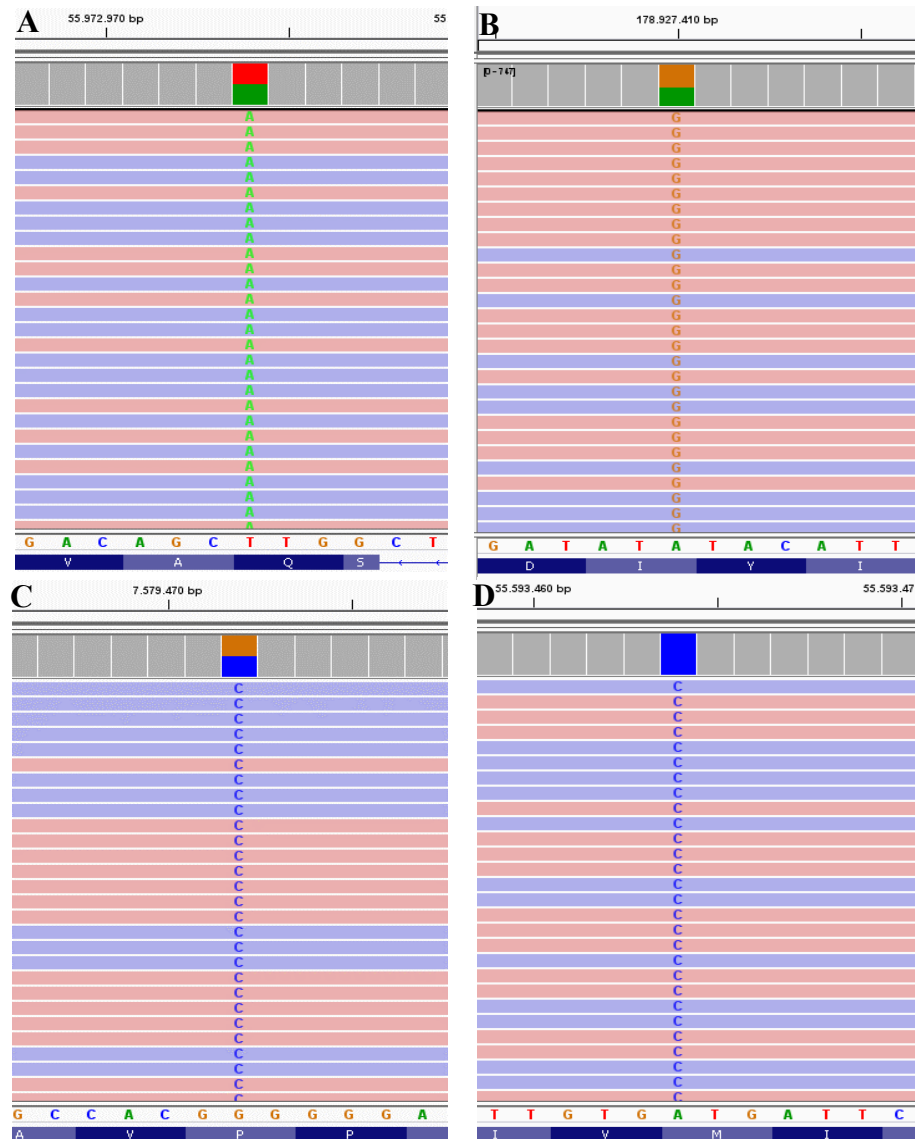
**Tabela 3: Caracterização das variantes SNV do tipo *missense* detectadas em tumores odontogênicos mistos da *cohort* de descoberta sequenciados por NGS utilizando o painel Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2.**

Amostra/ Locus	Gene	VAF (%)	Transcrito	Codificação	Mudança de aminoácido	SIFT	PolyPhen2	dbSNP	MAF	SNPs Comum UCSC	ClinVar	Profundidade de leitura
<b>FA1</b>												
chr4:55972974	KDR	49.59	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	Tolerável	Benigno	rs1870377	0.235(ref)	Sim	ND	1232
chr7:140453136	BRAF	14.18	NM_004333.4	c.1799T>A	p.Val600Glu	<b>Danoso</b>	<b>Provavelmente danoso</b>	rs113488022	ND	Não	<b>Patogênico/ provavel- mente patogênico</b>	839
<b>FA2</b>												
chr7:140453136	BRAF	19.95	NM_004333.4	c.1799T>A	p.Val600Glu	<b>Danoso</b>	<b>Provavelmente danoso</b>	rs113488022	ND	Não	<b>Patogênico/ provavel- mente patogênico</b>	777
<b>FA9</b>												
chr17:7579472	TP53	53.8	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerável	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Sim	Responsivo a drogas	952
<b>FDA4</b>												
chr3:178927410	PIK3 CA	56.59	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	Tolerável	Benigno	rs2230461	0.073 (ref)	Sim	Benigno	744
chr4:55593464	KIT	100	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	Tolerável	Benigno	rs3822214	0.064	Sim	Provavel- mente benigno	1994
chr4:55972974	KDR	46.45	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	Tolerável	Benigno	rs1870377	0.235(ref)	Sim	ND	1408
chr17:7579472	TP53	52.46	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	Tolerável	Benigno	rs1042522	0.398 (ref)	Sim	Responsivo a drogas	671

VAF= frequência alélica da variante; SIFT (do inglês *Sorting Intolerant From Tolerant*)= prediz como a substituição do aminoácido afeta a função da proteína, disponível em <http://sift-dna.org>; PolyPhen2 (do inglês *Polymorphism Phenotyping v2*)= fenotipagem do polimorfismo, prediz o efeito funcional da proteína em uma variante, disponível em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>; dbSNP(do inglês *Single Nucleotide Polymorphism Database of genomic variants*)= base de dados de variações genéticas de polimorfismo de um único nucleotídeo, disponível em <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>; ClinVar: Avaliação do impacto clínico da variante, disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>; MAF (do inglês *Minor Allele Frequency*)= Frequência com que o segundo alelo mais comum ocorre em uma dada população, disponível em <http://www.1000genomes.org/>; ND= dado não disponível.



**Figura 12: Análise dos resultados moleculares da mutação patogênica *BRAF* p.V600E em tumores odontogênicos mistos.** Captura de tela IGV mostrando o resultado do NGS da amostra FA1 (A) e FA2 (B) da *cohort* de descoberta, na qual observa-se a substituição da base A pela base T, o que leva à substituição do aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E) no códon 600 e culmina na mutação *BRAF* p.V600E, c.1799T>A (A, B). Achados representativos do qPCR em tempo real alelo-específico mostrando a detecção de amplificação do alelo mutante além da amplificação do alelo referência pelas sondas específicas, o que indica confirmação/detecção da mutação *BRAF* p.V600E detectada pelo NGS (C).



**Figura 13: Análise dos resultados do NGS, variantes não patogênicas detectadas em tumores odontogênicos mistos da *cohort* de descoberta.** Captura de tela do IGV mostrando a substituição de bases que culminam nas variantes SNPs preditas *in silico* como não patogênicas detectadas pelo NGS: *KDR* p.Q472H, presença de troca da base T pela base A na posição c.1416 (#FA1) (A); *PIK3CA* p.I391M, presença de troca da base A pela base G na posição c.1173 (#FDA4) (B); *TP53* p.P72R, presença de troca da base G pela base C na posição c.215 (#FA9) (C); *KIT* p.M541L, presença de troca da base A pela base C na posição c.1621 (#FDA4)

Os resultados obtidos no estudo em amostras de tumor odontogênico misto foram redigidos em forma de artigo científico e publicado online no periódico *The Journal of Molecular Diagnostics*: **Coura BP**, Bernardes VF, de Sousa SF, Diniz MG, Moreira RG, de Andrade BAB, Romañach MJ, Pontes HAR, Gomez RS, Odell EW, **Gomes CC**. Targeted next-generation sequencing and allele-specific qPCR of laser capture microdissected samples uncover molecular differences in mixed odontogenic tumours. *J Mol Diagn* 2020; 22:1393-1399 (Apêndice A).

## 5.2 Ameloblastoma adenoide

Os dados clínicos, características histopatológicas e os resultados moleculares de cada amostra podem ser observados na Tabela 4 e serão descritos nos itens abaixo.

**Tabela 4: Informações clínicas e resultados moleculares do qPCR em tempo real alelo-específico das amostras de ameloblastoma adenoide**

Amostra	Informações clínicas			Características histopatológicas			Resultados moleculares		
	Idade (anos)	Sexo	Localização	Célula fantasma	Material dentinoide	Célula clara	<i>BRAF</i> p.V600E	<i>KRAS</i> p.G12V	<i>KRAS</i> p.G12R
AA1	34	M	Maxila, anterior/posterior	-	+	+	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>
AA2	52	M	Mandíbula, Anterior	-	-	+	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>
AA3	24	M	Maxila, posterior	-	+	+	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>
AA4	36	M	Mandíbula, Anterior	-	+	+	<i>Wild-type</i>	Un	<i>Wild-type</i>
AA5	79	M	Maxila, anterior/posterior	+	+	+	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>
AA6	41	M	Maxila, posterior	-	+	+	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>
AA7	55	M	Maxila, posterior	-	-	-	<i>Wild-type</i>	Un	Un
AA8	39	M	Mandíbula, posterior	-	+	+	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>	<i>Wild-type</i>
AA9	39	M	Mandíbula, posterior	-	-	-	<i>Wild-type</i>	Un	<i>Wild-type</i>

AA= ameloblastoma adenoide; Un= resultados não interpretáveis, com amplificação em um alto CT ou com ausência de amplificação; Na= dado não aplicável ou quesito não testado; F= sexo feminino; M= sexo masculino; += presente; -= ausente

### 5.2.1 Caracterização das amostras

A média de idade dos pacientes foi de 44,3 anos (variando de 24 a 79). Todas as amostras ocorreram em indivíduos do sexo masculino (n=9), com proporção semelhante de casos acometendo maxila (n=5) e mandíbula (n=4). Enquanto cinco casos afetaram a região posterior dos maxilares e dois casos afetaram a região anterior dos maxilares, dois casos afetaram a região anterior e posterior.

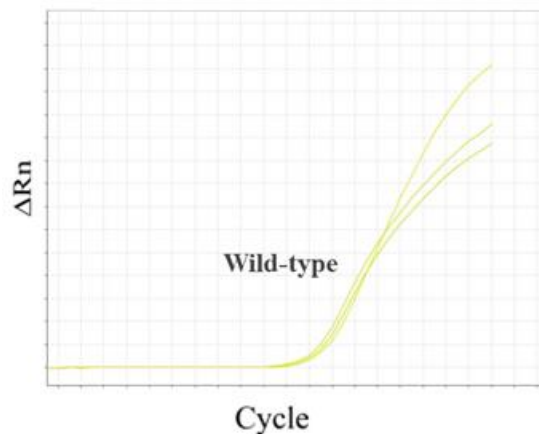
Após análise das características histopatológicas dos casos analisados, foi confirmado o diagnóstico dos casos, portanto, todas as amostras demonstraram presença de estruturas semelhantes a ductos e redemoinhos ou mórulas (n=9), características consideradas pela OMS como essenciais para o diagnóstico dos ameloblastomas adenoides. Além disso, na análise histopatológica, investigou-se também a presença das características sugeridas pela OMS como critério diagnóstico desejável: 6/9 amostras apresentaram depósito de material



dentinoide e 7/9 casos apresentaram células claras; Apenas um caso (#6) apresentou área focal de células fantasmas com queratinização.

### 5.2.2 Análise molecular por meio de qPCR em tempo real alelo-específico

Todas as amostras de ameloblastoma adenoide testadas exibiram *status wild-type* para as mutações patogênicas *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R, cujo resultado está representado na Figura 14.



**Figura 14: Análise dos resultados moleculares dos ameloblastomas adenoide.** Achados representativos do qPCR em tempo real alelo-específico demonstrando a não detecção de amplificação alélica com as sondas *BRAF\_478\_mu*, *KRAS\_520\_mu* e *KRAS\_518\_mu*, apenas amplificação dos alelos referências, o que indica *status wild-type* para ambos *BRAF* e *KRAS*.

Os resultados obtidos no estudo em amostras de ameloblastoma adenoide foram redigidos em forma de artigo científico e publicado no periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine*: **Coura BP**, Dos Santos JN, Fonseca FP, Bernardes VF, de Aquino SN, Jorge Júnior J, Vargas PA, Romãach MJ, de Andrade BAB, Gomez RS, **Gomes CC**. Adenoid ameloblastoma with dentinoid is molecularly different from ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med*. 2021; 50:1067-1071 (Apêndice B).

### 5.3 Remanescente de folículo dentário associado a dente incluso

Os dados clínicos e os resultados moleculares podem ser observados na Tabela 5 e estão descritos nos itens abaixo.

**Tabela 5. Dados clínicos e resultados moleculares de 48 casos de folículos dentários**

Amostra	Informações clínicas				Resultados moleculares*
	Idade (anos)	Sexo	Região	Dente incluso associado	Mutação <i>KRAS</i> e <i>BRAF</i>
1	25	M	Mandíbula, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
2	33	M	Mandíbula, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
3	13	M	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
4	20	M	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
5	14	F	Mandíbula, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
6	15	F	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
7	12	F	Mandíbula, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
8	08	M	Maxila, anterior	Nd	<i>Wild-type</i>
9	13	F	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
10	12	F	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
11	12	F	Maxila, anterior	Incisivo	<i>Wild-type</i>
12	14	F	Mandíbula, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
13	16	F	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
14	51	M	Mandíbula, anterior	Nd	<i>Wild-type</i>
15	13	F	Mandíbula, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
16	12	F	Maxila, anterior	Canino	<i>Wild-type</i>
17	15	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
18	16	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
19	16	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
20	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
21	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
22	18	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
23	20	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
24	25	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
25	30	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
26	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
27	13	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
28	15	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
29	16	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
30	16	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
31	17	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
32	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
33	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
34	17	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
35	17	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
36	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
37	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
38	17	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
39	17	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
40	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
41	17	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
42	18	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
43	18	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
44	18	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>

45	19	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
46	19	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
47	19	F	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>
48	17	M	Mandíbula, posterior	3° Molar	<i>Wild-type</i>

F= sexo feminino; M= sexo masculino; Nd= dado não disponível; \*todas as amostras de folículos dentários associados com dentes impactados na região anterior da mandíbula/maxila foram testados para as mutações *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R, e todas as amostras de folículos dentários obtidos em torno do dente terceiro molar impactado foram testadas para mutação *BRAF* p.V600E.

### 5.3.1 Caracterização das amostras

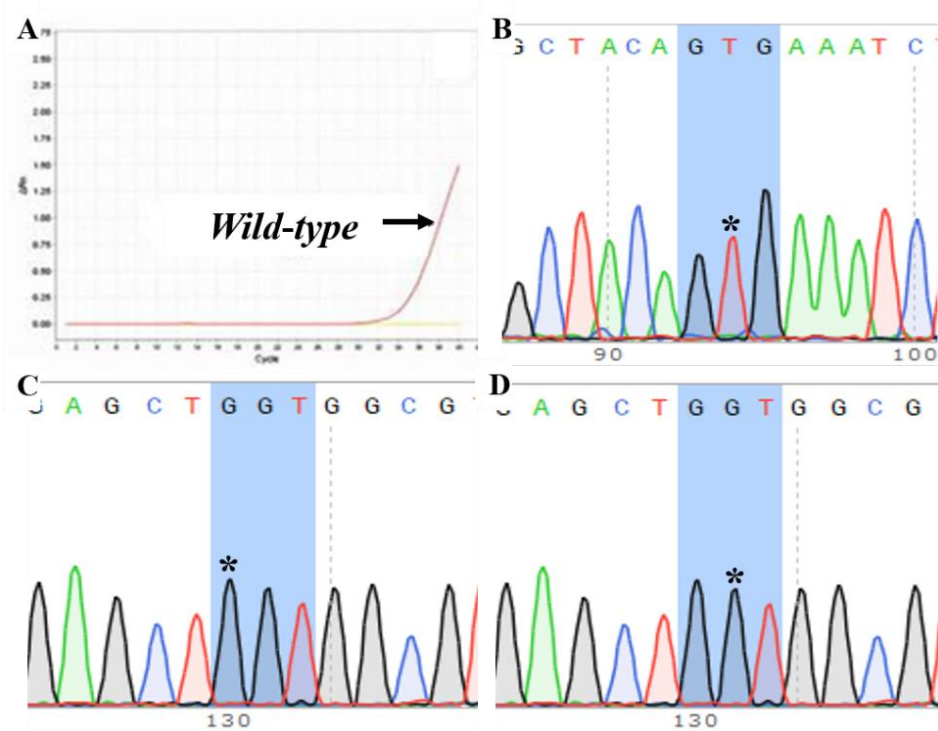
48 amostras de remanescentes de folículos dentários associados a dentes inclusos foram incluídas na análise final. A média de idade dos pacientes dos quais foram coletados os folículos dentários da região posterior e anterior foi de 17 anos (variando de 8 a 51 anos). A maioria das amostras foram coletadas de indivíduos do sexo feminino (n=31), localizadas na mandíbula (n=39) e na região posterior (n=32) associadas ao terceiro molar impactado.

### 5.3.2 Análise molecular por meio de qPCR em tempo real alelo-específico

Não foram detectadas mutações em 48/48 remanescentes de folículos dentários. Amostras de remanescentes de folículos dentários associados a dente incluso na região anterior demonstraram *status wild-type* para as mutações *KRAS* p.G12V e p.G12R, enquanto amostras de remanescente de folículos dentários associados a terceiro molar impactado demonstraram *status wild-type* para a mutação *BRAF* p.V600E. Somente houve amplificação com a sonda referência *KRAS\_rf* e *BRAF\_rf*, e os resultados representativos estão ilustrados na Figura 14.

### 5.3.3 Análise molecular por meio de sequenciamento de Sanger

6/6 remanescentes de folículos dentários sequenciados apresentam cromatogramas compatíveis com a sequência selvagem para as mutações *KRAS* p.G12V/R e *BRAF* p.V600E. A Figura 15 representa a confirmação do resultado do qPCR em tempo real alelo-específico pela técnica de sequenciamento de Sanger.



**Figura 15: Análise dos resultados moleculares dos remanescentes de folículos dentários.** Achados representativos do qPCR em tempo real alelo-específico demonstrando a não detecção de amplificação da sonda BRAF\_478\_mu e amplificação apenas do alelo referência, o que indica *status wild-type*. (A). Resultados representativos do sequenciamento de Sanger: cromatograma mostrando a sequência selvagem do gene *BRAF* códon 600, com presença da base T na posição c.1799 (B); cromatograma do sequenciamento mostrando as sequências selvagens do gene *KRAS* códon 12 (C e D), com presença da base G na posição 34 (C) e base G na posição 35 (D); o que confirmaria assim o *status wild-type* para as mutações *BRAF* p.V600E (c.1799T>A) (B), *KRAS* p.G12R (c.34G>C) (C) e *KRAS* p.G12V (c.35G>T) (D), respectivamente.

Os resultados obtidos no estudo em amostras de remanescente de folículo dentário foram redigidos em forma de artigo científico e publicado no periódico *Archives of Oral Biology*: Coura BP, de Resende TAC, de Menezes VCB, Bernardes VF, de Sousa SF, Diniz MG, Gomez RS, Gomes CC. Assessing pathogenic mutations in dental follicles as an attempt to identify early events in odontogenic tumours tumourigenesis. *Arch Oral Biol* 2019; 113:104523 (Apêndice C).

## 6. DISCUSSÃO

Estudos relacionados à oncogenética já estiveram totalmente voltados para eventos e alterações moleculares em tumores malignos. Porém, análises realizadas em condições pré-malignas e neoplasias benignas também apresentam papel crucial na pesquisa, pois podem ajudar a elucidar eventos chave ligados à iniciação e progressão tumoral (CAMPBELL *et al.*, 2016; KATO *et al.*, 2016; DINIZ *et al.*, 2017; GOMES, 2022). A presença de mutações somáticas foi relatada em tecidos normais, incluindo alterações no gene *FGFR3* (MARTINCORENA *et al.*, 2015) e *TP53* (NAKAZAWA *et al.*, 1994; JONASON *et al.*, 1996; LING *et al.*, 2001) em pele de indivíduos saudáveis. Além disso, foram identificadas mutações patogênicas na via MAPK em uma alta proporção em lesões benignas, incluindo tumores odontogênicos epiteliais e mistos (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2017; BRUNNER *et al.*, 2015; YOU *et al.*, 2019; AGAIMY *et al.*, 2020). Constatou-se, ainda, que a frequência e as consequências de cada tipo de mutação no comportamento das lesões podem sofrer variações dependendo dos tipos tumorais referentes (BOS *et al.*, 1987; SMIT *et al.*, 1988; KARNOUB *et al.*, 2008; HAIGIS, 2017). Em 2014, a mutação ativadora *BRAF* p.V600E foi reportada pela primeira vez em ameloblastomas, tumor odontogênico epitelial benigno que pode apresentar comportamento localmente invasivo (KURPPA *et al.*, 2014). Posteriormente, outros trabalhos confirmaram esse achado (BROWN *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015), e a frequência desta mutação em ameloblastoma variou entre 60% a 80% dos casos analisados tendo sido detectada em 35% em sua contraparte maligna, o carcinoma ameloblástico (BILODEAU & SEETHALA, 2019; GUIMARÃES *et al.*, 2021). Outras alterações em genes da via MAPK também foram identificadas em ameloblastomas, como *RAS* e *FGFR2*, porém em uma prevalência menor do que mutação *BRAF* (BROWN *et al.*, 2014; BILODEAU & SEETHALA, 2019; YOU *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020). Mutações em genes diretamente relacionados com a via MAPK e comumente associadas ao desenvolvimento tumoral foram reportadas em alguns casos de ameloblastoma e sua contraparte maligna, carcinoma ameloblástico, como, por exemplo, mutações somáticas em *CTBNNBI* (SIRIWARDENA *et al.*, 2009; BROWN *et al.*, 2014; YUKIMORI *et al.*, 2017; GUIMARÃES *et al.*, 2021). Algumas terapias alvo, incluindo terapias que utilizam inibidores de *BRAF*, foram testadas e demonstraram resultados promissores em ameloblastomas, porém apresentaram efeitos colaterais indesejados. Portanto, embora o papel específico de mutações na via MAPK na tumorigênese dessas lesões ainda seja desconhecido, esses estudos indicam a importância da

identificação dessas alterações moleculares para auxílio no desenvolvimento de métodos preventivos, diagnóstico ou tratamento (YOU *et al.*, 2019; SHI *et al.*, 2020). Recentemente, nosso grupo de pesquisa também reportou alterações no gene *KRAS* em 71% de tumores odontogênicos adenomatoide analisados, um tumor odontogênico epitelial benigno de comportamento indolente. Dentre essas alterações estão as mutações p.G12V e p.G12R (GOMES *et al.*, 2016; COURA *et al.*, 2019), sendo a mutação *KRAS* p.G12V a mais frequentemente encontrada (COURA *et al.*, 2019).

Levando em consideração as informações acima e o fato de folículo dentário estar relacionado ao desenvolvimento de tumores e cistos odontogênicos, o presente estudo utilizou amostras de remanescente de folículo dentário para avaliar alterações em componentes da via MAPK. Desta forma, ainda dentro do cenário de análise molecular em tecido normal, buscou-se testar mutações somáticas nos genes *BRAF* e *KRAS* que pudessem estar associadas a mudanças genéticas iniciais em tumores odontogênicos. Devido à grande parte dos ameloblastomas ocorrem na região posterior da mandíbula (TAKATA & SLOOTWEG, 2017), os remanescentes de folículos dentários associados a dente impactado da região posterior da mandíbula foram testados para a mutação *BRAF* p.V600E. Além disto, em virtude de os tumores odontogênicos adenomatoides demonstrarem maior prevalência na região anterior (TAKATA & SLOOTWEG, 2017), as amostras de remanescentes de folículos dentários associados a dente impactado da região anterior da mandíbula e maxila foram testadas para as mutações *KRAS* p.G12V/G12R. No entanto, 100% (48/48) das amostras de remanescente de folículo dentário exibiram genótipo *wild-type* para as mutações ativadoras *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R, não podendo confirmar, portanto, associação dessas mutações a eventos genéticos iniciais do processo da tumorigênese no *cohort* de amostras avaliados.

Na última década, *BRAF* p.V600E também foi descrita em outros tumores odontogênicos que apresentam células semelhantes a ameloblastos, incluindo FA e lesões relacionadas (BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; YOU *et al.*, 2019; AGAIMY *et al.*, 2020). Entretanto, a patogênese molecular de tumores odontogênicos mistos ainda permanece pouco explorada. Dois estudos descreveram a mutação ativadora *BRAF* p.V600E em 57% (4/7) FA analisados (BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015), e um terceiro artigo publicado recentemente citou a presença dessa mesma mutação em 16/16 FA, porém, o acesso aos dados desse último trabalho foi realizado apenas pelo seu resumo, por se tratar de um trabalho escrito em língua Chinesa (YOU *et al.*, 2019). Essa mesma mutação foi reportada

em 33% (6/18) FOA (BRUNNER *et al.*, 2015) e no único caso de FDA analisado (BROWN *et al.*, 2014). Agaimy e colegas reportaram a mutação *BRAF* p.V600E em 71% (5/7) dos FSA analisados, juntamente com a mutação *NRAS* p.G61L em um dos casos *wild-type* para *BRAF* (AGAIMY *et al.*, 2020).

Devido à escassez de dados elucidativos sobre alterações moleculares em tumores odontogênicos mistos, foi utilizado neste estudo a técnica de NGS para avaliar possíveis mutações em 50 genes comumente relacionados a cânceres humanos, incluindo os proto-oncogenes *BRAF* e *NRAS*. Como resultado do NGS, foi observada apenas mutação *BRAF* p.V600E que, em conjunto com os dados da literatura, sugerem a possibilidade de esta ser a única mutação *driver* em potencial. Nos resultados finais, observa-se alta frequência da mutação *BRAF* nesse grupo de tumor, estando presente em 40% (4/10) FA, 50% (2/4) FDA, 33% (2/6) FOA e 67% (2/3) FSA, dados em concordância e complementares aos estudos anteriores.

Ademais, por definição, esses tumores odontogênicos mistos abordados apresentam proliferação epitelial e mesenquimal, sendo que nos casos de FSA a área sarcomatosa se restringe ao componente mesenquimal (TAKATA & SLOOTWEG, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018). Portanto, seria de extrema importância identificar, além da presença da mutação, em qual componente ela se encontra. A técnica de microdissecção e captura a laser utilizada no projeto foi uma ferramenta importante para tal esclarecimento, já que proporcionou a análise das alterações moleculares nos componentes teciduais separadamente. Apenas um estudo previamente publicado utilizou a microdissecção a laser em tumor odontogênico misto com número reduzido de amostras (AGAIMY *et al.*, 2020). Na análise de Brunner e colegas, um FA e três FOA descritos com *status* mutante para *BRAF* p.V600E tiveram o componente mesenquimal considerado *wild-type* (BRUNNER *et al.*, 2015). Porém, segundo resultados do atual trabalho, a mutação *BRAF* p.V600E esteve restrita ao componente mesenquimal em sete de nove (78%) dos casos com *status* mutante submetidos à microdissecção e captura a laser, enquanto os outros dois casos positivos para a mutação (FA2 e FOA2) apresentaram a mutação no componente mesenquimal e epitelial. É possível que nos primeiros casos tenha ocorrido contaminação do tecido epitelial por tecido mesenquimal, o que foi captado pelo qPCR em tempo real alelo-específico, que é uma técnica altamente sensível (limite de detecção do alelo mutado igual a 0,1%). Também é provável que a discrepância entre os resultados dos dois estudos pode ser atribuída à utilização da técnica microdissecção e captura a laser juntamente com uma técnica de alta sensibilidade. Ressalta-se que estudos anteriores

demonstraram imunopositividade para mutação *BRAF* p.V600E apenas em estruturas formadas por células epiteliais neoplásicas de ameloblastomas (KURPPA *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2014). Portanto, é importante salientar que o fato dos dois últimos casos apresentarem mutação em ambos componentes da lesão endossa o conceito de se tratar de uma lesão odontogênica mista.

Ressalta-se que os casos FSA mutantes submetidos à microdissecção e captura a laser apresentaram positividade para a mutação *BRAF* p.V600E apenas na porção mesenquimal, sendo o epitélio considerado *wild-type*. Adicionalmente, o caso FSA1 apontou presença da mutação no mesênquima sarcomatoso e mesênquima da área remanescente de FA. Em 2020, o sequenciamento de um caso de FSA detectou a presença de mutação *BRAF* em ambos os componentes teciduais do tumor, porém um segundo teste utilizando anticorpo VE1 nesse mesmo caso apresentou imunomarcagem positiva inequívoca de *BRAF* p.V600E apenas no componente mesenquimal (AGAIMY *et al.*, 2020). Os próprios autores julgaram ser mais provável ter ocorrido contaminação entre amostras dos tecidos no primeiro teste, enfatizando a importância da separação dos componentes por microdissecção e captura a laser para resultados mais fidedignos. Esses relatos, associados aos resultados do presente estudo, reforçam a ideia de transformação maligna de um FA preexistente, e que essa transformação é embasada por alterações decorrentes do mesênquima. Entretanto, como *BRAF* p.V600E foi encontrada em FA e FSA, é provável que a malignização seja conduzida por outro estímulo oncogênico.

Apesar dos inúmeros esforços e debates ao longo dos anos, o diagnóstico de alguns tumores odontogênicos ainda é muitas vezes desafiador, e a natureza de alguns casos ainda permanece incerta, principalmente em casos das lesões mais incomuns. Mesmo com a excisão cirúrgica sendo o tratamento mais amplamente utilizado, existem diferentes tipos de ressecções cirúrgicas e tratamentos específicos para algumas lesões odontogênicas (TAKATA & SLOOTWEG, 2017; BILODEAU & SEETHALA, 2019). Isso reforça a importância do diagnóstico diferencial assertivo, uma vez que o tratamento escolhido pode influenciar na taxa de morbidade e recorrência, o que se torna mais evidente naqueles casos que são recomendados tratamentos conservadores (TAKATA & SLOOTWEG, 2017; BILODEAU & SEETHALA, 2019).

Quando levamos em consideração os tumores odontogênicos mistos, as maiores dúvidas quanto ao diagnóstico diferencial giram em torno de FDA e FOA, que podem



mimetizar OD em estados iniciais do desenvolvimento, tornando a tarefa de distingui-los até certo ponto inviável (SLOOTWEG, 1981; PHILIPSEN *et al.*, 1997; TOMICH, 1999; CHEN *et al.*, 2005; BRUCHNER *et al.*, 2013; CHRCANOVIC *et al.*, 2017; TAKATA & SLOOTWEG, 2017; SPEIGHT & TAKATA, 2018), por isso essas lesões foram excluídas como entidades distintas na última edição da OMS e incluídas como lesões dentro do espectro de desenvolvimento do odontoma (TAKATA & SLOOTWEG, 2017). Apesar de alguns pesquisadores ainda defenderem essa teoria de maturação progressiva dos tumores odontogênicos mistos para odontoma, estudos retrospectivos apontam dados controversos na literatura e ainda questionam tal definição perante evidências clínico-patológicas (CHEN *et al.*, 2005; BRUCHNER *et al.*, 2013; CHRCANOVIC *et al.*, 2017; CHRCANOVIC *et al.*, 2018). Em uma revisão sistemática atualizada, FDA e FOA demonstraram diversas similaridades além da semelhança histológica: alta prevalência em homens, idades médias, tamanho das lesões e taxas de associação a dentes inclusos, reabsorção da raiz e recorrência, o que seria contrária à ideia de maturação progressiva e reforça a ideia de que pelo menos algumas dessas lesões seriam neoplasias verdadeiras (CHRCANOVIC *et al.*, 2017). Características clínico-radiográficas observadas nos casos incluídos neste estudo indicam que as lesões aqui presentes mais provavelmente representam neoplasias verdadeiras do que odontoma. Recentemente, um estudo realizado pelo nosso grupo avaliou o desenvolvimento de caso recorrente de FDA (que não mostrou maturação após 6 anos) através do modelo de xenoinxerto derivado de paciente (PDX), que foi acompanhado por 250 dias. Os resultados apoiam o conceito de natureza neoplásica da lesão, incluindo a não maturação ao longo dos anos e similaridades do PDX com o tumor primário, como a manutenção das características morfológicas, atividade proliferativa e ativação da via MAPK (PEREIRA *et al.*, 2019).

Resultados moleculares aqui descritos demonstraram que, enquanto alguns tumores odontogênicos mistos apresentaram alta frequência de mutação *BRAF* p.V600E, 100% (5/5) dos odontomas mostraram genótipo *wild-type* para esta mutação. Este fato esclarece em partes o perfil molecular dessas lesões e sugere que, apesar de odontoma poder mimetizar histologicamente outros tumores mistos durante seu desenvolvimento, são lesões molecularmente distintas.

Os dados gerados por esse estudo são consistentes, porém existem algumas limitações. O número amostral da *cohort* de descoberta de tumores mistos foi muito baixo devido à utilização de amostras FFPE, portanto poucos casos foram sequenciados. A utilização de tecido parafinado também foi responsável por dificultar a análise molecular da *cohort* de

validação dos tumores mistos. Além disso, apesar do painel utilizado no NGS contar com 50 oncogenes e genes supressores de tumor comumente encontrados em cânceres humanos, existem outros genes que não estão presentes nesse painel, portanto alguns *oncotargets* podem ter sido perdidos no sequenciamento dos tumores odontogênicos mistos.

O ameloblastoma adenoide também constitui uma lesão odontogênica muito rara recém-reconhecida, cuja classificação ainda é alvo de debate até o momento. Embora por vezes apresente características que não são usualmente encontradas no ameloblastoma clássico, incluindo material dentinoide e estruturas semelhantes a ductos, o ameloblastoma adenoide vinha sendo considerado uma variante rara de ameloblastoma devido à sua semelhança histopatológica, agressividade e alta taxa de recorrência, sendo essa última, inclusive, maior que do ameloblastoma convencional (LOYOLA *et al.*, 2015; ADORNO-FARIAS *et al.*, 2018). Com o objetivo de uma análise molecular comparativa dessas lesões, foi realizado no presente estudo testes para mutações em componentes da via MAPK previamente demonstradas em alta frequência em tumor odontogênico adenomatoide (*KRAS*) e em ameloblastoma (*BRAF*) (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; GOMES *et al.*, 2016; BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2019; COURA *et al.*, 2019). Porém, resultados demonstraram *status wild-type* para as mutações *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V e *KRAS* p.G12R nas amostras testadas, indicando discrepância de características genéticas entre essas lesões. Recentemente, nosso grupo estendeu a análise molecular dos ameloblastoma adenoide e investigou/reportou a presença de mutações no gene *CTNNB1*, uma vez que outras lesões odontogênicas ricas em células fantasmas já foram descritas com tais mutações (BASTOS *et al.*, 2022b). Porém, as bases moleculares dos ameloblastomas adenoide ainda permanecem pouco exploradas.

## 7. CONCLUSÃO

Não foram identificadas as mutações patogênicas *KRAS* p.G12V/R e *BRAF* p.V600E nos remanescentes de folículos dentários avaliados, não sendo possível associar tais alterações como eventos genéticos iniciais envolvidos no processo de desenvolvimento de tumores odontogênicos. Ressalta-se, no entanto, que esse resultado não tem o poder de excluir tal suposição, devido ao número relativamente pequeno de amostras analisadas e ao fato de a análise ter sido restrita a poucos genes/mutações. Adicionalmente, a investigação das mutações foi realizada nos remanescentes de folículos dentários, excluindo possível detecção dessas mutações em tecidos adjacentes ao dente impactado.

As mutações patogênicas *KRAS* p.G12V/R e *BRAF* p.V600E também não foram identificadas nos casos de ameloblastoma adenoide analisados, indicando disparidade molecular entre essas lesões e os ameloblastomas e tumor odontogênico adenomatoide. Esses dados suportam a recente classificação deste tumor como uma entidade distinta, e não como uma variante de ameloblastoma.

Observou-se a mutação *BRAF* p.V600E em uma parte dos tumores odontogênicos mistos, em especial nos componentes mesenquimais. Porém, os odontomas não apresentaram esta mutação ativadora. Os resultados sugerem, portanto, que o FDA e FOA não devem ser reunidos em um só grupo, juntamente com os odontomas. Além disso, os resultados endossam a concepção de que a transformação maligna de FA ocorre no componente mesenquimal do tumor, confirmando também a ideia de o crescimento dos tumores odontogênicos estar relacionado ao componente mesenquimal e de sua natureza mista.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADORNO-FARIAS D, MUNIZ VRVM., SOARES AP, *et al.* Ameloblastoma with adenoid features: A series of eight cases. *Acta Histochemica* 2018; 120: 468–476.

AGAIMY A, SKALOVA A, FRANCHI A, *et al.* Ameloblastic fibrosarcoma: clinicopathological and molecular analysis of 7 cases highlighting frequent BRAF and occasional NRAS mutations. *Histopathology* 2020; 76:814-821.

AL-ZOUBI H, ALHARBI AA, FERGUSON DJ, ZAFAR MS. Frequency of impacted teeth and categorization of impacted canines: A retrospective radiographic study using orthopantomograms. *Eur J Dent.* 2017; 11:117-21.

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

de ARRUDA JAA, NORONHA MS, ABREU LG, DE LACERDA JCT, SILVA TA, MESQUITA RA. Adenoid ameloblastoma in the posterior maxilla: a case report and review of the literature. *Oral Maxillofac Surg.* 2020; 24:243-249.

BARNES L, EVESON JW, REICHART P, SIDRANSKY D. Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. WHO Classification of Tumours. 3th ed. Lyon, France: IARC, 2005. p. 308.

BASTOS VC, GOMEZ RS, GOMES CC. Revisiting the human dental follicle: From tooth development to its association with unerupted or impacted teeth and pathological changes. *Dev Dyn* 2022a ; 251:408-423.

BASTOS VC, COURA BP, GUIMARÃES LM, *et al.* Adenoid ameloblastoma harbors beta-catenin mutations. *Mod Pathol.* 2022b. doi: 10.1038/s41379-022-01125-4. Online ahead of print.

BERNARDES VF, GOMES CC, GOMEZ RS. Molecular investigation of ameloblastic fibroma: how far have we gone? *Head Neck Oncol* 2012; 4:45.

BILODEAU EA, SEETHALA RR. Update on Odontogenic Tumors: Proceedings of the North American Head and Neck Pathology Society. *Head Neck Pathol* 2019; 13: 457-465.

BLOKZIJL F, DE LIGT J, JAGER M, *et al.* Tissue-specific mutation accumulation in human adult stem cells during life. *Nature* 2016; 538:260-264.

BODNER L, MANOR E, SHEAR M, VAN DER WAAL I. Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in an odontogenic cyst: a clinicopathologic analysis of 116 reported cases. *J Oral Pathol Med* 2011; 40:733-738.

BOLOGNA-MOLINA R, OGAWA I, MOSQUEDA-TAYLOR A, *et al.* Detection of MAPK/ERK pathway proteins and KRAS mutations in adenomatoid odontogenic tumors. *Oral Dis.* 2019; 25:481–487.

BOS JL, FEARON ER, HAMILTON SR, VERLAAN-DE VRIES M, VAN BOOM JH, VAN DER EB AJ, VOGELSTEIN B. Prevalence of ras gene mutations in human colorectal cancers. *Nature* 1987; 327: 293-297.

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

BRUNET M, KHALIFA E, ITALIANO A. Enabling precision medicine for rare head and neck tumors: the example of BRAF/MEK targeting in patients with metastatic ameloblastoma. *Front Oncol.* 2019; 9:1204.

BROUDIC-GUIBERT M. BLAY J-Y,VAZQUEZ L, *et al.* Persistent response to vemurafenib in metastatic ameloblastoma with BRAF mutation: a case report. *J Med Case Rep.* 2019; 13:245.

BRUNNER P, BIHL M, JUNDT G, BAUMHOER D, HOELLER S. BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. *Oral Oncol* 2015, 51:e77-78.

BUCHNER A, KAFFE I, VERED M. Clinical and radiological profile of ameloblastic fibro-odontoma: an update on an uncommon odontogenic tumor based on a critical analysis of 114 cases. *Head Neck Pathol* 2013, 7:54-63

CAMPBELL JD, MAZZILLI SA, REID ME, DHILLON SS, PLATERO S, BEANE J, SPIRA AE. The Case for a Pre-Cancer Genome Atlas (PCGA). *Cancer Prevention Research* 2016; 9:119-124.

CANON J, REX K, SAIKI AY, *et al.* The clinical KRAS(G12C) inhibitor AMG 510 drives anti-tumour immunity. *Clinical Trial Nature* 2019; 575:217-223.

CAPPER D, PREUSSER M, HABEL A, *et al.* Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta Neuropathol* 2011; 122:11-19.

CARGNELLO M, ROUX PP. Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011; 75:50-83.

CELIKOGLU M, MILOGLU O, KAZANCI F. Frequency of agenesis, impaction, angulation, and related pathologic changes of third molar teeth in orthodontic patients. *J Oral Maxillofac Surg* 2010; 68:990-995.

CHEN Y, LI TJ, GAO Y, YU SF. Ameloblastic fibroma and related lesions: a clinicopathologic study with reference to their nature and interrelationship. *J Oral Pathol Med* 2005; 34:588-595.

CHRCANOVIC BR, GOMEZ RS. Ameloblastic fibro-dentinoma and ameloblastic fibro-odontoma: an updated systematic review of cases reported in the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2017; 75:1425-1437.

CHRCANOVIC BR, BRENNAN PA, RAHIMI S, GOMEZ RS. Ameloblastic fibroma and ameloblastic fibrosarcoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med* 2018; 47:315-325.

CHRETIEN PB, CARPENTER DF, WHITE NS, HARRAH JD, LIGHTBODY PM. Squamous carcinoma arising in a dentigerous cyst. Presentation of a fatal case and review of four previously reported cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1970; 30:809-816.

CHU FCS, LI TKL, LUI VKB, NEWSOME PRH, CHOW RLK, CHEUNG LK. Prevalence of impacted teeth and associated pathologies – a radiographic study of the Hong Kong Chinese population. *Hong Kong Med J* 2003; 9:158–163.

COLBERT S, BRENNAN PA, THEAKER J, EVANS B. Squamous cell carcinoma arising in dentigerous cysts. *J Craniomaxillofac Surg* 2012; 40:355-357.

COȘARCĂ AS, MOCAN SL, PĂCURAR M, FÜLOP E, ORMENIȘAN A. The evaluation of Ki6, p53, MCM3 and PCNA immunoexpressions at the level of dental follicle of impacted teeth, dentigerous cysts and keratocystic odontogenic tumors. *Rom Jmorphol Embryol* 2016; 57:407-412.

COURA BP, BERNARDES VF, DE SOUSA SF, *et al.* KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Modern Pathol* 2019; 32: 799–806.

CURRAN AE, DAMM DD, DRUMMOND JF. Pathologically significant pericoronal lesions in adults: histopathologic evaluation. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60: 613-617.

CURTIUS K, WRIGHT NA, GRAHAM TA. An evolutionary perspective on field cancerization. *Nat Rev Cancer* 2018; 18:19-32.

DACHI SF, HOWELL FV. A survey of 3,874 routine full-mouth radiographs. II. A study of impacted teeth. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1961; 14:1165-1169.

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

DINIZ MG, GOMES CC, GUIMARÃES BV, *et al.* Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumor Biol* 2015; 36:5649–5653.

DINIZ MG, GOMES CC, de SOUSA SF, XAVIER GM, GOMEZ RS. Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol* 2017; 72:165–173.

DOROTHEOU D, GKANTIDIS N, KARAMOLEGKOU M, KALYVAS D, KILIARIDIS S, KITRAKI E. Tooth eruption: altered gene expression in the dental follicle of patients with cleidocranial dysplasia. *Orthod Craniofac Res* 2013; 16: 20-27.

ESTRELLA JS, TETZLAFF MT, BASSETT RL JR, *et al.* Assessment of BRAF V600E status in colorectal carcinoma: tissue-specific discordances between immunohistochemistry and sequencing. *Mol Cancer Ther* 2015; 14:2887-2895.

FADEN DL, ALGAZI A. Durable treatment of ameloblastoma with single agent BRAFi Re: Clinical and radiographic response with combined BRAFtargeted therapy in stage 4 ameloblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2016; 109:djw190.

FELL JB, FISCHER JP, BAER BR, *et al.* Identification of the Clinical Development Candidate MRTX849, a Covalent KRAS G12C Inhibitor for the Treatment of Cancer. *J Med Chem* 2020; 63: 6679-6693.

FERNANDES GS, GIRARDI DM, BERNARDES JPG, FONSECA FP, FREGNANI ER. Clinical benefit and radiological response with BRAF inhibitor in a patient with recurrent ameloblastoma harboring V600E mutation. *BMC Cancer*. 2018; 18:887.

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

GARDNER AF. A survey of odontogenic cysts and their relationship to squamous cell carcinoma. *Dent J* 1975; 49:161–167.

GAY-ESCODA C, CAMPS-FONT O, LÓPEZ-RAMÍREZ M, VIDAL-BEL A. Primary intraosseous squamous cell carcinoma arising in dentigerous cyst: Report of 2 cases and review of the literature. *J Clin Exp Dent* 2015; 7:665-670.

GLOSSER JW, CAMPBELL JH. Pathologic change in soft tissues associated with radiographically “normal” third molar impactions. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1999; 37:259-260.

GOMES CC. Recurrent driver mutations in benign tumors. *Mutat Res Rev Mutat Res* 2022; 789:108412.

GOMES CC, DINIZ MG, GOMEZ RS. Progress towards personalized medicine for ameloblastoma. *J Pathol* 2014; 232:488–91.

GOMES CC, DINIZ MG, de MENEZES GH, CASTRO WH, GOMEZ RS. BRAFV600E mutation in melanotic neuroectodermal tumor of infancy: toward personalized medicine? *Pediatrics* 2015; 136:e267-269.

GOMES CC, de SOUSA SF, de MENEZES GH, *et al.* Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol* 2016; 56:3–5.

GUIMARÃES LM, COURA BP, GOMEZ RS, GOMES CC. The Molecular Pathology of Odontogenic Tumors: Expanding the Spectrum of MAPK Pathway Driven Tumors. *Front Oral Health* 2021; 2:740788.

HAGHANIFAR S, MOUDI E, SEYEDMAJIDI M, *et al.* Can the Follicle-Crown Ratio of the Impacted Third Molars be a Reliable Indicator of Pathologic Problem? *J Dent (Shiraz)* 2014; 15: 187-191.

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

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100:57–70.

HANKEY GT, PEDLER JA. Primary squamous-cell carcinoma of mandible arising from epithelial lining of dental cyst. *Proc R Soc Med* 1957; 50:680-681.

HIRSCHHORN A, CAMPINO GA, VERED M, *et al.* Upfront rational therapy in BRAF V600E mutated pediatric ameloblastoma promotes ad integrum mandibular regeneration. *J Tissue Eng Regen Med.* 2021; 15:1155-1161.

HUNTER JC, GURBANI D, FICARRO SB, *et al.* In situ selectivity profiling and crystal structure of SML-8-73-1, an active site inhibitor of oncogenic K-Ras G12C. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014; 111:8895-900.

IDE F, SHIMOYAMA T, HORIE N, KANEKO T. Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin from reduced enamel epithelium. *J Oral Pathol Med* 1999; 28:420-422.

JEONG W-J, RO EJ, CHOI K-Y. Interaction between Wnt/b-catenin and RASERK pathways and an anti-cancer strategy via degradations of b-catenin and RAS by targeting the Wnt/b-catenin pathway. *NPJ Precis Oncol* 2018; 2:5.

JONASON AS, KUNALA S, PRICE GJ, *et al.* Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; 93:14025-14029.

KATCHBURIAN E, ARANA V. *Histologia e embriologia Oral.* 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KATO S, LIPPMAN SM, FLAHERTY KT, KURZROCK R. The conundrum of genetic "Drivers" in benign conditions. *J Natl Cancer Inst* 2016; 108:djw036.

KAYE FJ, IVEY AM, DRANE WE, MENDENHALL WM, ALLAN RW. Clinical and radiographic response with combined BRAF-targeted therapy in stage 4 ameloblastoma. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 107:378.

KRAMER HS, SCRIBNER JH. Squamous-cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 19:555-561.

KRAMER IR, PINDBORG JJ, SHEAR M. The WHO Histological Typing of Odontogenic Tumours. A commentary on the Second Edition. *Cancer* 1992; 70:2988-2994.

KIM MJ, LEE EJ, CHUN SM, *et al.* Pedunculated serrated polyp with histologic features of sessile serrated adenoma: a clinicopathologic and molecular study. *Am J Surg Pathol* 2013; 37:1039-1043.

KIM S and JEONG S. Mutation Hotspots in the  $\beta$ -Catenin Gene: Lessons from the Human Cancer Genome Databases. *Mol Cells* 2019; 42 : 8-16.

KRIMMEL JD, SCHMITT MW, HARRELL MI, *et al.* Ultra-deep sequencing detects ovarian cancer cells in peritoneal fluid and reveals somatic TP53 mutations in noncancerous tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2016; 113:6005-6010.

KRISHNA M, NARANG H. The complexity of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) made simple. *Cell Mol Life Sci.* 2008; 65:3525-3544.

KUMAR V, ABBAS AK, FAUSTO N. Robbins e Cotran: Patologia: Bases Patológicas das Doenças. 7ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2005. 1568p.



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

LAVOIE H, THERRIEN M. Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2015; 16:281-298.

LAVOIE H, JESSICA GAGNON, MARC THERRIEN. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2020 [epub ahead of print] doi: 10.1038/s41580-020-0255-7.

LAZEBNIK Y. What are the hallmarks of cancer? *Nat Rev Cancer* 2010; 10:232–233.

LEE KW, LOKE SJ. Squamous cell carcinoma arising in a dentigerous cyst. *Cancer* 1967; 20: 2241-2244.

LING G, PERSSON A, BERNE B, UHLÉN M, LUNDEBERG J, PONTEN F. Persistent p53 mutations in single cells from normal human skin. *Am J Pathol* 2001; 159:1247-1253.

LOYOLA AM, CARDOSO SV, de FARIA PR, *et al.* Adenoid ameloblastoma: clinicopathologic description of five cases and systematic review of the current knowledge. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. 2015; 120: 368–377.

LU S, NUSSINOV H, ZHANG J. The Structural Basis of Oncogenic Mutations G12, G13 and Q61 in Small GTPase K-Ras4B. *Sci Rep* 2016; 6:21949.

MANGANARO AM, CROSS SE, STARTZELL JM. Carcinoma arising in a dentigerous cyst with neck metastasis. *Head Neck* 1997; 19:436-439.

MARINO-ENRIQUEZ A, FLETCHER CD. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nat Rev Cancer* 2014; 14:701–702.

MARSHALL CJ. Raf gets it together. *Nature* 1996; 383:127–128.

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

MARTINCORENA I, FOWLER JC, WABIK A, *et al.* Somatic mutant clones colonize the human esophagus with age. *Science* 2018; 362:911-917.

MATSUMOTO Y, MIZOUE K, SETO K. Atypical plexiform ameloblastoma with dentinoid: Adenoid ameloblastoma with dentinoid. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30:251-254.

MEADOW SR. Malignant change in a dental cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1966; 21:282-285.

MELLO FW, MELO G, KAMMER PV, SPEIGHT PM, RIVERO ERC. Prevalence of odontogenic cysts and tumors associated with impacted third molars: A systematic review and meta-analysis. *J Craniomaxillofac Surg* 2019; 47:996-1002.

MENDONZA MC, ER EE, BLENIS J. The Ras-ERK and PI3K-m TOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci* 2011; 36: 320-328.

MENYHÁRD DK, PÁLFY G, ORGOVÁN Z, VIDA I, KESERU GM, PERCZEL A. Structural impact of GTP binding on downstream KRAS signaling. *Chem Sci*. 2020; 11:9272-9289.

MYERS MB, BANDA M, MCKIM KL, WANG Y, POWELL MJ, PARSONS BL. Breast Cancer Heterogeneity Examined by High-Sensitivity Quantification of PIK3CA, KRAS, HRAS, and BRAF Mutations in Normal Breast and Ductal Carcinomas. *Neoplasia* 2016; 18: 253-263.

NAKAZAWA H, ENGLISH D, RANDELL PL, MARTEL N, ARMSTRONG BK, YAMASAKI H. UV and skin cancer: specific p53 gene mutation in normal skin as a biologically relevant exposure measurement. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91:360-364.

NANCI A. Ten Cate histologia oral: desenvolvimento, estrutura e função. 8 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2013.

NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, CHI AC. Patologia Oral &Maxilofacial. 4ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016. p. 601-607.

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

OIKONOMOU E, EVANGELOS KOUSTAS<sup>1</sup>, MARIA GOULIELMAKI<sup>1</sup>, ALEXANDER PINTZAS. BRAF vs RAS oncogenes: are mutations of the same pathway equal? Differential signalling and therapeutic implications. *Oncotarget* 2014; 5:11752-11777.

OSTREM JM, PETERS U, SOS ML, WELLS JA and SHOKAT KM. K-Ras(G12C) inhibitors allosterically control GTP affinity and effector interactions. *Nature* 2013; 503:548-551.

OSTREM JML, SHOKAT KS. Direct small-molecule inhibitors of KRAS: from structural insights to mechanism-based design. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:771-785.

PANNEERSELVAM K, PARAMESWARAN A, KAVITHA B, PANNEERSELVAM E. Primary intraosseous squamous cell carcinoma in a dentigerous cyst. *South Asian J Cancer* 2017; 6:105.

PEREIRA NB, DE SOUZA JC, BASTOS VC, *et al.* Patient-derived xenografts of a case of ameloblastic fibrodentinoma. *Oral Dis* 2019; 25:1229-1233.

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

PHILIPSEN HP, REICHART PA, PRAETORIUS F. Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol* 1997; 33:86-99.

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

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

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

REUTER JA, SPACEK DV, SNYDER MP. High-throughput sequencing Technologies. *Mol Cell* 2015; 58: 586-597.

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

SANTOS JN, SOUSA NETO ES, FRANÇA JA, *et al.* Next-generation sequencing of oncogenes and tumor suppressor genes in odontogenic myxomas. *J Oral Pathol Med* 2017; 46:1036-1039.

SASAKI H, SHIMIZU S, TANI Y, *et al.* Usefulness of immunohistochemistry for the detection of the BRAF V600E mutation in Japanese lung adenocarcinoma. *Lung Cancer* 2013; 82:51-54.

SCHEFFZEK K, AHMADIAN MR, KABSCH W, WIESMÜLLER L, LAUTWEIN A, SCHMITZ F, WITTINGHOFER A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants. *Science* 1997; 277:333-338.

SEKINE S, SATO S, TAKATA T, *et al.* Beta-Catenin mutations are frequent in calcifying odontogenic cysts, but rare in ameloblastomas. *Am J Pathol* 2003; 163: 1707-1712.

SHI HA, NG CWB, KWA CT, SIM QXC. Ameloblastoma: A succinct review of the classification, genetic understanding and novel molecular targeted therapies. *Surgeon* 2020; S1479-666X: 30081-0.

SIRIWARDENA BSMS, KUDO Y, OGAWA I, TILAKARATNE WM, TAKATA T. Aberrant beta-catenin expression and adenomatous polyposis coli gene mutation in ameloblastoma and odontogenic carcinoma. *Oral Oncol* 2009; 45:103-8.

SLATER LJ. Comments on "Pathologic changes in the soft tissues associated with asymptomatic impacted third molars". *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009; 107:5.

SLOOTWEG PJ. An analysis of the interrelationship of the mixed odontogenic tumors-ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and the odontomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981; 51:266-276.

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

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

SOUSA SF, DINIZ MG, FRANÇA JA, *et al.* Cancer genes mutation profiling in calcifying epithelial odontogenic tumour. *J Clin Pathol* 2018; 71: 279-283.

STANLEY HR, KROGH H, PANNKUK E. Age changes in the epithelial components of follicles (dental sacs) associated with impacted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1965; 19:128-139.

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

TAKATA T, SLOOTWEG PJ. Introduction. In: El-Naggar A, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon, France: IARC, 2017. p. 215-226.

TAKEDA Y. Ameloblastic fibroma and related lesions: current pathologic concept. *Oral Oncol* 1999; 35:535-540.

TAN S, POLLACK JR, KAPLAN MJ, COLEVAS AD, WEST RB. BRAF. Inhibitor treatment of primary BRAF-mutant ameloblastoma with pathologic assessment of response. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016; 122:e5–7.

THAVARAJ S, BILODEAU EA. Adenoid Ameloblastoma. In: WHO Classification of Tumours Editorial Board. Head and neck tumours (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 9) [Internet; beta version ahead of print], 5th edn. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer, 2022, [cited 2022 June 07]. Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/52>.

WHO Classification of Tumours Head and neck tumours Editorial Board. Head and neck tumours [Internet; beta version ahead of print]. Lyon (France): International Agency for Research on Cancer; 2022 [cited 2022 cited 2022 June 07]. (WHO classification of tumours series, 5th ed.; vol. 9). Available from: <https://tumourclassification.iarc.who.int/chapters/52>.

THIEL A, MOZA M, KYTÖLA S, *et al.* Prospective immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in melanoma. *Hum Pathol* 2015; 46:169-175.

TOMASETTI C, VOGELSTEIN B, PARMIGIANI G. Half or more of the somatic mutations in cancers of self-renewing tissues originate prior to tumor initiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2013; 110:1999-2004.

TOMICHE CE. Benign mixed odontogenic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1999; 16:308-316.

UGUEN A, TALAGAS M, COSTA S, *et al.* NRAS (Q61R), BRAF (V600E) immunohistochemistry: a concomitant tool for mutation screening in melanomas. *Diagn pathol* 2015; 10:121.

VANELLA V, FESTINO L, TROJANIELLO C, *et al.* The role of BRAF-targeted therapy for advanced melanoma in the immunotherapy era. *Curr Oncol Rep.* 2019; 21:76.

VERED M, WRIGHT JM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumours. *Head Neck Pathol* 2022; 16:63-75.

ZENG M, XIONG Y, SAFAEE N, *et al.* Exploring Targeted Degradation Strategy for Oncogenic KRAS G12C. *Cell Chem Biol* 2020; 27:19-31.e6

ZHANG Y, PIZZUTE T, PEI M. A review of crosstalk between MAPK and Wnt signals and its impact on cartilage regeneration. *Cell Tissue Res.* 2014; 358:633–49.

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

ZLOTOGORSKI-HURVITZ A, SOLUK TEKKEŞİN M, PASSADOR-SANTOS F, *et al.* Conceptual changes in ameloblastoma: suggested reclassification of a“veteran” tumor. *Oral Dis.* 2022; 28:703-710.

WALDRON CA, MUSTOE TA. Primary intraosseous carcinoma of the mandible with probable origin in an odontogenic cyst. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1989; 67:716-724.

WELLBROCK C, KARASARIDES M, MARAIS R. The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5:875-885.

WIDMANN C, GIBSON S, JARPE MB, JOHNSON GL. Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999; 79:143-80.

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

WILLIAMS IE, NEWMAN CW. Squamous-cell carcinoma associated with a dentigerous cyst of the maxilla: review and report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1963; 16:1012-1016.

YILDIRIM G, ATAÖĞLU H, MIHMANLI A, KIZILOĞLU D, AVUNDUK MC. Pathologic changes in soft tissues associated with asymptomatic impacted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2008; 106:14-18.

YOHE S, THYAGARAJAN B. Review of Clinical Next-Generation Sequencing. *Arch Pathol Lab Med* 2017; 141: 1544- 1557.

YOU Z, XU LL, LI XF, ZHANG JY, DU J, SUN LS. BRAF gene mutations in ameloblastic fibromas. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2019; 51:4-8

YOU Z, LIU SP, DU J, WU YH, ZHANG SZ. Advancements in MAPK signaling pathways and MAPK-targeted therapies for ameloblastoma: A review. *J Oral Pathol Med* 2019; 48: 201-205.

YOUNG AL, CHALLEN GA, BIRMANN BM, DRULEY TE. Clonal haematopoiesis harbouring AML-associated mutations is ubiquitous in healthy adults. *Nat Commun* 2016; 7:12484.

YUKIMORI A, OIKAWA Y, MORITA K, *et al.* Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors. *PLoS One* 2017; 28: e0180224.

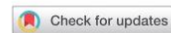
## APÊNDICES

APÊNDICE A: Artigo científico que apresenta os resultados deste trabalho referentes às análises em tumores odontogênicos mistos.

The Journal of Molecular Diagnostics, Vol. 22, No. 12, December 2020



# Targeted Next-Generation Sequencing and Allele-Specific Quantitative PCR of Laser Capture Microdissected Samples Uncover Molecular Differences in Mixed Odontogenic Tumors



Bruna Pizzolo Coura,<sup>\*</sup> Vanessa Fátima Bernardes,<sup>\*</sup> Sílvia Ferreira de Sousa,<sup>†</sup> Marina Gonçalves Diniz,<sup>†</sup> Rennan Garcias Moreira,<sup>‡</sup> Bruno Augusto Benevenuto de Andrade,<sup>§</sup> Mario José Romañach,<sup>§</sup> Helder Antônio Rebelo Pontes,<sup>¶</sup> Ricardo Santiago Gomez,<sup>‡</sup> Edward William Odell,<sup>||</sup> and Carolina Cavalieri Gomes<sup>\*</sup>

From the Department of Pathology<sup>\*</sup> and the Center of Multi-Users Laboratories—Genomics Laboratory,<sup>†</sup> Biological Sciences Institute, and the Department of Oral Surgery and Pathology,<sup>‡</sup> School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil; the Department of Oral Diagnosis and Pathology,<sup>§</sup> Dental School, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil; the Service of Oral Pathology,<sup>¶</sup> João de Barros Barreto University Hospital, Universidade Federal do Pará (UFPA), Belém, Brazil; and Head and Neck Pathology,<sup>||</sup> King's College London, Guy's Hospital, London, United Kingdom

Accepted for publication  
August 27, 2020.

Address correspondence to Carolina Cavalieri Gomes, D.D.S., Ph.D., Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 – Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil; or Edward William Odell, F.D.S.R.C.S., Ph.D., F.R.C.Path., Head and Neck Pathology, King's College London, Guy's Hospital, 4th Floor Tower Wing, Great Maze Pond, London SE1 9RT, United Kingdom. E-mail: carolinacgomes@ufmg.br or edward.odell@kcl.ac.uk.

The molecular pathogenesis of mixed odontogenic tumors has not been established, and understanding their genetic basis could refine their classification and help define molecular markers for diagnostic purposes. Potentially pathogenic mutations in the component tissues of 28 cases of mixed odontogenic tumors were assessed. Laser capture microdissected tissue from 10 ameloblastic fibromas (AF), 4 ameloblastic fibrodentinomas (AFD), 6 ameloblastic fibro-odontomas (AFO), 3 ameloblastic fibrosarcomas (AFS), and 5 odontomas (OD) were screened by next-generation sequencing and results confirmed by TaqMan allele-specific quantitative PCR. *BRAF* p.V600E mutation in the mesenchymal component was shown in 4 of 10 AF (40%), 2 of 4 AFD (50%), 2 of 6 AFO (33%), and 2 of 3 AFS (67%), whereas all 5 OD were wild type for *BRAF* p.V600E. Mutation in the epithelial component was only observed in one AF and one AFO. One AFS contained an area of benign AF, and the mesenchymal component of both (AFS and AF) contained *BRAF* p.V600E, supporting the concept of malignant progression from a benign AF precursor. *KDR*, *TP53*, *KIT*, and *PIK3CA* single-nucleotide polymorphisms are reported. In conclusion, AF, AFD, AFO, and AFS show *BRAF* p.V600E in their mesenchymal component, unlike OD, which are *BRAF* wild type, suggesting that at least a subset of AF, AFD, and AFO are molecularly distinct from OD, and may represent distinct entities and be neoplastic. (*J Mol Diagn* 2020, 22: 1393–1399; <https://doi.org/10.1016/j.jmoldx.2020.08.005>)

Odontogenic tumors are difficult to classify, and there are few molecular data to aid diagnosis or help categorize them. They show a broad range of appearances linked to the complex developmental processes in normal teeth, during which iterative epithelial–mesenchymal interactions control tissue differentiation, induce hard tissue formation, and determine the shape and size of teeth.<sup>1,2</sup> Odontogenic

B.P.C. and V.F.B. contributed equally to this work.

Supported by grants from the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG/Brazil, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Finance code 001)/Brazil, The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil, and the Pró-Reitoria de Pesquisa (PRPq) da Universidade Federal de Minas Gerais.

Disclosures: B.P.C., R.S.G., and C.C.G. are research fellows at CNPq.

tumors include malignant and benign neoplasms and hamartomas. Ameloblastic fibroma (AF) is considered a benign neoplasm of both its epithelial and mesenchymal components that is sometimes a precursor to ameloblastic fibrosarcoma.<sup>3</sup> By contrast, odontomas (OD) are hamartomas. Histologically intermediate between these defined entities is a group of poorly characterized tumors, the ameloblastic fibrodentinoma (AFD) and ameloblastic fibro-odontoma (AFO),<sup>4,5</sup> whose status has been long debated.<sup>5–10</sup> The 2017 World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors considered that AFD and AFO should be classified as the early stages of OD<sup>4,11,12</sup> to prevent overtreatment.

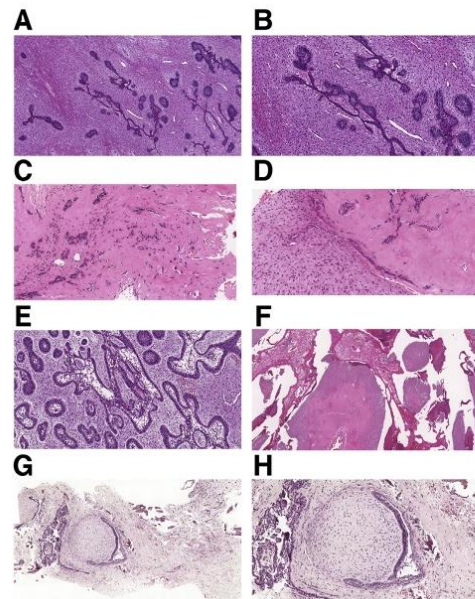
Recently, the *BRAF* p.V600E mutation was reported in AF,<sup>13–15</sup> AFO,<sup>14</sup> one case of AFD,<sup>13</sup> and in five of seven AFS,<sup>16</sup> but it is not known whether epithelium or mesenchyme are altered in each tumor type and whether all share the same molecular profile. Only one study to date has used laser capture microdissection (LCM) to dissect the mesenchymal component in equivocal cases of a total of three AFO and one AF,<sup>14</sup> and it remains unknown whether there may be other genetic drivers in these lesions, as next-generation sequencing (NGS) assays have only been applied to AFS.<sup>16</sup>

The study aimed to interrogate a large discovery cohort of mixed odontogenic tumors for hotspot mutations in 50 commonly mutated tumor suppressor genes and oncogenes by NGS. The *BRAF* p.V600E mutational status in LCM separated epithelial and mesenchymal components was then assessed by quantitative PCR (qPCR) in a validation cohort.

## Materials and Methods

### Discovery Cohort

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (protocol number CAAE 30556120.0.0000.5149). Formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) samples were selected from the oral pathology files of the authors' institutions (Universidade Federal de Minas Gerais, Universidade Federal do Rio de Janeiro, and Universidade Federal do Pará, Brazil; and King's College London, UK), with the exception of AF1, which was freshly collected and snap frozen at Universidade Federal de Minas Gerais, Brazil. Cases were selected and diagnoses were reviewed on the basis of pathologic, clinical, and radiological features. The diagnosis of the cases of each institution was reviewed and confirmed by oral pathologist coauthors of this study (B.A.B.d.A., M.J.R., H.A.R.P., R.S.G., and E.W.O.), and all diagnoses were additionally reviewed by an oral pathologist of the institution where the experiments were performed (R.S.G. and C.C.G.). The histopathologic features of the mixed odontogenic tumors included in the study are illustrated in Figures 1 and 2. Although previous



**Figure 1** Histopathologic features of mixed odontogenic tumors and odontomas. Representative images of ameloblastic fibroma (A and B), ameloblastic fibrodentinoma (AFD) (C and D), ameloblastic fibro-odontoma (AFO) (E and F), and odontoma (G and H) are shown. This group of tumors exhibits nests and cords of odontogenic epithelium supported by a cell-rich connective tissue of ectomesenchymal origin (A–E). Mineralized product areas resembling dentinoid matrix are present in the AFD (C and D) and AFO (F) cases, and basophilic areas compatible with enamel matrix (F). E and F: The soft and hard components of an AFO case. G and H: Enamel organ-like organization lies adjacent to cellular dental papilla-like tissue, and basophilic areas of mineralized material compatible with enamel matrix can also be observed in the odontoma sample. Hematoxylin and eosin staining was used. Original magnification:  $\times 50$  (A and G);  $\times 100$  (F);  $\times 200$  (B, C, E, and H);  $\times 400$  (D).

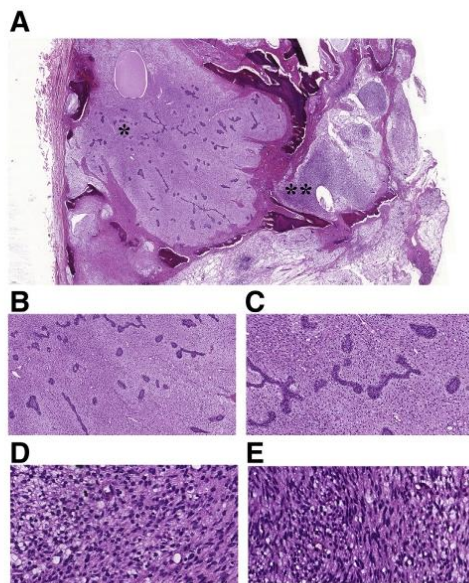
studies have been able to detect *BRAF* p.V600E mutation in decalcified ameloblastomas and AFS,<sup>16,17</sup> undecalcified tissue blocks were selected for all cases, including all OD, for NGS and qPCR.

A convenience sample of 11 mixed odontogenic tumors was obtained and used as a discovery cohort for molecular assessment by NGS. The DNA and libraries of four mixed odontogenic tumors, including three AF samples, and one AFD tumor sample, passed the quality control, and their sequencing results were included in the study.

### DNA Isolation

Genomic DNA was isolated using a commercially available kit, QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germany) in FFPE samples, and DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen) in fresh tissue, according to the manufacturer's





**Figure 2** Histopathologic features of an ameloblastic fibrosarcoma. **A:** Sample AFS1 showed a residual area of ameloblastic fibroma (AF) (asterisk) in addition to the malignant tumor area (double asterisk). **B and C:** The benign area reveals epithelium and mesenchymal components consistent with AF-like area. **D and E:** The sarcomatous part of the tumor showed high cellularity with hyperchromatic nuclei, cellular atypia, and mitotic figures. Hematoxylin and eosin staining was used. Original magnification:  $\times 50$  (**A** and **B**);  $\times 100$  (**C**);  $\times 200$  (**D**);  $\times 400$  (**E**).

recommendations. Genomic DNA quality was quantified and assessed using a Qubit 3.0 Fluorometer (Life Technologies, Carlsbad, CA) and spectrophotometry (NanoDrop 2000; Thermo Fisher Scientific, Wilmington, DE).

#### Targeted NGS

Ion AmpliSeq Cancer Hotspot Panel v2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was used to interrogate 2856 COSMIC (Catalog of Somatic Mutations in Cancer, <https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic>, last accessed July 15, 2020) hotspot mutations in a panel of 50 oncogenes and tumor suppressor genes, with successful results in three AF and one AFD samples. This panel includes several MAPK pathway genes, among others listed hereafter: *ABLI*, *AKT1*, *ALK*, *APC*, *ATM*, *BRAF*, *CDH1*, *CDKN2A*, *CSF1R*, *CTNNB1*, *EGFR*, *ERBB2*, *ERBB4*, *EZH2*, *FBXW7*, *FGFR1*, *FGFR2*, *FGFR3*, *FLT3*, *GNA11*, *GNAQ*, *GNAS*, *HNFA1A*, *HRAS*, *IDH1*, *IDH2*, *JAK2*, *JAK3*, *KDR*, *KIT*, *KRAS*, *MET*, *MLH1*, *MPL*, *NOTCH1*, *NPM1*, *NRAS*, *PDGFRA*, *PIK3CA*, *PTEN*, *PTPN11*, *RBI*, *RET*, *SMAD4*, *SMARCB1*, *SMO*, *SRC*, *STK11*, *TP53*, and *VHL*. The DNA libraries were prepared using Ion AmpliSeq Library

Kit 2.0 (Thermo Fisher Scientific) and Ion Xpress Barcode Adapters 1-16 Kit (Thermo Fisher Scientific) was used to pool samples in the same sequencing run. Each library was individually purified using Agencourt AMPure XP beads (Beckman Coulter, Indianapolis, IN) and quantified by qPCR with the Ion Library TaqMan Quantitation Kit (Thermo Fisher Scientific). The libraries underwent emulsion PCR and Ion Sphere enrichment using the Ion OneTouch 2 System (Thermo Fisher Scientific). Sequencing was performed on Ion 316 Chip Kit v2 (Thermo Fisher Scientific) using the Ion Torrent PGM system (Thermo Fisher Scientific).

#### Bioinformatics Analysis

The sequences were aligned to the human genome reference (hg19) and Ion Reporter Software version 5.2 (Thermo Fisher Scientific) was used to filter and report variants. Missense and INDEL variants with sequencing depth  $>300$  and frequency  $>5\%$  were filtered. The software Integrative Genomics Viewer version 2.3 (Broad Institute, Cambridge, MA) was used to exclude false variants by checking the alignments manually. *In silico* analysis to predict the variants pathogenicity/effect on protein was performed using ClinVar (ClinVar, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar>, last accessed July 15, 2020), SIFT (SIFT, <http://sift-dna.org>, last accessed July 15, 2020), and PolyPhen-2 (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>, last accessed July 15, 2020). The variants selected for further validation were those that fit the criteria described above and that were reported as pathogenic at ClinVar or classified as damaging and nontolerated by SIFT and PolyPhen-2 scores.

#### Validation Cohort

To validate the NGS results by an independent method, the four successfully sequenced samples of the discovery cohort were also submitted to allele-specific qPCR (validation cohort  $n = 4$ ) and an additional 28 mixed odontogenic tumor cases were selected from the same sources following the same diagnostic criteria specified for the discovery cohort section. These expanded the validation cohort to a total of 32 samples. Four expansion cohort samples failed qPCR amplification, so that the final validation cohort comprised 28 cases, 10 AF, 4 AFD, 6 AFO, 3 AFS, and 5 OD (Table 1).

#### Laser Capture Microdissection

LCM was performed on 22 of the 28 validation samples, two AF and one AFD ( $n = 3$ ) from the validation cohort and seven AF, three AFD, six AFO, and three AFS from the expansion cohort ( $n = 19$ ) (Table 1). LCM was performed on a MMI CellCut system with MMI CellTools control software version 4.0.7 RC2 (MMI Molecular

**Table 1** Clinical and Molecular Information of Mixed Odontogenic Tumor Cases

Sample	Clinical information			BRAF p.V600E status/tumor histopathologic component			
	Age, years	Sex	Location	Bulk, not LCM	Epithelial	Mesenchymal	Malignant mesenchymal
Ameloblastic fibroma							
AF1*	23	F	Mandible, posterior	Mutant*	NA	NA	NA
AF2*	5	M	Maxilla, posterior	Mutant*	Mutant	Mutant	NA
AF3	14	F	Mandible, anterior	NA	Un	Mutant	NA
AF4	6	F	Mandible, body and ramus	NA	Un	Mutant	NA
AF5	12	F	Mandible, body and ramus	NA	Wild-type	Wild-type	NA
AF6	12	M	Mandible, posterior	NA	Wild-type	Wild-type	NA
AF7	9	M	Mandible, body and ramus	NA	Un	Wild-type	NA
AF8	3	M	Mandible, body and ramus	NA	Un	Wild-type	NA
AF9*	7	F	Mandible, body and ramus	Wild-type*	Wild-type	Wild-type	NA
AF10	14	F	Mandible, posterior	NA	Wild-type	Un	NA
Ameloblastic fibrodentinoma							
AFD1 <sup>†</sup>	23	F	Mandible, body and ramus	NA	Wild-type	Mutant	NA
AFD2	8	F	Mandible, posterior	NA	Wild-type	Mutant	NA
AFD3	11	M	Maxilla, posterior	NA	Wild-type	Un	NA
AFD4*	9	M	Maxilla, anterior	Wild-type*	Wild-type	Wild-type	NA
Ameloblastic fibro-odontoma							
AF01	9	M	Mandible, premolar region	NA	Wild-type	Mutant	NA
AF02	10	F	Maxilla, posterior	NA	Mutant	Mutant	NA
AF03	23	M	Maxilla, posterior	NA	Wild-type	Wild-type	NA
AF04	9	M	Mandible, posterior	NA	Wild-type	Wild-type	NA
AF05	16	M	Mandible, body and ramus	NA	Wild-type	Wild-type	NA
AF06 <sup>†</sup>	14	M	Mandible, posterior	NA	Wild-type	Wild-type	NA
Ameloblastic fibrosarcoma							
AFS1	14	F	Mandible, anterior and body	NA	Wild-type	Mutant	Mutant
AFS2	32	F	Mandible, posterior	NA	Wild-type	NA	Mutant
AFS3	25	M	Mandible, posterior	NA	Un	NA	Wild-type
Odontoma							
OD1	14	M	Maxilla	Wild-type	NA	NA	NA
OD2	14	F	Mandible	Wild-type	NA	NA	NA
OD3	12	M	Mandible	Wild-type	NA	NA	NA
OD4	15	F	Mandible	Wild-type	NA	NA	NA
OD5	14	F	Mandible	Wild-type	NA	NA	NA

\*Samples were bulk sequenced by next-generation sequencing, and the mutation was assessed/confirmed by quantitative PCR.

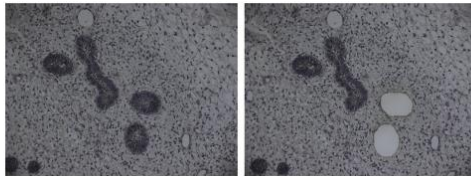
<sup>†</sup>Incisional and excisional biopsies of these cases have been evaluated with concordant results.

F, female; M, male; NA, not applicable or not tested; Un, uninterpretable, the amplification either occurred in a high threshold cycle or there was no amplification.

Machines & Industries, Tokyo, Japan) and an optical microscope. By using LCM, the epithelial and mesenchymal components were separated for analysis (Figure 3) and collected in separate sterile plastic tube caps. Notably, one AFS sample (AFS1) contained a precursor area of AF in addition to the malignant tumor area (Figure 2) and had three different components isolated by LCM: epithelial and mesenchymal tissues of the AF area and the mesenchymal sarcomatous component. Genomic DNA of all materials submitted to LCM was isolated separately for further molecular analyses.

#### BRAF p.V600E Mutation Detection by Allele-Specific qPCR

The only pathogenic variant detected by NGS was *BRAF* p.V600E, and this mutation was interrogated in the LCM mixed odontogenic tumor tissue samples as well as in OD cases. The *BRAF* p.V600E mutation was screened using *BRAF\_476\_mu* and *BRAF\_rf* assays (Applied Biosystems, Foster City, CA), following the manufacturer's instructions. This assay is highly specific and sensitive (sensitivity of 0.1%) and can detect very low levels of mutated DNA in a



**Figure 3** Laser capture microdissection (LCM) was used to isolate tumor epithelial cells (shown) from tumor mesenchymal cells, which were collected into separate tubes. Original magnification,  $\times 200$ .

background of wild-type DNA. Reactions were run on a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems), and the mutation status was determined using TaqMan Mutation Detector Software version 2.0 (Life Technologies). Sample components (epithelial or mesenchymal) that failed amplification twice or amplified at a threshold cycle above the cutoff were excluded from analysis.

**Results**

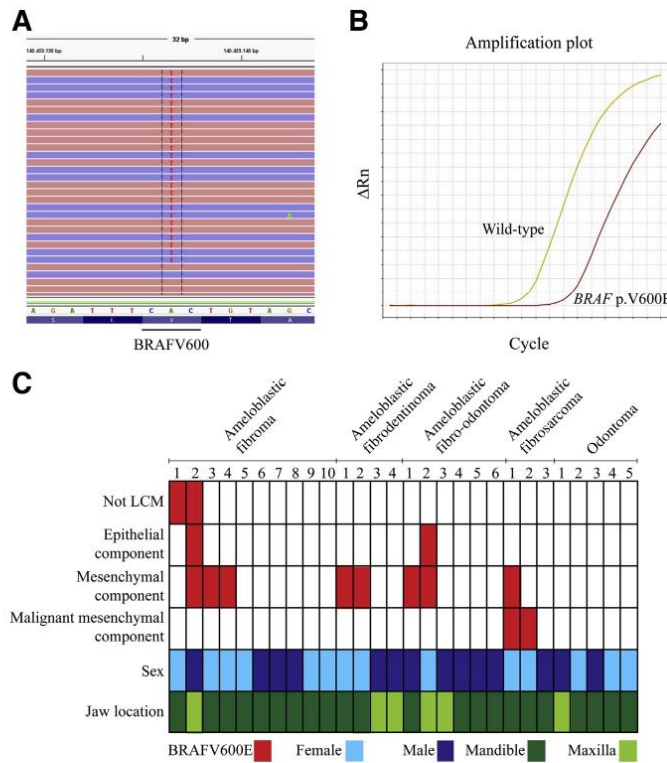
**Sample Characterization**

Twenty-eight mixed odontogenic tumors were included in the final analyses, because genomic DNA from one AF,

one AFD, and two OD cases failed qPCR amplification twice and were excluded. There was an equal number of female and male patients ( $n = 14$  each), and tumors arose most often in the mandible ( $n = 22$ ), with a few cases in the maxilla ( $n = 6$ ). Clinicopathologic data for each sample and the molecular results are shown in **Table 1** and **Figure 4**.

**Next-Generation Sequencing**

Of the 11 cases included in the discovery cohort, 4 were successfully sequenced by NGS, and 7 failed. In the four samples successfully sequenced, a total of five missense single-nucleotide variants sequenced at high depth ( $>300\times$ ) with a frequency  $>5\%$  was identified. *BRAF* c.1799T>A leading to p.V600E, an activating mutation in exon 15, predicted *in silico* as a pathogenic mutation, was reported in two of three AF (samples AF1 and AF2) (**Table 1** and **Figure 4**). The other four single-nucleotide variants reported in this cohort were single-nucleotide polymorphisms: *KDR* p.Gln472His was reported in one of three AF and in the AFD; *TP53* p.Pro72Arg was reported in one of three AF and in the AFD; *KIT* p.Met541Leu and *PIK3CA* p.Ile391Met were reported in the AFD.



**Figure 4** Mutation detection representative results and main clinical and molecular results. **A:** Integrative Genomic Viewer screenshot from the *BRAF* exon 15 negative strand alignment showing T>A substitution at position c.1799, leading to *BRAF* p.V600E mutation. **B:** The *BRAF* mutation identified by NGS was confirmed using TaqMan allele-specific quantitative PCR, and mutant allele amplification can be observed. **C:** *BRAF* p.V600E mutation and clinical information of the mixed odontogenic tumor samples.  $\Delta Rn$ , delta normalized reporter.

### *BRAF* p.V600E Mutation Detection by Allele-Specific qPCR

Table 1 shows the mutation status for each individual sample and for each tissue component of the mixed odontogenic tumor cases. In the validation cohort, the presence of the *BRAF* p.V600E mutation was assessed by allele-specific qPCR in the four samples successfully sequenced by NGS and confirmed in the two AF samples in which the mutation was originally detected (samples AF1 and AF2). Considering the results of the final validation cohort, *BRAF* p.V600E mutation was detected in a total of 4 of 10 AF (40%), 2 of 4 AFD (50%), 2 of 6 AFO (33%), and 2 of 3 AFS (67%) cases, whereas all 5 OD samples were wild type for the *BRAF* p.V600E mutation. The mutation was detected in the mesenchymal component of all mutant cases, but it was also detected in the epithelial component of one case of AF and one case of AFO. The incisional and excisional biopsies of one AFD case (AFD1) and one AFO (AFO6) were tested and showed concordant results. Interestingly, the AFS1 case presenting an AF-like area revealed *BRAF* p.V600E positivity in the mesenchymal component of both the sarcomatous and benign regions of the tumor. The mean ages of the mutant and wild-type cases were similar.

### Discussion

The molecular pathogenesis of mixed odontogenic tumors has been poorly explored<sup>13–16,18,19</sup>. A high frequency of *BRAF* p.V600E pathogenic mutation has been reported in mixed odontogenic tumors, in 57% (4/7) of AF from two studies,<sup>13,14</sup> and a third study written in Chinese reported mutation in 16 of 16 AF cases in the abstract.<sup>15</sup> Also, 33% (6/18) of AFO<sup>14</sup> and 71% (5/7) of AFS<sup>16</sup> cases have been reported to harbor the *BRAF* mutation. Notably, the *NRAS* p.Q61K mutation was detected in one AFS wild-type for *BRAF* p.V600E.<sup>16</sup> Mixed odontogenic tumors have epithelial and mesenchymal components, and LCM is necessary to identify the component bearing the mutation. However, it has been used on only a few samples and in only one study.<sup>14</sup> The results of the discovery cohort in the current study suggest that *BRAF* p.V600E may be the only potential driver mutation and is present in the same tissue component within each tumor type. The *BRAF* p.V600E mutation was found in 40% (4/10) AF, 33% (2/6) AFO, and 67% (2/3) AFS, in line with the results of previous studies.<sup>13–16</sup> Additionally, the *BRAF* mutation has been previously investigated in only one case of AFD,<sup>13</sup> and in the current study, the authors report such mutation in 50% (2/4) of AFD cases studied.

The authors have found *BRAF* mutation to be limited to the mesenchymal component of seven of the nine mutation-positive tumors subjected to LCM. The mutation in the epithelial component was limited to one AF and one AFO cases. It appears probable that the apparent epithelial

mutation result could be accounted for by contamination with mesenchymal tissue and the high sensitivity of the qPCR assay. In both of these cases, the mutation was also found in the mesenchymal component. These results are different from those of Brunner et al,<sup>14</sup> who reported that the mesenchymal component of one AF and three AFO cases with known positivity for *BRAF* p.V600E was wild type for *BRAF*. The authors attribute this difference to the fact that LCM was used in association with a highly sensitive mutation detection assay and that not all cases in the previous study were subject to LCM.

Notably, both LCM AFS mutation-positive samples had the *BRAF* p.V600E mutation in only the mesenchymal component. Case AFS1 showed the mutation in both the benign mesenchymal component of the AF-like area and in the sarcomatous areas of the tumor. This study's results reinforce the reported malignant transformation from a pre-existing AF.<sup>4,20</sup> Recently, *BRAF* p.V600E mutation was detected in both tumor components of one AFS, but immunohistochemistry using VE1 antibody showed mutation in the mesenchymal component only. Agaimy et al<sup>16</sup> speculating that there may have been cross contamination between tissue component samples because LCM was not used. This question has been answered by our LCM experiments which support their immunohistochemical results<sup>16</sup> suggesting that only the mesenchymal component harbors *BRAF* mutation. Additionally, this study's results confirm the long-held view that mixed odontogenic tumor growth is driven by the mesenchymal component and is concordant with the histopathologic features of the AFS, in which only the mesenchymal component appears malignant. Because both AF and AFS harbored the *BRAF* p.V600E mutation in the mesenchymal component, malignant transformation must be driven by other oncogenic stimuli.

The histologic appearances of AFO and AFD are indistinguishable from those of odontomas in their early stages, so that their status as a separate tumor entity has been debated over the years.<sup>4–11</sup> In the last World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors, AFD and AFO were not included as separate entities.<sup>4</sup> Retrospective studies analyzing the clinical data of mixed odontogenic tumors do not support the progressive maturation theory of mixed odontogenic tumors to OD.<sup>8–10</sup> However, coming to a conclusion on this issue is challenging, and there is no definitive evidence to support this assumption. In the present study, the included cases had clinicoradiological features more suggestive of the diagnosis of true mixed odontogenic tumors, reaching a significant size. The *BRAF* mutation was detected in these mixed odontogenic tumors but was absent in all the OD cases studied. In a previous study by the authors' group,<sup>21</sup> the development of a recurrent AFD case (that did not previously show maturation after 6 years) was evaluated using a patient-derived xenograft model. The patient-derived xenograft model was followed for 250 days, and it was observed to be tumorigenic and maintain morphologic characteristics of the primary tumor and MAPK

pathway activation, together with cell proliferation activity similar to the human tumor.<sup>21</sup> Taking together the molecular data and the above described results, the authors conclude that at least a subset of those lesions diagnosed as AF, AFD, and AFO are molecularly distinct from OD, which does not support the assumption that these subsets represent progressive stages of odontoma development and suggests they should not be grouped together.

Though the study data appear consistent, the study has limitations that should be appreciated. First, several discovery cohort samples, which were from FFPE tissue, did not pass sequencing quality control, resulting in only four samples being successfully sequenced by NGS sequencing. The targeted NGS panel included 50 oncogenes and tumor suppressor genes. Though these are commonly mutated in human neoplasms, mutations in other genes could have been missed, and the number of samples is relatively low.

In conclusion, although OD during their development mimic mixed odontogenic tumors histologically, at least a subset of AF, AFD, and AFO show a clear molecular profile with *BRAF* p.V600E in their mesenchymal components. This is distinct from OD, which are *BRAF* wild type. This suggests that at least a subset of AF, AFD, and AFO may be distinct pathologic entities and that at least some AFD and AFO may be neoplastic. Additionally, the molecular findings of this study strengthen the notion that malignant transformation of AF may be predisposed by the presence of the *BRAF* p.V600E mutation in the mesenchymal component and support the long-held view that mixed odontogenic tumor growth is driven by the mesenchymal component.

### Acknowledgments

We thank the Genomics Multi-User Laboratory (Centro de Laboratórios Multiusuários, ICB/Universidade Federal de Minas Gerais) for providing support on the next-generation sequencing, and Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI – ICB/Universidade Federal de Minas Gerais) for the scanner service of histologic slides and for providing the equipment to perform laser capture microdissection.

### Author Contributions

R.S.G., E.W.O., and C.C.G. conceived the study; B.P.C., V.F.B., S.F.d.S., M.G.D., R.G.M., and C.C.G. performed the experiments and analyzed the data; B.A.B.d.A., M.J.R., H.A.R.P., R.S.G., and E.W.O. obtained samples and data; B.P.C., V.F.B., M.G.D., R.S.G., and C.C.G. prepared the figures; B.P.C., V.F.B., and C.C.G., wrote the manuscript; R.S.G. and E.W.O. critically revised the manuscript; all authors have read and approved the final version of the manuscript; all authors gave their final approval and agreed to be accountable for all aspects of the work.

### References

- Lumsden AG: Spatial organization of the epithelium and the role of neural crest cells in the initiation of the mammalian tooth germ. *Development* 1988, 103 Suppl:155–169
- Miletich I, Sharpe PT: Normal and abnormal dental development. *Hum Mol Genet* 2003, 12 Spec No 1:R69–R73
- Lai J, Blanas N, Higgins K, Klieb H: Ameloblastic fibrosarcoma: report of a case, study of immunophenotype, and comprehensive review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2012, 70:2007–2012
- Takata T, Slootweg PJ: Benign mixed epithelial and mesenchymal odontogenic tumors. Edited by El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumors, ed 4. Lyon, France: IARC, 2017. pp. 222–226
- Slootweg PJ: An analysis of the interrelationship of the mixed odontogenic tumors-ameloblastic fibroma, ameloblastic fibro-odontoma, and the odontomas. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1981, 51:266–276
- Philipsen HP, Reichart PA, Praetorius F: Mixed odontogenic tumours and odontomas. Considerations on interrelationship. Review of the literature and presentation of 134 new cases of odontomas. *Oral Oncol* 1997, 33:86–99
- Tomich CE: Benign mixed odontogenic tumors. *Semin Diagn Pathol* 1999, 16:308–316
- Chen Y, Li T-J, Gao Y, Yu S-F: Ameloblastic fibroma and related lesions: a clinicopathologic study with reference to their nature and interrelationship. *J Oral Pathol Med* 2005, 34:588–595
- Buchner A, Kaffe I, Vered M: Clinical and radiological profile of ameloblastic fibro-odontoma: an update on an uncommon odontogenic tumor based on a critical analysis of 114 cases. *Head Neck Pathol* 2013, 7:54–63
- Chrcanovic BR, Gomez RS: Ameloblastic fibrodentinioma and ameloblastic fibro-odontoma: an updated systematic review of cases reported in the literature. *J Oral Maxillofac Surg* 2017, 75:1425–1437
- Speight PM, Takata T: New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. *Virchows Arch* 2018, 472:331–339
- Mosqueda-Taylor A: New findings and controversies in odontogenic tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008, 13:E555–E558
- Brown NA, Rolland D, Mchugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS1, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL: Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res* 2014, 20:5517–5526
- Brunner P, Bihl M, Jundt G, Baumhoer D, Hoeller S: BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. *Oral Oncol* 2015, 51:e77–e78
- You Z, Xu LL, Li XF, Zhang JY, DU J, Sun LS: [BRAF gene mutations in ameloblastic fibromas] Chinese. *Beijing Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban* 2019, 51:4–8
- Agaimy A, Skalova A, Franchi A, Alshagroud R, Gill AJ, Stoehr R, Baumhoer D, Bauer S: Ameloblastic fibrosarcoma: clinicopathological and molecular analysis of seven cases highlighting frequent BRAF and occasional NRAS mutations. *Histopathology* 2020, 76:814–821
- Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, Ristimäki A, Ruhin B, Kellokoski J, Elenius K, Heikinheimo K: High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol* 2014, 232:492–498
- Bernardes VF, Gomes CC, Gomez RS: Molecular investigation of ameloblastic fibroma: how far have we gone? *Head Neck Oncol* 2012, 4:45
- Sousa SF, Gomez RS, Diniz MG, Bernardes VF, Soares FF, Brito JA, Liu S, Pontes HA, Stratakis CA, Gomes CC: Defects of the Carney complex gene (PRKARIA) in odontogenic tumors. *Endocr Relat Cancer* 2015, 22:399–408
- Chrcanovic BR, Brennan PA, Rahimi S, Gomez RS: Ameloblastic fibroma and ameloblastic fibrosarcoma: a systematic review. *J Oral Pathol Med* 2018, 47:315–325
- Pereira NB, de Souza JC, Bastos VC, Fonseca FP, de Avelar GF, Castro WH, Dias AAM, Mosqueda-Taylor A, Gomez RS, Gomes CC: Patient-derived xenografts of a case of ameloblastic fibrodentinioma. *Oral Dis* 2019, 25:1229–1233

# APÊNDICE B: Artigo científico que apresenta os resultados deste trabalho referentes às análises em ameloblastomas adenoide.

Received: 4 August 2021 | Accepted: 8 August 2021

DOI: 10.1111/jop.13243

## BRIEF REPORT

Journal of Oral Pathology & Medicine | WILEY

## Adenoid ameloblastoma with dentinoid is molecularly different from ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors

Bruna Pizziolo Coura<sup>1</sup> | Jean Nunes dos Santos<sup>2</sup> | Felipe Paiva Fonseca<sup>3</sup> |  
 Vanessa Fátima Bernardes<sup>1</sup> | Sibebe Nascimento de Aquino<sup>4</sup> |  
 Jacks Jorge Júnior<sup>5</sup> | Pablo Agustin Vargas<sup>5</sup> | Mário José Romãnach<sup>6</sup> |  
 Bruno Augusto Benevenuto de Andrade<sup>6</sup> | Ricardo Santiago Gomez<sup>3</sup> |  
 Carolina Cavalieri Gomes<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>2</sup>Department of Oral Pathology, Universidade Federal da Bahia (UFBA), Salvador, Brazil

<sup>3</sup>Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

<sup>4</sup>Oral Diagnosis, School of Dentistry, Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), Governador Valadares, Brazil

<sup>5</sup>Oral Diagnosis Department, Piracicaba Dental School, Universidade de Campinas, Piracicaba, Brazil

<sup>6</sup>Department of Oral Diagnosis and Pathology, Dental School, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

### Correspondence

Carolina Cavalieri Gomes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil.  
 Email: carolinagomes@ufmg.br

Ricardo Santiago Gomez, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil.  
 Email: rsgomez@ufmg.br

### Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais; Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior; Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

### Abstract

**Background:** Adenoid ameloblastoma is a rare epithelial neoplasm, histologically characterized by the presence of ameloblastoma-like features, duct-like structures, epithelial whorls, and cribriform architecture. Dentinoid material is usually present. Some advocate adenoid ameloblastoma is an ameloblastoma variant. However, there are overlapping features not only with ameloblastoma, but also with adenomatoid odontogenic tumor. Most ameloblastomas are characterized by the presence of *BRAF* p.V600E mutations and adenomatoid odontogenic tumors harbor signature *KRAS* mutations. The molecular features of adenoid ameloblastoma remain unknown.

**Methods:** Nine adenoid ameloblastoma cases were screened by TaqMan allele-specific qPCR to assess *BRAF* p.V600E, ameloblastoma signature mutation, and *KRAS* p.G12V and p.G12R, adenomatoid odontogenic tumor signature mutations.

**Results:** *BRAF* and *KRAS* mutations were not detected in any of the adenoid ameloblastoma cases.

**Conclusion:** The molecular results support adenoid ameloblastoma as an entity distinct from adenomatoid odontogenic tumor and ameloblastoma.

### KEYWORDS

adenoid ameloblastoma, *BRAF*, genetics, *KRAS*, mutations, odontogenic tumors

1 | INTRODUCTION

Adenoid ameloblastoma (AA), also referred to as adenoid ameloblastoma with dentinoid, is a rare epithelial neoplasm. It has

an aggressive behavior, with recurrence occurring in approximately 70% of cases.<sup>1</sup>

Histologically, AA is characterized by the presence of ameloblastoma-like features, as well as by the presence of duct-like

TABLE 1 Clinical and molecular information of adenoid ameloblastomas with dentinoid cases

Sample number	Clinical information			Mutation status		
	Age (years)	Sex	Location	<i>BRAF</i> p.V600E	<i>KRAS</i> p.G12V	<i>KRAS</i> p.G12R
AA1 <sup>a</sup>	34	M	Maxilla, anterior/posterior	WT	WT	WT
AA2	52	M	Mandible, anterior	WT	WT	WT
AA3	24	M	Maxilla, posterior	WT	WT	WT
AA4	36	M	Mandible, anterior	WT	Un	WT
AA5	18	M	Maxilla, anterior/posterior	WT	WT	WT
AA6	41	M	Maxilla, posterior	WT	WT	WT
AA7	55	M	Maxilla, posterior	WT	Un	Un
AA8	39	M	Mandible, posterior	WT	WT	WT
AA9	39	M	Mandible, posterior	WT	Un	WT

Abbreviations: M, male; Un, uninterpretable results, when the amplification either occurred in a high Ct or there was no amplification; WT, wild-type.

<sup>a</sup>Molecular analyses were performed in incisional and excisional biopsies samples of the same case and demonstrated concordant results.

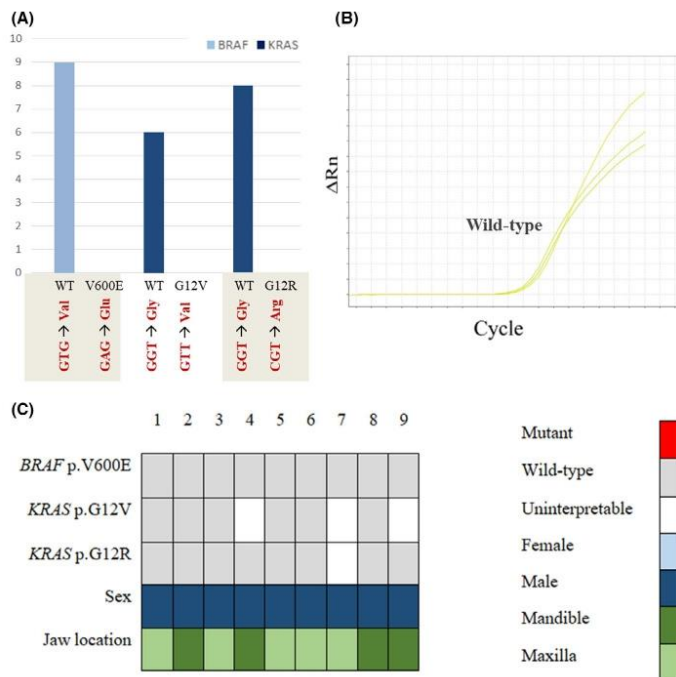
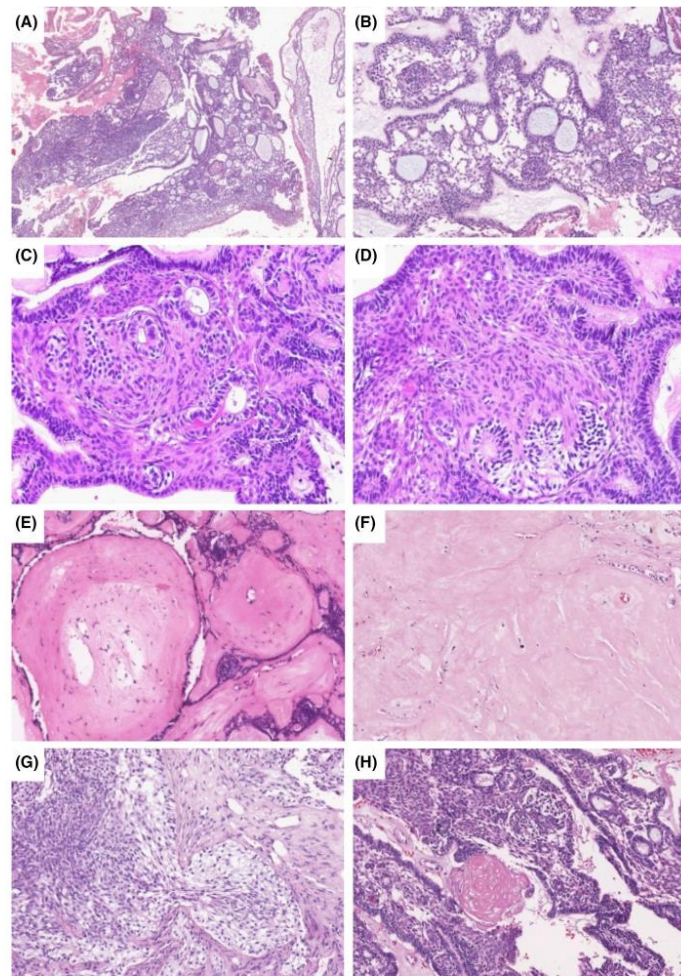


FIGURE 1 Mutation detection representative results and main clinical and molecular results. All nine adenoid ameloblastomas samples were wild-type for *BRAF* p.V600E and *KRAS*p.G12V and p.G12R mutations. The alleles tested, diversity of codons, and specific associated amino acid are represented (A). *BRAF* and *KRAS* wild-type allele amplifications can be observed in the qPCR amplification plot, while *BRAF* and *KRAS* mutant alleles were not detected by TaqMan allele-specific qPCR (B). Mutational status and main clinical information of each analyzed sample (C)

**FIGURE 2** Representative images of histopathological features of adenoid ameloblastoma with dentinoid included in the study. Low power view showing a cribriform arrangement of the tumor (A). Duct-like spaces containing basophilic mucoid material and whirling structures or morules were observed in all cases (B, C, and D). Microscopic view of the dentinoid material (E), sometimes in close association with clear cells, was observed (F). The clear cells predominated in focal areas (G). The clear cells predominated in focal areas (G). Ghost-cell keratinization was noted in one case (H)



structures, epithelial whorls, and cribriform architecture. Therefore, there is some microscopic overlapping with ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumor (AOT). The distinction with AOT is not very problematic, since AOT does not have an ameloblastoma-like component.<sup>1</sup>

Dentinoid material deposits are often observed in AA, in addition to the presence of clusters of clear cells and ghost-cell keratinization.<sup>1</sup> The variation in the presence of ghost cells and dysplastic dentin most probably results from the variable inductive potential of the odontogenic epithelium.<sup>1</sup>

Adenomatoid odontogenic tumor and ameloblastomas have mutations in MAPK signaling pathway genes. 70% of AOT cases have either *KRAS* p.G12V or p.G12R activating mutations.<sup>2,3</sup> *BRAF* is a downstream effector of *KRAS* in the MAPK signaling pathway, and

*BRAF* p.V600E mutation occurs in a high proportion of ameloblastoma cases.<sup>4</sup> Considering all these aspects, we raised the hypothesis if AA harbors ameloblastoma and AOT signature mutations.

## 2 | MATERIALS AND METHODS

### 2.1 | Sample selection

This study was approved by The Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais (protocol number CAAE: 30556120.0.0000.5149). A convenience sample of 14 formalin-fixed paraffin-embedded AA was obtained from different oral pathology services in Brazil. H&E-stained slides of all cases were carefully



examined, with five samples being excluded due to the lack of well-characterized duct-like or whorled structures, despite the presence of ameloblastoma features. Therefore, 9 AA cases were selected and included in the final cohort for molecular assessment following the criteria used by Loyola et al.<sup>1</sup>

## 2.2 | DNA isolation and mutation detection

Genomic DNA (gDNA) was isolated using a commercially available kit, QIAamp DNA FFPE Tissue kit (Qiagen). Quantification and assessment of gDNA quality were carried out using spectrophotometry (NanoDrop2000; Thermo Fisher Scientific), with 1.8 ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm accepted as optimal.

Samples were tested for *BRAF* p.V600E, *KRAS* p.G12V, and *KRAS* p.G12R mutations by TaqMan allele-specific qPCR, which is a highly specific and sensitive assay (detection sensitivity limit of up to 0.001) and can detect very low amounts of mutated DNA in a background of wild-type DNA. The reactions were run on a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems), and the mutations were screened using *BRAF*\_476\_mu and *BRAF*\_rf assays (*BRAF* p.V600E mutation), *KRAS*\_520\_mu and *KRAS*\_rf assays (*KRAS* p.G12V mutation), and *KRAS*\_518\_mu and *KRAS*\_rf assays (*KRAS* p.G12R mutation) (Applied Biosystems). The mutation status was determined using Taqman Mutation Detector™ Software v.2.0 (Life Technologies Corporation), as reported previously.<sup>3,5</sup>

## 3 | RESULTS

Clinicopathological data and molecular status for each individual sample of the nine AA cases included in the final analyses are shown in Table 1 and Figure 1. Patient's mean age was 37.5 years (ranging from 18 to 55). All samples occurred in males ( $n = 9$ ), with similar proportion of cases affecting the maxilla ( $n = 5$ ) and mandible ( $n = 4$ ). While 5 cases affected the posterior region of the jaws and 2 cases affected the anterior region of the jaws, 2 cases affected both the anterior and posterior jawbones.

Microscopically, all the tumors presented follicular, plexiform, or solid patterns with ameloblast-like cells in a partly cribriform arrangement (Figure 2A). In focal areas, multilayered basal cells with transition to ovoid morphology were identified. Whirling structures and prominent duct-like spaces containing basophilic mucoid material were observed in the central areas (Figure 2B,C,D). Dentinoid material, sometimes in close association with clear cells, was found in 6 cases (#1, 3, 4, 5, 6, and 8) (Figure 2E,F). A varied proportion of clear cells was noted in 7 cases (#1, 2, 3, 4, 5, 6, and 8) (Figure 2G). Focal ghost-cell keratinization was observed in one case (#5) (Figure 2H). Stellate reticulum-like epithelium was scarce in all samples. Papillary-like arrangement was also seen (#7).

When tested by allele-specific qPCR, 9/9 samples were wild-type for *BRAF* p.V600E or *KRAS* p.G12V and p.G12R mutations. We

tested the incisional and excisional biopsies of one case (AA1) and demonstrated concordant results.

## 4 | DISCUSSION

In the 9 cases presented, there was no site predilection, and all cases occurred in males, with peak incidence in the 4th decade, in line with previously reported for this lesion.<sup>6</sup>

AA and AOT share some histological similarities. AA has areas reminiscent of AOT, that is, contain the presence of duct-like structures surrounded by palisaded columnar cells and epithelial cells arranged in a whorled pattern.<sup>1</sup> Although the differentiation between AA and AOT is not often problematic, we tested if besides histological similarities these tumors also harbored molecular similarities. Based on negative mutational status for the *KRAS* mutations tested (p.G12V/R), we provide evidence of different molecular features of both these lesions.

Some advocate AA is an ameloblastoma subtype, at the more aggressive end of the spectrum.<sup>1</sup> Although based on very limited data, there is an abstract that reports negative immunohistochemical reaction for *BRAF* p.V600E in 3 tested cases.<sup>7</sup> Herein, we provide molecular evidence that AA does not harbor the ameloblastoma signature mutation, *BRAF* p.V600E, or if it does it probably occurs in a very low proportion of cases.

Another challenge in diagnosis is the distinction of aggressive AA from odontogenic carcinoma with dentinoid. However, criteria for such distinction are still not defined and molecular testing of the later has only been carried out in limited samples.<sup>8</sup> Additionally, AA harbors histological similarities with dentinogenic ghost-cell tumors, but they can be distinguished by the core microscopic characteristics of AA.<sup>1</sup>

In conclusion, we provide molecular evidence that AA is genetically distinct from ameloblastoma and AOT, supporting its classification as a separate entity.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grants from the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES-Finance code 001)/Brazil, and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil. BPC, JNS, PAV, FPF, RSG, and CCG are research fellows at CNPq. We thank the Centro de Aquisição e Processamento de Imagens (CAPI-ICB/Universidade Federal de Minas Gerais) for the scanning the histological slides.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## ORCID

Bruna Pizzolo Coura  <https://orcid.org/0000-0002-9987-5311>

Felipe Paiva Fonseca  <https://orcid.org/0000-0002-6657-4547>

Vanessa Fátima Bernardes  <https://orcid.org/0000-0003-0194-7434>

Mário José Romãoach  <https://orcid.org/0000-0002-7853-5916>

Carolina Cavalieri Gomes  <https://orcid.org/0000-0003-1580-4995>

#### REFERENCES

- Loyola AM, Cardoso SV, de Faria PR, et al. Adenoid ameloblastoma: clinicopathologic description of five cases and systematic review of the current knowledge. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2015;120:368-377.
- Gomes CC, de Sousa SF, de Menezes GH, et al. Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol.* 2016;56:e3-e5.
- Coura BP, Bernardes VF, de Sousa SF, et al. KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Mod Pathol.* 2019;32:799-806.
- Kurppa KJ, Catón J, Morgan PR, et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J Pathol.* 2014;232:492-498.
- Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol.* 2015;36:5649-5653.
- Adorno-Farias D, Muniz VRVM, Soares AP, et al. Ameloblastoma with adenoid features: a series of eight cases. *Acta Histochem.* 2018;120:468-476.
- Bilodeau EA, Seethala R. Adenoid ameloblastoma: a series of 5 tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2019;128:e78.
- Gondak RO, Mariano FV, de Sousa SF, et al. CTNNB1 and APC mutations in odontogenic carcinoma with dentinoid. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2020;129:e249-e256.

**How to cite this article:** Coura BP, dos Santos JN, Fonseca FP, et al. Adenoid ameloblastoma with dentinoid is molecularly different from ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2021;00:1-5. doi:[10.1111/jop.13243](https://doi.org/10.1111/jop.13243)

# APÊNDICE C: Artigo científico que apresenta os resultados deste trabalho referentes às análises em remanescente de folículo dentário.

Archives of Oral Biology 113 (2020) 104523



Contents lists available at ScienceDirect

Archives of Oral Biology

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



## Assessing pathogenic mutations in dental follicles as an attempt to identify early events in odontogenic tumours tumourigenesis



Bruna Pizzio Coura<sup>a,1</sup>, Taynara Asevedo Campos de Resende<sup>b,1</sup>,  
Vinícius César Barbosa de Menezes<sup>b</sup>, Vanessa Fátima Bernardes<sup>a</sup>, Silvia Ferreira de Sousa<sup>b</sup>,  
Marina Gonçalves Diniz<sup>a</sup>, Ricardo Santiago Gomez<sup>b,\*</sup>, Carolina Cavalieri Gomes<sup>a,\*</sup>

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

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

### ARTICLE INFO

**Keywords:**  
Benign tumour  
Genetics  
Normal tissue  
Mutation  
Odontogenic tumour  
Odontogenesis

### ABSTRACT

**Objective:** Driver oncogenic mutations have been reported in several benign neoplasms. While ameloblastomas show *BRAF* p.V600E mutations, adenomatoid odontogenic tumours harbour either *KRAS* p.G12R or p.G12V. The lack of understanding of the core molecular changes involved in tumour initiation and progression represents a critical barrier to developing new strategies for cancer detection and prevention. Considering the fact that ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumours can originate from dental follicles, we hypothesized that the *BRAF* and *KRAS* mutations might be early events in odontogenic tumours tumourigenesis. We aimed to assess *BRAF* and *KRAS* mutations in dental follicles associated with asymptomatic impacted teeth.

**Design:** Forty-eight dental follicles containing odontogenic epithelial remnants were included in the study. As ameloblastomas most often occur in the posterior mandible and adenomatoid odontogenic tumours have a predilection for the anterior jaws, we assessed by allele-specific qPCR the presence of *BRAF* p.V600E in 32 dental follicles associated with impacted 3<sup>rd</sup> mandibular molar teeth and *KRAS* p.G12V and *KRAS* p.G12R mutations in 16 dental follicle specimens obtained from around impacted anterior teeth. Sanger sequencing was used as an additional method.

**Results:** None of the dental follicle cases tested positive for the mutations.

**Conclusion:** In conclusion, we tried to detect the early genetic events associated with odontogenic tumours development in dental follicles, but we were unable to showcase that *BRAF* p.V600E and *KRAS* p.G12R or p.G12V mutations are the early genetic events associated with odontogenic tumours development.

### 1. Introduction

Driver oncogenic mutations have been reported in several benign neoplasms, including odontogenic tumours (Diniz et al., 2017; Kato et al., 2016; Marino-Enriquez & Fletcher, 2014). Recurrent pathogenic mutations in *BRAF* and *KRAS* occur in a high proportion of two epithelial odontogenic tumours, ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumours, respectively. While ameloblastomas show *BRAF* p.V600E mutations (Diniz et al., 2015; Kurppa et al., 2014), adenomatoid odontogenic tumours harbour either *KRAS* p.G12R or p.G12V (Coura et al., 2019; Gomes et al., 2016).

*KRAS* mutations occur in 70% of adenomatoid odontogenic tumours

(Coura et al., 2019). The frequency of the *BRAF* mutation in ameloblastomas ranges from approximately 60 to 80% (Diniz et al., 2015; Kurppa et al., 2014), whereas in ameloblastic carcinomas, their malignant counterpart, this frequency is 38% (Diniz et al., 2015). The higher frequency of the *BRAF* mutation in the benign tumour in comparison to the malignant counterpart is in line with the scenario described in other organs, illustrated by a higher frequency of this *BRAF* mutation in benign nevi (80%) than in dysplastic nevi (60%) or melanoma (40–50%) (Kato et al., 2016).

While ameloblastomas more frequently occur in the posterior region of the jaws, adenomatoid odontogenic tumours most often develop in the anterior jaws. Ameloblastomas represent an interesting model to

**Abbreviations:** qPCR, <sup>2</sup>quantitative polymerase chain reaction; TCGA, <sup>3</sup>the Cancer Genome Atlas; FFPE, <sup>4</sup>formalin-fixed, paraffin embedded; gDNA, <sup>5</sup>genomic DNA  
\* Corresponding authors at: Department of Oral Surgery and Pathology, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 - Pampulha, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil.

**E-mail addresses:** [rsomez@ufmg.br](mailto:rsomez@ufmg.br) (R.S. Gomez), [carolinacgomes@ufmg.br](mailto:carolinacgomes@ufmg.br) (C.C. Gomes).

<sup>1</sup> Contributed equally.

<https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2019.104523>

Received 1 March 2019; Received in revised form 10 April 2019; Accepted 11 August 2019  
0003-9969/ © 2019 Published by Elsevier Ltd.

study the tumourigenic process, as there is an encapsulated form of the tumour (unicystic), as well as an infiltrative form (solid), in addition to a malignant counterpart (ameloblastic carcinoma), all of them showing the presence of the *BRAF* p.V600E mutation (Diniz et al., 2015).

The lack of understanding of the core molecular changes involved in tumour initiation and progression represents a critical barrier to developing new strategies for cancer detection and prevention (Campbell et al., 2016). On this basis, it has recently been proposed the development of a "Pre-Cancer Genome Atlas" in a similar fashion to the well-known The Cancer Genome Atlas (TCGA)<sup>3</sup> (Campbell et al., 2016). Considering the efforts in characterizing the molecular basis of early tumourigenesis (Ryan & Falpel-Badger, 2016) and the fact that ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumours can originate from dental follicles, embryonic tissues remnants of teeth formation, we hypothesized that the *BRAF* and *KRAS* mutations might be early events in odontogenic tumours tumourigenesis.

## 2. Material and methods

### 2.1. Sample selection and clinical data

This study was approved by The Research Ethics Committee of Universidade Federal de Minas Gerais and a written consent was obtained from the patients. Haematoxylin & eosin stained slides of all dental follicle cases were examined to confirm diagnosis. We selected seventy-seven samples of dental follicles, but twenty-nine cases were excluded due to either insufficient odontogenic epithelium amount or in a few cases due to low DNA quality. Therefore, forty-eight dental follicle samples were included in the study, comprising sixteen dental follicles from anterior teeth and thirty-two from around impacted third molar teeth. The formalin-fixed, paraffin embedded (FFPE)<sup>4</sup> samples were obtained from the Oral Pathology Service and the fresh tissue samples were collected in the Oral Surgery clinics at the authors' institution. These dental follicles were surgically removed in association with impacted teeth from healthy individuals. Clinical information including patients' age, sex and teeth location were obtained.

### 2.2. DNA isolation and mutation detection

FFPE tissue genomic DNA (gDNA)<sup>5</sup> was isolated using a commercially available kit (QIAamp DNA FFPE Tissue Kit, Qiagen, Hilden, Germany) and fresh tissue gDNA was isolated using the DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen), according to the manufacturer's recommendations. gDNA quantification and purity analysis were performed by spectrophotometry (NanoDrop instrument 2000, Thermo Fisher Scientific, Wilmington, USA), with a 1.8 ratio of absorbance at 260 nm and 280 nm being accepted as optimal. All samples were amplified by conventional PCR prior to qPCR to assess DNA quality, to ensure sufficient amount of amplifiable gDNA.

Samples from dental follicles associated with impacted teeth in the anterior region of the mandible and maxilla were tested for *KRAS* p.G12V and *KRAS* p.G12R mutations and samples from dental follicles associated with impacted teeth from the posterior region of the jaws were tested for *BRAF* p.V600E. Mutations were assessed by TaqMan allele-specific qPCR, which is a highly specific and sensitive assay that can detect rare amounts of mutated DNA in a background of wild-type DNA. The reactions were performed using: *KRAS* p.G12V mutation, *KRAS*\_520\_mu and *KRAS*\_rf assays; *KRAS* p.G12R mutation, *KRAS*\_518\_mu and *KRAS*\_rf assays; *BRAF* p.V600E mutation, *BRAF*\_476\_mu and *BRAF*\_rf assays, (Applied Biosystems, Foster City, USA), as reported previously (Coura et al., 2019; Diniz et al., 2015). Briefly, reactions were run on a StepOne Plus instrument (Applied Biosystems) using the universal mutation detection thermal cycling protocol (95 °C for 10 min; 5 cycles: 92 °C for 15 s and 58 °C for 1 min; 40 cycles: 92 °C for 15 s and 60 °C for 1 min). The mutation status was determined using *Taqman Mutation Detector*<sup>™</sup> Software (Life

Technologies Corporation, Carlsbad, USA). Ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumour samples positive for *BRAF* p.V600E or *KRAS* p.G12V or p.G12R mutations were used as positive controls for each mutant allele. Six samples were submitted to direct sequencing to confirm the qPCR results, including cases in which there was unspecific amplification of the mutant allele in the qPCR. Briefly, PCR products were sequenced using the BigDye Terminator reagent (Life Technologies, Connecticut, USA) on the ABI3730 (Life Technologies). The chromatograms were interpreted using the SnapGene<sup>®</sup> software (from GSL Biotech; available at snapgene.com). To assess *KRAS* mutations at codon 12 the following primer pair was used to amplify the DNA of three samples: Forward 5'-AAAAGGTACTGTGGAGTATTGA-3', Reverse 5'-TCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'. The chromatograms were manually analyzed using *KRAS* reference sequence NG\_007524.1. Three samples were sequenced to assess *BRAF* p.V600E mutation and the following primers were used in the PCR: Forward 5'-TCATAATGC TTGCTGTAGGA-3', Reverse 5'-CCAAAAATTTAATCAGTGA-3'. The chromatograms were manually analyzed using *BRAF* reference sequence NG\_007873.3.

## 3. Results

Clinical and molecular results are shown in Table 1. Patients' mean ages with dental follicles collected from the anterior and posterior jaws were 17 years. Most samples were collected from female individuals (n = 31), the mandible (n = 39) and posterior region (n = 32). All dental follicle specimens obtained from around impacted third molar teeth were from the mandible. When tested by allele-specific qPCR, 48/48 samples were wild-type for *KRAS* p.G12V and p.G12R (samples from dental follicles associated with impacted teeth in the anterior region of the jaws) or *BRAF* p.V600E mutations (samples from dental follicles associated with impacted third molars). Sanger sequencing of all sequenced cases confirmed the wild-type status for the mutations.

## 4. Discussion

Normal tissues can already show the presence of somatic mutations that drive benign tumours' tumourigenesis. Confirming this, a recent study has shown that normal tissues from sun-exposed eyelid can harbour somatic mutations (Martincorena et al., 2015). *FGFR3* mutant clones were among the largest observed in normal skin (Martincorena et al., 2015) and notably, *FGFR3* mutations "drive" the benign skin tumour, seborrheic keratosis (Hafner et al., 2006).

In the present study, we attempted to identify the earliest genetic changes possibly involved in the initiation process of two epithelial odontogenic tumours, ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumours. Between 60–80% (Diniz et al., 2015; Kurppa et al., 2014) of ameloblastomas harbour the *BRAF* p.V600E mutation (Kurppa et al., 2014) and 80% of cases are diagnosed in the mandible, most often in the posterior region (Vered et al., 2017). Therefore, we assessed this mutation in the dental follicle specimens obtained from impacted third molar teeth. Considering that more than 2/3 of adenomatoid odontogenic tumours have *KRAS* codon 12 mutations (Coura et al., 2019), and that there is a strong predilection for the anterior jaws, most cases occurring in association with an unerupted canine, we assessed the presence of *KRAS* p.G12R and p.G12V mutations in the dental follicle specimens obtained from around impacted anterior teeth, mostly from canines.

Ameloblastomas show a peak incidence of diagnosis in the 4<sup>th</sup> and 5<sup>th</sup> decades of life (Vered et al., 2017). Interestingly, for the *BRAF* p.V600E mutant ameloblastoma cases, the mean patient age at diagnosis is lower than in the wild-type cases (34 vs 54 y.o., respectively) (Brown et al., 2014). Almost 90% of adenomatoid odontogenic tumours occur in the 2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> decades of life (Philipsen et al., 2007), but there is no difference in the mean age at diagnosis in *KRAS* mutant versus wild-type cases (Coura et al., 2019). One has to consider, though, that

**Table 1**  
Clinicopathological and molecular data of the 48 cases of the dental follicles.

Sample number	Clinical information					Associated Tooth	KRAS and BRAF mutations
	Age (years)	Sex	Jaw bone	Region	Associated Tooth		
1	25	M	Mandible	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
2	33	M	Mandible	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
3	13	M	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
4	20	M	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
5	14	F	Mandible	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
6	15	F	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
7	12	F	Mandible	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
8	08	M	Maxilla	Anterior	NA	NA	Wild-type
9	13	F	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
10	12	F	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
11	12	F	Maxilla	Anterior	Incisive	Canine	Wild-type
12	14	F	Mandible	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
13	16	F	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
14	51	M	Mandible	Anterior	NA	NA	Wild-type
15	13	F	Mandible	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
16	12	F	Maxilla	Anterior	Canine	Canine	Wild-type
17	15	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
18	16	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
19	16	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
20	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
21	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
22	18	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
23	20	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
24	25	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
25	30	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
26	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
27	13	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
28	15	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
29	16	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
30	16	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
31	17	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
32	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
33	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
34	17	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
35	17	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
36	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
37	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
38	17	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
39	17	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
40	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
41	17	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
42	18	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
43	18	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
44	18	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
45	19	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
46	19	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
47	19	F	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type
48	17	M	Mandible	Posterior	3 <sup>rd</sup> Molar	3 <sup>rd</sup> Molar	Wild-type

F = female, M = male, NA = detailed information not available.

\* all samples from dental follicles associated with impacted teeth in the anterior region of the mandible and maxilla were tested for KRAS p.G12V and KRAS p.G12R mutations and all samples from dental follicles specimens obtained from around impacted third molar teeth were tested for BRAF p.V600E.

both, ameloblastoma and adenomatoid odontogenic tumour derive from residual epithelial components of tooth development, and therefore, their tumorigenesis start during the odontogenesis process. Seminal work developed by Stanley et al. (1965) shows that the epithelial component of dental follicles undergoes changes and that while epithelial rests are numerous in the young individuals' dental follicles, they gradually disappear with age (Stanley et al., 1965). Interestingly, nor the cord-shaped odontogenic epithelium rests nor enamel organ epithelium were observed in dental follicles from individuals after 26 years (Stanley et al., 1965). To overcome this natural epithelial age change limitation, we studied dental follicles from young individuals and selected only cases in which odontogenic epithelium was present,

and therefore several samples had to be excluded from the research. The epithelium lining or the remnants of the dental lamina in dental follicles are the only epithelium sources for odontogenic tumours progression in these tissues.

For all tested samples, the result (i.e. the deltaCT value) was greater than the detection cutoff value, meaning that the sample is either mutation negative (wild-type) or below the limit of detection for the TaqMan allele-specific mutation detection assay. As this assay has a sensitivity limit of 0.1%, it can detect somatic mutations down to 1 mutant cell in a 1000 wild-type background. Therefore, our results point to a wild-type genetic background for the BRAF and KRAS mutations tested in the dental follicles. As these mutations are highly prevalent in ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumour, we would expect to detect them in at least a few dental follicle samples. There is also the remote possibility that they could not be detected due to the sensitivity limit of the assay. Ultimately, the absence of this odontogenic tumours' driver mutations in the dental follicles also raises the possibility that these mutations occur in odontogenic epithelial remnants outside the dental follicle, such as from the odontogenic epithelial rests inside the bone or in the gubernacular cord.

We used odontogenic tissue remnants in order to try to identify the presence of epithelial odontogenic tumours mutations at early stages, during initiation or promotion steps. BRAF p.V600E, highly prevalent in ameloblastomas, was not detected in the dental follicles associated with impacted 3<sup>rd</sup> molars, nor KRAS p.G12V/R, highly frequent in adenomatoid odontogenic tumours, were detected in the samples of dental follicles associated with anterior impacted teeth.

## 5. Conclusions

In conclusion, we were unable to showcase that BRAF p.V600E and KRAS p.G12R or p.G12V mutations are the early genetic events associated with odontogenic tumours development in dental follicles.

## Declaration of Competing Interest

None.

## Acknowledgements

This work was supported by grants from the Research Support Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG)/Brazil, Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES)/Brazil and National Council for Scientific and Technological Development (CNPq)/Brazil. RSG and CCG are research fellows at CNPq.

## References

- Brown, N. A., Rolland, D., Mchugh, J. B., Weigel, H. C., Zhao, L., Lim, M. S., et al. (2014). Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin. Cancer Res.* 20, 5517–5526. <https://doi.org/10.1158/1078-0432>.
- Campbell, J. D., Mazzilli, S. A., Reid, M. E., Dhillon, S. S., Platero, S., Beane, J., et al. (2016). The case for a pre-cancer genome atlas (PCGA). *Cancer Prev. Res. (Phil., Pa)*, 9, 119–124. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-16-0024>.
- Coura, B. P., Bernardes, V. F., de Sousa, S. F., Franca, J. A., Pereira, N. B., Pontes, H. A. R., et al. (2019). KRAS mutations drive adenomatoid odontogenic tumor and are independent of clinicopathological features. *Modern Pathol.* 32(6), 799–806. <https://doi.org/10.1038/s41379-018-0194-4>.
- Diniz, M. G., Gomes, C. C., Guimarães, B. V., Castro, W. H., Lacerda, J. C., Cardoso, S. V., et al. (2015). Assessment of BRAFV600E and SMOP412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumor Biol.* 36, 5649–5653. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3238-0>.
- Diniz, M. G., Gomes, C. C., de Sousa, S. F., Xavier, G. M., & Gomez, R. S. (2017). Oncogenic signalling pathways in benign odontogenic cysts and tumours. *Oral Oncol.* 72, 165–173. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2017.07.021>.
- Gomes, C. C., de Sousa, S. F., de Menezes, G. H., Duarte, A. P., Pereira, T. S., Moreira, R. G., et al. (2016). Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. *Oral Oncol.* 56, 3–5. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.03.001>.
- Hafner, C., van Oers, J. M., Hartmann, A., Landthaler, M., Stoehr, R., Blaszk, H., et al.

- (2006). High frequency of FGFR3 mutations in adenoid seborrhheic keratoses. *J. Investig. Dermatol.* 126, 2404–2407. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700422>.
- Kato, S., Lippman, S. M., Flaherty, K. T., & Kurzrock, R. (2016). The conundrum of genetic "Drivers" in benign conditions. *J. Natl. Cancer Inst.* 108. <https://doi.org/10.1093/jnci/djw036> pii: djw036.
- Kurppa, K. J., Catón, J., Morgan, P. R., Ristimäki, A., Ruhin, B., Kellokoski, J., et al. (2014). High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. *J. Pathol.* 232, 492–498. <https://doi.org/10.1002/path.4317>.
- Marino-Enriquez, A., & Fletcher, C. D. (2014). Shouldn't we care about the biology of benign tumours? *Nat. Rev. Cancer*, 14, 701–702. <https://doi.org/10.1038/nrc2845>.
- Martincorena, I., Roshan, A., Gerstung, M., Ellis, P., Van Loo, P., McLaren, S., et al. (2015). Tumor evolution. High burden and pervasive positive selection of somatic mutations in normal human skin. *Science*, 348, 880–886. <https://doi.org/10.1126/science.1256806>.
- Philipsen, H. P., Reichart, P. A., Siar, C. H., Ng, K. H., Lau, S. H., Zhang, X., et al. (2007). An updated clinical and epidemiological profile of the adenomatoid odontogenic tumour: a collaborative retrospective study. *J. Oral Pathol. Med.* 36, 383–393. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0714.2007.00536.x>.
- Ryan, B. M., & Falpel-Badger, J. M. (2016). The hallmarks of premalignant conditions: A molecular basis for cancer prevention. *Semin. Oncol.* 43, 22–35. <https://doi.org/10.1053/j.seminoncol.2015.09.007>.
- Stanley, H. R., Krogh, H., & Pannuk, E. (1965). Age changes in the epithelial components of follicles (dental sacs) associated with impacted third molars. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 19, 128–139. [https://doi.org/10.1016/0030-4220\(65\)90226-4](https://doi.org/10.1016/0030-4220(65)90226-4).
- Vered, M., Muller, S., & Heikinheimo, K. (2017). Ameloblastoma. In a. El-naggar, J. K. C. Chan, J. R. Grandis, T. Takata. In P. J. Slootwed (Ed.). *WHO classification of head and neck tumours*(4<sup>th</sup> ed.). Lyon, France: IARC pp. 215 – 217.

#### APÊNDICE D: Atividades desenvolvidas durante o Doutorado.

-Participação como apresentadora de trabalho no Encontro de Patologia 2022, com apresentação do trabalho intitulado “Ameloblastoma adenoide: relato de caso com enfoque nas análises histopatológica e molecular” no formato pôster, realizado pela Pós-graduação do departamento de Patologia - ICB da UFMG, no dia 01 de Setembro de 2022.

-Participação como ouvinte do Encontro de Patologia 2022 realizado pela Pós-graduação do departamento de Patologia - ICB da UFMG, nos dias 31 de Agosto a 02 de Setembro de 2022.

- Participação como ouvinte do Gene Time Conference 2022, realizado pela Pós-graduação do Programa de Pós-graduação em Genética - ICB da UFMG, nos dias 25 a 26 de Agosto de 2022.

-Participação como ouvinte do minicurso intitulado “Medicina personalizada e genética do câncer”, ministrado pelo Dr. Renato Santana, no CAD-UFMG, no dia 25 de Agosto de 2022, com duração de uma hora e meia.

-Participação como apresentadora de trabalho no 33º Congresso Brasileiro de Patologia e 26º Congresso Brasileiro de Citopatologia, com apresentação do trabalho intitulado “Ameloblastoma adenoide: relato de caso com enfoque nas análises histopatológica e molecular” no formato pôster, realizado pela Sociedade Brasileira de Patologia e Sociedade Brasileira de Citopatologia, em Foz do Iguaçu-Brasil, no dia 06 de Agosto de 2022.

-Participação como ouvinte do 33º Congresso Brasileiro de Patologia e 26º Congresso Brasileiro de Citopatologia, realizado pela Sociedade Brasileira de Patologia e Sociedade Brasileira de Citopatologia, em Foz do Iguaçu-Brasil, nos dias 03 a 06 de Agosto de 2022.

-Participação como ouvinte do Seminário NAPG sobre o tema “Empreendedorismo e Inovação para Ciências Biológicas”, realizado pelo Núcleo de Apoio à Pós-Graduação (NAPG) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, realizado no dia 8 de Outubro de 2021.

-Participação como ouvinte do “Molecular Analysis for Precision Oncology Virtual Congress” realizado por ESMO (European Society for Medical Oncology), do dia 07 ao dia 09 de Outubro de 2021.

-Participação como palestrante da aula aberta síncrona com o tema “Noções básicas de neoplasia: patologia e bases moleculares” da Liga Acadêmica de Patologia-LIPAT- do curso de Medicina da Universidade Federal de São João Del Rei- Campus Dom Bosco, realizada no dia 23 de fevereiro de 2021 com duração de 2 horas.

-Participação como ouvinte do “VII encontro de patologia da UFMG”, realizado pela Pós-graduação do departamento de Patologia Geral- ICB da UFMG, nos dias 24 e 25 de Agosto de 2020.

-Participação como ouvinte do “AACR Virtual Annual Meeting I 2020”, realizado pelo AACR (American Association for Cancer Research), nos dias 27 e 28 de Abril de 2020.

-Participação como ouvinte do “AACR Virtual Annual Meeting II 2020”, realizado pelo AACR (American Association for Cancer Research) do dia 22 ao dia 24 de Junho de 2020.

-Participação na comissão organizadora do III Encontro Nacional PROFbio, realizado pelo PROFbio da UFMG-Brasil, do dia 6 ao dia 9 de Novembro de 2019.

-Participação como apresentadora de trabalho no VII Simpósio Internacional de Oncologia Translacional, e apresentação de pôster do trabalho intitulado “*Kras* mutations drive adenomatoid odontogenic tumour and are independent of clinicopathological features”, realizado pelo Instituto de Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos, em Barretos-Brasil, nos dias 13 e 14 de Setembro de 2019.

-Participação como ouvinte do VII Simpósio Internacional de Oncologia Translacional realizado pelo Instituto de Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos, em Barretos-Brasil, nos dias 13 e 14 de Setembro de 2019.

-Participação como ouvinte da palestra intitulada “Inteligência Artificial Impactos e Desafios”, no evento Aula Magma da Pós-graduação do ICB 2019 realizado pelo Núcleo de Apoio à Pós-Graduação - NAPG/ICB da UFMG

-Participação como ouvinte do IV Encontro de Patologia da UFMG, realizado pela Pós-graduação do departamento de Patologia Geral- ICB da UFMG, entre os dias 12 e 14 de Novembro de 2018.