ALAN MOTTA DO CANTO

**Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em ameloblastomas
mandibulares**

São Paulo

2017

ALAN MOTTA DO CANTO

**Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em ameloblastomas
mandibulares**

Versão original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (Diagnóstico Bucal) para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Junior

São Paulo

2017

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Canto, Alan Motta do.

Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em
ameloblastomas mandibulares / Alan Motta do Canto ; orientador
Celso Augusto Lemos-Junior. -- São Paulo, 2017.

59 p. : fig., tab., graf.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências
Odontológicas. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal. --
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original

1. Ameloblastoma. 2. Neoplasia odontogênica. 3. Patogênese. I.
Lemos-Junior, Celso Augusto. II. Título.

Canto AM. Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em ameloblastomas mandibulares. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2017

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a)._____

Instituição: _____Julgamento: _____

Dedico a Deus, meus pais Aluizio e Cynthia Canto, por todo apoio e carinho e às minhas irmãs, minhas eternas companheiras.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Jr. pelo aceite de minha orientação no Programa de pós-graduação em Diagnóstico Bucal.

Ao Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva, pessoa de caráter, dedicada e competente. Um indivíduo dotado de extrema inteligência e muito amável. Um excelente professor e um grande amigo. Me ajudou muito durante a realização do estudo e sempre me estendeu a mão quando precisei.

À Prof. Dra Juliana Lucena Schussel pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos para realização dessa pesquisa.

Ao Prof. Dr. Ronaldo Rodrigues de Freitas, por tudo que já realizou por mim desde o meu ingresso na Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo até os dias de hoje. Um grande mestre que estimula a todos os seus alunos a busca incessante pelo conhecimento.

A Juliane e Guilherme que sempre estiveram ao meu lado nos momentos mais difíceis da minha vida e sempre me acolheram e apoiaram com atenção especial.

À Prof. Dra. Luciana Côrrea pela dedicação e conhecimentos transmitidos.

Ao Serviço de Patologia Cirúrgica Oral e Maxilofacial do Departamento de Estomatologia da FOUSP, Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Serviço de Cirurgia Boco Maxilo Facial da Santa Casa de São Paulo e a

todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para que esta pesquisa fosse realizada e concluída.

Ao corpo docente e aos funcionários da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo e em especial aos do programa de pós-graduação em Diagnóstico Bucal.

“Mesmo desacreditado e ignorado por todos, não posso desistir, pois para mim,
vencer é nunca desistir”.

Albert Einstein

RESUMO

Canto AM. Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em ameloblastomas mandibulares [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

O ameloblastoma é um tumor odontogênico agressivo, localmente invasivo e altamente recorrente. Estudos demonstram que é a neoplasia odontogênica benigna mais comum e eventualmente pode apresentar comportamento de lesões malignas. A detecção da mutação BRAF V600E tem sido demonstrada como uma das principais vias de proliferação tumoral dos ameloblastomas. Portanto, a identificação desses marcadores poderão ser úteis para elaborar estratégias mais eficientes de tratamento dessa patologia, bem como melhorar a qualidade de vida dos pacientes. Este estudo pesquisou a mutação BRAF V600E, por meio da técnica de imunohistoquímica, em ameloblastomas mandibulares bem como correlacionou com dados clínicos e imaginológicos relevantes. A amostra consistiu de 84 casos diagnosticados como ameloblastoma e localizados na mandíbula dos acervos do Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da FOUSP e do Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR. Os blocos obtidos foram submetidos a reação imunohistoquímica para detectar a mutação da proteína BRAF e foram coletados todos os dados clínicos e imaginológicos dos pacientes como sexo, idade, tamanho do tumor, localização mandibular, aspecto radiográfico, tipo e subtipo histológico e status do tumor. Análise estatística foi realizada buscando estabelecer correlação entre o marcador BRAF e dados clínicos e imaginológicos. Como resultados, dos 84 pacientes, 44 eram pacientes do sexo masculino (52,38%) e 40 feminino (47,62%). A mediana da idade encontrada foi de 25,5 anos sendo que em 42 casos foi observada idade inferior a mediana (50%) e 42 superior (50%). Com relação a presença ou ausência da mutação BRAF V600E, 66 casos apresentaram positividade para o marcador estudado (78,57%) e 18 foram negativos (21,43%). Ao relacionar a expressão de BRAF com as variáveis, foi observado significância estatística para a variável localização ($P=0,0353$) e tamanho do tumor ($P=0,008$). Não foi observado resultados com significância estatística com relação às variáveis sexo ($P=0,969$),

idade ($P=1,0$), aspecto radiográfico ($P=0,977$), padrão histológico ($P=0,910$), subtipo histológico ($P=0,5141$) e status do tumor ($P=0,336$). Os autores concluíram que a mutação BRAF V600E é comum em ameloblastomas mandibulares e é mais frequente tumores maiores de 4 cm e na região posterior de mandíbula. Além disso, independe do tipo histológico do tumor, idade e sexo do paciente, aspecto radiográfico e status do tumor (primário x recorrente).

Palavras chave: Ameloblastoma. Neoplasia odontogênica. Patogênese. Prognóstico ameloblastomas.

ABSTRACT

Canto AM. Imunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in ameloblastomas [Dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2017. Versão Original.

Ameloblastoma is an aggressive odontogenic tumour, being locally invasive and highly recurrent. Studies have demonstrated that it is the most common benign odontogenic neoplasia, sometimes exhibiting behaviour of malignant lesions. Detection of BRAF V600E mutation has been shown to be one of the main proliferation pathways of ameloblastomas. Therefore, the identification of these markers can be useful to elaborate more efficient treatment strategies for this pathology as well as to improve the patient's quality of life. This study investigated the BRAF V600E mutation in mandible ameloblastomas by using the immunohistochemical technique and by correlating clinical and imaging data of the patients. The sample consisted of 84 cases diagnosed as mandibular ameloblastoma, with all blocks being obtained from the Surgery Pathology Service of the FOU SP Department of Stomatology and the Maxillofacial Surgery Unit of the Erasto Gaertner Hospital, Curitiba, PR. The blocks were submitted to immunohistochemical reaction for detection of BRAF protein mutation, with clinical and imaging data such as age, gender, tumour size, mandibular location, radiographic aspect, histological type and subtype, and tumour status were collected. Statistical analysis was performed in order to establish a correlation between BRAF marker and clinical and imaging data. The results showed that, of the 84 patients, 44 were male (52.38%) and 40 female (47.62%). The median age was 25.5 years old, with 42 cases having age below the median (50%) and 42 above it (50%). With regard to the presence or absence of BRAF V600E mutation, 66 cases were found to be positive for the marker (78.57%) and 18 were negative (21.43%). The correlation between BRAF expression and variables showed statistical significances for mandibular location ($P = 0.0353$) and tumour size ($P = 0.008$), whereas no statistical significance was observed for gender ($P = 0.969$), age ($P = 1.0$), radiographic aspect ($P = 0.977$), histological pattern ($P = 0.910$), histological subtype ($P = 0.5141$) and tumour status ($P = 0.336$). The authors concluded that BRAF V600E mutation is

common in mandibular ameloblastomas, with tumours larger than four cm being more frequent in the posterior region of the mandible. In addition, this pathology occurs regardless of histological type of the tumour, age, gender, radiographic aspect and tumour status.

Keywords: Ameloblastoma. Odontogenic neoplasia. Pathogenesis. Prognosis
ameloblastomas

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em ameloblastomas	36
Figura 5.2 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável sexo (masculino e feminino)	37
Figura 5.3 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável idade (até 25,5 anos e maior que 25,5 anos).....	38
Figura 5.4 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável localização (anterior e posterior)	39
Figura 5.5 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável tamanho (até 4cm. e maior que 4cm.)	40
Figura 5.6 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável aspecto radiográfico (multilocular e unilocular)	41
Figura 5.7 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável a classificação histológica (sólido/multicístico e unicístico).....	42
Figura 5.8 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável a subtipo histológico (folicular, plexiforme, mural e intraluminal).....	43
Figura 5.9 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável comportamento biológico (tumor primário e recorrente).....	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 - Características gerais dos 84 casos de ameloblastomas....35

Tabela 5.2 - Análise univariada de teste de associação entre variáveis
clínicas relacionadas ao tumor e a positividade para
BRAF.....46

Tabela 5.3 - Análise multivariada utilizando regressão logística incluindo
como variáveis preditoras "localização" e "diâmetro" e
assumindo como variável dependente "positividade para
BRAF.....47

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BRAF - proteína da via intracelular derivada da quinase específica para serina/treonina envolvida na via MAPK

BRAF V600E – proteína BRAF mutada devido a uma substituição dos aminoácidos glutamina por valina número 600

MEK - proteína da via intracelular derivada da quinase específica para serina/treonina envolvida na via MAPK

PCR - reação em cadeia da polymerase

RAF – proteína quinase específica para serina/treonina envolvida na via MAPK

Ras/MAPK – via de proteínas quinases ativadas por mitógeno

SMO - receptor proteico acoplado a proteína G associada a via de sinalizacao Hedgehog

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	24
3	PROPOSIÇÃO.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
5	RESULTADOS	34
6	DISCUSSÃO.....	48
7	CONCLUSÕES.....	52
	REFERÊNCIAS	54
	ANEXO	58

1 INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos são lesões derivadas de elementos do epitélio, ectomesenquima e/ou mesênquima que participaram ou participam na formação aparato dentário. Segundo a Organização Mundial de Saúde, esses tumores são encontrados exclusivamente na região maxilofacial e podem ocorrer em qualquer idade (Gardner et al., 2005).

O ameloblastoma é um tumor odontogênico epitelial benigno derivado de componentes celulares do órgão do esmalte. Segundo estudos, é o segundo tumor odontogênico mais comum e apresenta uma diversidade muito grande do aspecto clínico e histológico. Ele constitui 1 a 2% de todos os cistos e tumores dos maxilares, sendo mais prevalente na 4a década de vida, podendo ocorrer dos 6 meses aos 72 anos de idade (Gardner et al., 2005; Dhanuthai et al., 2012).

A apresentação clínica dos ameloblastomas é variável, no entanto, é muito comum eles estarem associados a abaulamentos mandibulares indolores, devido ao seu crescimento lento. Dores e parestesias são sintomas raros e normalmente os elementos dentários associados a esse tumor podem estar inclusos ou deslocados (Gardner et al., 2005; Thillaikarasi et al., 2010).

Os ameloblastomas podem ser classificados em 4 tipos de acordo com seu aspecto histológico: sólido/multicístico, unicístico, periférico e desmoplásico. Os do tipo sólido/multicístico são os mais agressivos com altas taxas de recidiva e são divididos histotologicamente em folicular, plexiforme, acantomatoso, desmoplásico, de células basais e de células granulares, sendo os dois primeiros mais comuns (Gardner et al., 2005).

Devido a agressividade local, crescimento infiltrativo e altas taxas de recidiva dos ameloblastomas, o tratamento cirúrgico ressectivo com margens de segurança é considerado como referencia para essas neoplasias (Mc Clary et al., 2016). No entanto, em função da grande morbidade dessa modalidade terapêutica, estudos no campo da biologia molecular e com marcadores tumorais tem sido desenvolvidos para estabelecer o prognóstico tumoral e verificar respostas diante de terapias alvo (Premalatha et al., 2013; Kurppa et al., 2014).

Dentre os diversos marcadores imunohistoquímicos estudados em associação com os ameloblastomas, as moléculas envolvidas com vias de sinalização celular tem sido demonstradas como principais ativadoras da proliferação celular desorganizada nesses tumores (Kurppa et al., 2014; Brown et al., 2014; Heikinheimo et al., 2015). Trabalhos recentes demonstraram uma alta frequência da proteína mutada BRAF associadas aos ameloblastomas mandibulares (Kurppa et al., 2014; Brown et al., 2014; Heikinheimo et al., 2015). Essa mutação é denominada de BRAF V600E e ocorre devido a substituição do aminoácido valina para ácido glutâmico no número 600 (Kurppa et al., 2014).

Kurppa et al. (2014) relataram a presença de BRAF V600E em cerca de dois terços dos casos clínicos de ameloblastomas. Além disso, essas mutações estavam associadas a uma maior resistência a terapias alvo em culturas de células *in vitro*. Kennedy et al. (2016) também relataram a presença dessa proteína anômala em um caso de ameloblastoma com metástase pulmonar. Nesse estudo, os autores associaram esse marcador a maior destruição local sendo necessária utilização de terapias alvo para controle da neoplasia.

Portanto, a detecção da mutação BRAF V600E abriu novas perspectivas na compreensão da etiopatogenia dos ameloblastomas bem como nas modalidades de tratamento com terapias alvo e abordagens menos agressivas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O ameloblastoma é um tumor de crescimento lento e infiltrativo dos maxilares cuja a etiopatologia ainda não é completamente compreendida. É considerado um dos tumores odontogênicos mais comuns, e pode acometer tanto a maxila quanto a mandíbula sendo que raramente provoca metástases mesmo com essa propensão a invasividade local e recorrência (Kurppa et al., 2014; McClary et al., 2016; Tan et al., 2016).

O tratamento cirúrgico ressectivo amplo ainda é o padrão, no entanto, apresenta como desvantagens a alta morbidade, deformidade pós operatória e potencial de recidiva (McClary et al., 2016). Devido a esses fatores, estudos de marcadores moleculares associados aos ameloblastomas tem sido realizados com o intuito de desenvolver terapias sistêmicas visando a busca de tratamentos mais conservadores, sem a necessidade de cirurgias extensas e/ou repetitivas (Brown et al., 2014; Kurppa et al., 2014; Sweeney et al., 2014; Heikinheimo et al., 2015).

A pesquisa de receptores da família tirosina quinase que incluem fatores de crescimento epidérmico, epitelial e de crescimento alfa demonstrou expressão dos mesmos no epitélio odontogênico. Já em ameloblastomas, o fator de crescimento epidérmico e o receptor de fator crescimento fibroblástico 2 se encontram especialmente aumentados (Brown et al., 2014; Kurppa et al. 2014; Sweeney et al., 2014). A ativação desses receptores com os seus ligantes ocorrem no meio extracelular e uma vez ativados fora da célula, esses receptores contribuem para ativação das vias intracelulares. Então, a via de proteínas quinases ativadas por mitógeno (Ras/MAPK) são ativadas sequencialmente em cadeia e outras proteínas da via intracelular como a quinase específica para serina/treonina (RAF) e BRAF também se tornam ativas (Brown et al., 2014; Sweeney et al., 2014).

A proteína BRAF é uma proteína da via intracelular derivada da quinase específica para serina/treonina (RAF) e promove proliferação e diferenciação celular através da cascatas de fosforilação (Jhamb et al., 2014). Em condições fisiológicas, ocorre proliferação celular de forma controlada, trabalhando em conjunto com as vias de apoptose. No entanto, em condições

patológicas, como na mutação dessas proteínas, ocorre proliferação celular exagerada, inibição da apoptose e surgimento de neoplasias (Cantwell-Dorris et al., 2011).

As alterações decorrentes da mutação de proteínas específicas como a BRAF foram associadas com tumores malignos como melanoma, e câncer de ovário e colorretal (Vakiani et al., 2011). Noventa por cento dessas mutações envolvendo o BRAF ocorrem devido a uma substituição dos aminoácidos glutamina por valina (V600E) (Kurppa et al., 2014).

Estudos recentes demonstraram a ativação da via MAPK em ameloblastomas e tumores com morfologia ameloblástica (Kurppa et al., 2014; Heikinheimo et al., 2015). Esses trabalhos demonstraram que a mutação BRAF V600E que ocorre nas células somáticas também são importantes na patogênese dos ameloblastomas.

Em um amplo estudo de coorte, Brown et al. (2014) detectou a presença do BRAF V600E em 62% dos casos de ameloblastomas estudados. Nesse estudo, eles também compararam a eficácia da detecção desse marcador imunohistoquímico em cortes histológicos e PCR. Curiosamente, os autores encontraram 100% de concordância dos resultados, comprovando que a análise imunohistoquímica é válida para esse tipo de estudo. Ao comparar a presença do BRAF V600E com dados clínicos, esses mesmos autores encontraram associação dessa mutação com adultos jovens (média de 33,0 anos de idade) e tendência a recorrência, sendo estatisticamente significativa nesses dois casos (Brown et al., 2014).

Com relação ao tipo de via de sinalização mutada e alterada, Sweeney et al. (2014) demonstraram que a MAPK está envolvida com mutações do BRAF V600E e exclusivamente dos ameloblastomas mandibulares. Já a via Hedgehog esta relacionada com mutações da proteína Smoothed (SMO) e exclusivamente aos ameloblastomas maxilares. Esses fatos sugerem que os ameloblastomas maxilares e mandibulares podem apresentar etiopatogenia diferente bem como necessidades de tratamentos e terapias alvos diferentes (Sweeney et al., 2014).

Com relação a frequência da mutação do BRAF V600E nos

ameloblastomas mandibulares, Kurppa et al. (2014) analisaram 24 amostras de ameloblastoma multicísticos e encontraram mutação em 63% dos casos sugerindo assim a presença frequente da mutação na maioria desses tumores. No entanto, devido a presença expressiva de casos não mutados (37%), alguns autores questionam a necessidade de classificar esses tumores em dois grandes grupos para estabelecer estudos direcionados (Gomes et al., 2014).

Com relação ao subtipo histológico da variante multicística, a mutação do BRAF foi descrita como mais frequente nos casos de ameloblastomas foliculares e plexiformes (Sweeney et al., 2014). Já com relação a variante unicística, autores observaram positividade para o BRAF V600E em cerca de 62,5% dos casos sendo menos comuns na variante luminal (Pereira et al., 2016).

Devido a esses fatos, a comprovação da mutação na via MAPK e especialmente do BRAF V600E abriu novas perspectivas nas modalidades de tratamento dos ameloblastomas. Um relato de caso demonstrou com sucesso o uso de drogas específicas como o Dabrafenib e Trametinib (inibidores do BRAF e MEK) em um paciente com ameloblastoma recorrente e metástase pulmonar que não era candidato a ressecção cirúrgica devido a extensão do tumor. Nessa ocasião houve uma resposta considerada positiva pelos autores sugerindo a possibilidade de terapias neoadjuvantes como parte do tratamento inicial nos casos em que a mutação BRAF é confirmada (Kaye et al., 2014).

Tan et al. (2016), relataram um caso clínico de ameloblastoma mandibular extenso em angulo mandibular em uma paciente de 85 anos. Devido a idade avançada, foi feito inicialmente uma pesquisa de BRAF V600E no tumor para tentar tratamento com terapias alvo. Foi detectada a variante mutante deste marcador e a paciente foi tratada com Dabrafenib por 73 dias. Após essa terapêutica, os autores observaram diminuição de 90% nas dimensões da lesão possibilitando um tratamento menos agressivo tardiamente.

Outras terapias alvo direcionadas a presença dessa mutação também demonstraram bons resultados em estudos através do uso de inibidores como Vemurafenib. Dois estudos *in vitro* demonstraram sensibilidade ao Vemurafenib em células ameloblásticas (Brown et al., 2014; Sweeney et al., 2014). Contudo, autores relataram que respostas diferentes a essas terapias alvo podem ocorrer devido a grande heterogenicidade clonal desses tumores, forte influencia do ambiente em que ele se desenvolve bem como aberrações moleculares na via MAPK. Nesses casos, outras terapias alvo com outros medicamento devem ser utilizados (Gomes et al., 2014; Kennedy et al., 2016).

3 PROPOSIÇÃO

Avaliar a frequência da mutação BRAF V600E, por meio da técnica de imunohistoquímica, em amostras de ameloblastomas de mandíbula oriundos dos acervos do Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da FOUSP e do Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR.

Correlacionar a presença da mutação BRAF V600E em ameloblastomas com dados clínicos, imaginológicos e histopatológicos dos casos estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo de caráter descritivo, transversal e observacional em que foram selecionados 84 casos de ameloblastomas mandibulares dos acervos do Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da FOU SP e do Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP sob o número 058366/2016 (05/08/2016). (Anexo A)

4.1 COLETA DOS DADOS

Foram coletados todos os dados clínicos e imaginológicos disponíveis nos acervo de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da FOU SP e do Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR.

4.1.1 Clínicos

As seguintes variáveis foram analisadas: sexo, idade, tamanho do tumor, status do tumor (primário x recorrente).

4.1.2 Localização Anatômica

No que diz respeito à localização anatômica, a mandíbula foi dividida em 2 regiões anatômicas: anterior (de distal de canino a distal do canino contralateral) e posterior (distal aos caninos).

4.1.3 Radiográficos

Para determinação dos dados radiográficos foram utilizadas apenas as informações do acervo de Patologia da FOU SP. As informações avaliadas foram: imagem unilocular/multilocular e dimensões antero posterior dos tumores

4.1.4 Amostras

Todos 84 blocos de casos diagnosticados histologicamente como ameloblastomas mandibulares foram reavaliados e classificados por uma nova análise de lâminas coradas em hematoxilina e eosina, segundo critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005 e revisados pelo mesmo patologista (Prof. Dr. Paulo Henrique Braz-Silva). Os tumores foram classificados como multi ou unicísticos e subclassificados como foliculares e plexiformes, luminal, intraluminal e mural .

4.2 ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA DA MUTAÇÃO BRAF V600E

A reação imunohistoquímica foi realizada em secções de 3µm através de procedimentos padrões e com a utilização do kit Envision Dual Link System HRP® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA), tendo a diaminobenzidina como cromógeno. A recuperação do antígeno foi realizada com solução Tris/EDTA buffer (pH 9) (Dako, Carpinteria, CA, USA). A incubação do anticorpo primário foi realizada, por 1 hora e 30 minutos, à 25°C, em câmara úmida, utilizando-se do anticorpo VE1 (Spring Biosciences, Pleasanton, CA, USA), específico para mutação BRAF V600E, diluído a 1:50. Controles positivos (melanoma com a presença conhecida molecularmente para a mutação BRAFV600E) e negativos (cistos dentígeros e omissão do anticorpo primário) foram incluídos em cada reação.

A imunorreação foi classificada como reagente quando foi observada marcação positiva citoplasmática em uma fração substancial das células tumorais (mais de 80%). Reações com positividade pontual, fraca ou ausente foram classificadas como negativas.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis descritas foram categorizadas de forma qualitativa e analisadas de acordo com a presença ou ausência da expressão da mutação BRAF V600E. As frequências absoluta e relativas foram obtidas e foram utilizados o teste exato de Fischer e Qui quadrado para correlacionar a expressão de BRAF com os parâmetros: localização, tumor primário ou recorrente, padrão histológico, sexo, tamanho, idade, aspecto radiográfico e subtipo histológico. O teste de regressão logística simples foi utilizado para comparar os resultados e nos casos das variáveis localização e tamanho, a regressão logística multivariada também foi realizada para analisar os resultados. O software estatístico livre Biostat versão 5.3 (<http://www.mamiraua.org.br/pt-br/downloads/programas/bioestat-versao-53/>) foi utilizado nas análises.

5 RESULTADOS

Um total de 84 casos de ameloblastomas mandibulares foram coletados no acervo de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da FOUSP e do Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba, PR. Os dados detalhados associados a amostra estão disponíveis na tabela 5.1. Desse total de casos, 44 eram pacientes do sexo masculino (52,38%) e 40 feminino (47,62%). A média de idade foi de 29,9 anos ($\pm 16,08$) sendo a mínima de 9 e a máxima de 76. Por se tratar de um dado não paramétrico, a mediana encontrada das idades foi de 25,5 anos sendo que em 42 casos foi observada idade inferior a mediana (50%) e 42 superior (50%).

Em 77 casos o tumor apresentava localização posterior (91,67%) e em 7 anterior (8,33%). Quarenta e um pacientes apresentavam dimensões tumorais de até 4 cm no sentido antero posterior (55,41%) e 33 eram maiores que 4cm (44,59%). Com relação ao aspecto radiográfico, os tumores multiloculares corresponderam a 49 casos (65,33%) e restando apenas 26 uniloculares (34,67%). Em 9 casos não foi possível encontrar os dados a respeito do padrão imaginológico.

No quesito, classificação histológica, 73 casos eram do tipo sólido/multicístico (86,90%) e 11 do tipo unicístico (13,10%). Dos casos multicísticos, 48 eram foliculares (57,14%) e 25 plexiformes (29,76%). Já os unicísticos, 7 eram do subtipo mural e 4 intraluminal. Por fim, dos 84 casos, 77 corresponderam a tumores primários (91,67%) e 7 recorrentes (8,33%).

Com relação a presença ou ausência do marcador BRAF V600E, 66 casos apresentaram positividade para o marcador estudado (78,57%) e 18 foram negativos (21,43%) (Figura 5.1).

Tabela 5.1 – Características gerais dos 84 casos de ameloblastomas

Variáveis	N	(%)
Sexo¹		
Masculino	44	52,38%
Feminino	40	47,62%
Idade (anos)¹		
Acima de 25,5	42	50%
Abaixo de 25,5	42	50%
Localização¹		
Anterior	7	8,33%
Posterior	77	91,67%
Tamanho²		
≤ 4cm	41	55,41%
> 4cm	33	44,59
Aspecto radiográfico³		
Multilocular	49	65,33%
Unilocular	26	34,67%
Tipo Histológico¹		
Sólido	73	86,90%
Unicístico	11	13,10%
Subtipo Histológico¹		
Folicular	48	57,14%
Plexiforme	25	29,77%
Mural	7	8,33%
Intraluminal	4	4,76%
Status¹		
Primário	77	91,67%
Recorrente	7	8,33%
Análise BRAF-V600E¹		
Positivo	66	78,57%
Negativo	18	21,43%

Fonte: o autor.

¹ Dados de 84 casos; ² Dados de 74 casos; ³ Dados de 75 casos

Figura 5.1 - Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em ameloblastomas – A - Ameloblastoma unicístico (H&E, aumento de 200X); B – Imunodeteção da mutação BRAF V600E em ameloblastoma unicístico (aumento de 200X); C – Ameloblastoma solido (H&E, aumento de 200X); D –Imunodeteção da mutação BRAF V600E em ameloblastoma solido (aumento de 200X)

Fonte: o autor.

Com relação a presença da mutação associada a variável sexo, dos 44 homens foi observada positividade em 35 (79,5%) e negatividade em 9 (20,45%). Com relação às mulheres (n=40), 31 foram positivos (77,5%) e 9 negativos (22,5%) (Figura 5.2).

Figura 5.2 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável sexo (masculino e feminino)

Fonte: o autor.

Com relação a idade, 66 pacientes apresentaram positividade para o BRAF sendo 33 (50%) com idade abaixo de 25,5 anos e 33 (50%) acima dos 25,5 anos (Figura 5.3).

Figura 5.3 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável idade (até 25,5 anos e maior que 25,5 anos)

Fonte: o autor.

Dos 84 casos, 77 eram na mandíbula posterior, sendo destes 63 positivos (81,82%) e 14 negativos (18,18%). A mandíbula anterior estava presente em 7 casos de ameloblastomas, sendo 3 positivos (42,86%) e 4 negativos (57,14%) para a mutação BRAFV600E (Figura 5.4).

Figura 5.4 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável localização (anterior e posterior)

Fonte: o autor.

Com relação ao tamanho do tumor, 41 casos apresentavam dimensões maiores que 4 cm, sendo 27 (65,85%) positivos e 14 (34,15%) negativos para a mutação BRAFV600E. Em 33 casos, as lesões eram menores que 4 cm, sendo 31 (93,94%) positivos e 2 (6,06%) negativos (Figura 5.5).

Figura 5.5 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável tamanho (até 4cm. e maior que 4cm.)

Fonte: o autor.

Com relação às características imaginológicas, 49 casos eram multiloculares sendo positivo em 39 (79,59%) pacientes e negativo em 10 (20,41%). Dos 26 casos uniloculares, 20 foram positivos (76,92%) e 6 (23,08%) negativos (Figura 5.6).

Figura 5.6 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável aspecto radiográfico (multilocular e unilocular)

Fonte: o autor.

Dos casos 84 casos de ameloblastomas, 73 eram do tipo sólido/multicístico sendo que 58 (79,45%) apresentavam positividade para BRAF V600E e 15 negativos para essa proteína (20,55%). Em 11 casos foi observada a variante unicística, sendo 8 positivos (72,73%) para o marcador e 3 negativos (27,27%) (Figura 5.7).

Figura 5.7 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável a classificação histológica (sólido/multicístico e unicístico)

Fonte: o autor.

Com relação ao tipo multicístico, o subtipo folicular foi o mais comum (48 casos) sendo positivo em 36 casos (75%) e negativo em 12 pacientes (25%). A variante plexiforme foi encontrada em 25 casos e 22 (88%) eram positivos e 3 (12%) negativos.

Para a variante unicística o subtipo mural foi observado em 7 casos sendo em 4 (57,14%) positivos e 3 negativos (42,86%). O subtipo intraluminal foi observada em 4 casos sendo todos positivos (100%) (Figura 5.8).

Figura 5.8 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável a subtipo histológico (folicular, plexiforme, mural e intraluminal)

Fonte: o autor.

Dos 84 casos de ameloblastomas mandibulares, 77 eram primários e 7 recorrentes. Dos casos primários, 62 (80,52%) eram positivos e 15 (19,48%) negativos. Com relação aos 7 casos recorrentes, foi observada positividade em 4 casos (57,14%) e negatividade em 3 (42,86%) (Figura 5.9).

Figura 5.9 - Valores totais de BRAF positivo e negativo de acordo com a variável comportamento biológico (tumor primário e recorrente)

Fonte: o autor.

Ao analisar a expressão de BRAF positivo com os testes de Fisher e Qui-Quadrado, foi observado resultados com significância estatística quando associado às variáveis localização ($P=0,0353$) e tamanho do tumor ($P=0,008$). Não foi observado resultados com significância estatística com relação às variáveis sexo ($P=0,969$), idade ($P=1,0$), aspecto radiográfico ($P=0,977$), padrão histológico ($P=0,910$), subtipo histológico ($P=0,5141$) e status do tumor ($P=0,336$).

A análise univariada demonstrou que os casos com positividade de BRAF apresentam 6 vezes mais chance de acometimento na região posterior quando comparados a região anterior ($P=0,0287$). Para a variável dimensão da lesão, foi evidenciado 8,2 vezes mais chance de BRAF positivo em tumores maiores que 4cm ($P=0,0082$) (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Análise univariada de teste de associação entre variáveis clínicas relacionadas ao tumor e a positividade imuno-histoquímica para BRAF

Variáveis clínicas	Frequência de positividade para BRAF (%)	Valor de p*
Sexo		
Masculino	79,5	0,969
Feminino	77,5	
Idade		
≤ 25 anos	78,6	1,000
> 25 anos	78,6	
Localização		
Anterior	42,86	0,0353
Posterior	81,82	
Tamanho		
≤ 4cm	65,85	<0,008
> 4cm	93,94	
Aspecto radiográfico		
Unilocular	79,59	0,977
Multilocular	76,92	
Tipo histológico		
Sólido	79,45	0,910
Unicístico	72,73	
Subtipo histológico		
Folicular	75,00	0,514
Não folicular	83,33	
Status		
Primário	80,52	0,336
Recidiva	57,14	

Fonte: o autor.

* Valor de p pelo teste do χ^2 ou Exato de Fisher. Significante quando $p < 0,05$

Com relação a análise multivariada, para as variáveis tamanho e localização foi observado uma associação com significância estatística ($P=0,0150$ e $0,0451$ respectivamente) com chance de BRAF positivo de 7,29 e 7,23 vezes maior respectivamente. Além disso em casos de tumores localizados na região posterior e maiores que 4 cm existe a probabilidade de 94,80% de BRAF positivo (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Análise multivariada utilizando regressão logística incluindo como variáveis preditoras "localização" e "diâmetro" e assumindo como variável dependente "positividade para BRAF"

Variável	OR	IC 95%	Valor de p
Localização	7,23	1,04 a 50,13	0,0451
Diâmetro	7,29	1,47 a 36,14	0,0150

* Valor de p pela regressão logística multivariada. Significante quando $p<0,05$

6 DISCUSSÃO

Embora a etiologia do ameloblastoma seja conhecida, a patogênese desses tumores ainda é obscura, sendo a mutação das vias de proliferação celular estudada como uma possível causa. Recentemente, grupos de pesquisadores evidenciaram alterações na via de proteínas quinase ativadas por mitógeno (MAPK) associados a mutação do gene BRAF em casos de ameloblastomas (Kurppa et al., 2014). Além disso, a presença dessa proteína mutada pode ser um fator prognóstico de agressividade, proliferação celular desordenada e pode auxiliar no estabelecimento de terapias alvo para esse marcador (do Canto et al., 2016; Fregnani et al., 2017).

Com relação a presença desse oncogene, foi demonstrado uma frequência que varia de 46 a 82% dos casos de ameloblastomas (Brown et al., 2014; Kurppa et al., 2014; Sweeney et al., 2014; Fregnani et al., 2017). Nesse estudo, foi observado positividade desse marcador em 66 casos (78,57%) sendo essa constância mais próxima do estudo de Diniz et al. (2015) que demonstraram frequência em 82% dos casos.

Poucos estudos avaliaram a relação do sexo do paciente com a positividade do BRAF V600E, no entanto, autores observaram uma discreta predominância desse marcador em mulheres (Kurppa et al. 2014; Fregnani et al., 2017). Nesse estudo foi observado uma discreta tendência para o sexo masculino, no entanto, assim como nos estudos descritos não houve diferença com significância estatística (Kurppa et al. 2014; Fregnani et al., 2017).

Com relação a idade, Brown et al. (2014) e Fregnani et al. (2017) demonstraram uma média de 34,5 e 34,7 anos respectivamente no diagnóstico de ameloblastoma com positividade para o BRAF V600E. Nesse estudo, foi encontrado uma mediana de 25,5 anos por se tratar de um dado não paramétrico, no entanto, a média de idade encontrada foi de 29,4 anos. Assim como descrito em estudos prévios, não há diferença com significância estatística quando analisados idade e positividade para BRAF V600E.

Com relação a localização, muitos estudos descreveram uma maior frequência do BRAF V600E na mandíbula quando comparados a maxila.

Sweeney et al. (2014), demonstraram que a maioria dos casos de ameloblastomas maxilares estão associados a mutação da via SMO (Smoothed gene) e não a via MAPK. No entanto, Diniz et al. (2015) e Fregnani et al. (2017) não evidenciaram diferenças quando comparados maxila e mandíbula.

Nenhum estudo avaliou exclusivamente a diferença da expressão de BRAF V600E de acordo com regiões específicas da mandíbula. Nesse estudo foi demonstrado uma maior predominância de positividade desse marcador na região posterior da mandíbula ($p=0,0353$) indicando uma possibilidade de BRAF V600E positivo em 81,82% nos casos de tumores de corpo, ângulo, ramo e côndilo mandibular. Além disso, a região posterior apresenta o risco de BRAF positivo 6 vezes maior que a região anterior.

No quesito tamanho, apenas um estudo tentou correlacionar essa variável com a presença do BRAF V600E. Fregnani et al. (2017) não encontraram diferença com significância estatística comparando ameloblastomas maiores e menores de 7 cm. Diferentemente desses autores, utilizamos a medida de 4 cm por ser valor obtido através da mediana de todos os casos. Além disso, acreditamos que casos de tumores com diâmetro maior de 4 cm devem ser considerados como de dimensão grande porque compreendem grandes segmentos mandibulares. Devido a esse fato, os casos de ameloblastomas foram divididos em lesões menores e maiores de 4 cm nesse estudo. Para essa variável, foi encontrada diferença com significância estatística ($P= 0,0085$), sendo o risco de BRAF positivo 8,2 vezes maior em tumores maiores 4cm.

Para as variáveis com significância estatística (localização e tamanho) foi realizada uma análise multivariada, sendo evidenciado que tumores localizados na região posterior de mandíbula e com dimensões maiores de 4 cm apresentam possibilidade de positividade do BRAF V600E em cerca 95% dos pacientes. Para essas duas variáveis foi evidenciada significância estatística na regressão logística múltipla com $P=0,0451$ para localização e $P=0,0150$ para o tamanho. Esse resultado pode indicar uma maior agressividade e potencial proliferativo em ameloblastomas com essas características.

Com relação ao aspecto radiográfico, os casos de ameloblastomas que apresentam aspecto sólido/multicístico podem apresentar maiores índices de recidiva e agressividade quando comparados aos unicísticos. Fregnani et al. (2017) demonstraram maior incidência de BRAF V600E em casos de tumores com imagem multicística e maior probabilidade de recidiva. Nesse estudo foi evidenciado um resultado distinto com uma tendência de positividade discretamente maior para os casos unicísticos. No entanto, não houve diferença com significância estatística ao comparar essa variável com os casos multicísticos.

Atualmente, uma informação importante associada ao comportamento clínico dos ameloblastomas compreende a classificação sólido/multicístico e unicístico. Diniz et al. (2015), demonstraram mutação do BRAF nos dois tipos histológicos com frequência praticamente igual. Esse resultado é semelhante ao encontrado nesse estudo, com uma leve predominância pelos casos multicísticos, no entanto, sem significância estatística ($P=0,910$).

Com relação aos tipos e subtipos histológicos, Sweeney et al. (2014) evidenciaram maior frequência da mutação da via BRAF e SMO em subtipos foliculares e plexiformes. No entanto, tanto nesse estudo quanto para Kurppa et al. (2014), Diniz et al. (2015) e Fregnani et al. (2017), não é possível correlacionar a presença do BRAF V600E com o tipo e subtipo histológico dos ameloblastomas.

Com relação ao status do tumor (primário versus recorrente) autores demonstraram menor índice de recidiva em casos de tumores com a presença do BRAF V600E (Brown et al., 2014; Kurppa et al., 2014; Sweeney et al., 2014). Esses resultados contrastam com os apresentados por Fregnani et al. (2017), que demonstraram maior tendência de recidiva em casos de positividade do BRAF V600E. Embora esse assunto ainda seja controverso, esse estudo não encontrou diferença para a alteração dessa proteína em casos primários e/ou recorrentes.

Em suma, é extremamente importante determinar as variáveis associadas a positividade do BRAF V600E em ameloblastomas mandibulares, tendo em vista que o comportamento biológico dessa neoplasia pode cursar com destruição tecidual, perda de estruturas anatômicas, deformidade facial, metástases regionais e a distância e até

transformação maligna (Carlson; Marx, 2006; Kaye et al., 2014; Kennedy et al., 2016). A recente descrição dessa mutação associada aos ameloblastomas pode resultar no estabelecimento de terapias alvo com drogas específicas para esse marcador como o vemurafenib, trametinib, dabrafenib (Brown et al., 2014; Kaye et al., 2014; Kennedy et al., 2016). Esse fato poderá representar uma mudança no tratamento desses tumores, principalmente como uma modalidade neoadjuvante nos casos de lesões de grandes dimensões, recorrentes e/ou com metástases em órgãos distantes (Kaye et al., 2014; do Canto et al., 2016; Kennedy et al., 2016).

7 CONCLUSÕES

- A mutação BRAF V600E é um evento comum em ameloblastomas mandibulares e independe do tipo histológico do tumor, idade e sexo do paciente, aspecto radiográfico e status do tumor (primário x recorrente).

- A mutação BRAF V600E em ameloblastomas mandibulares pode estar associada a parâmetros como localização e dimensões da lesão, sugerindo um comportamento mais agressivo em tumores maiores de 4 cm e na região posterior de mandíbula.

REFERÊNCIAS¹

Brown NA, Rolland D, McHugh JB, Weigelin HC, Zhao L, Lim MS, Elenitoba-Johnson KS, Betz BL. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. *Clin Cancer Res*. 2014 Nov;20(21):5517-26. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-14-1069.

Cantwell-Dorris ER, O'Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol Cancer Ther*. 2011 Mar;10(3):385-94. doi: 10.1158/1535-7163.MCT-10-0799. Review.

Carlson ER, Marx RE. The ameloblastoma: primary, curative surgical management. *J Oral Maxillofac Surg*. 2006 Mar;64(3):484-94.

Dhanuthai K, Chantarangsu S, Rojanawatsirivej S, Phattaratatip E, Darling M, Jackson-Boeters L, Said-Al-Naief N, Shin HI, An CH, Hong NT, An PH, Thosaporn W, Lam-ubol A, Subarnbhesaj A. Ameloblastoma: a multicentric study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 Jun;113(6):782-8. doi: 10.1016/j.oooo.2012.01.011.

Diniz MG, Gomes CC, Guimarães BV, Castro WH, Lacerda JC, Cardoso SV, de Faria PR, Dias FL, Eisenberg AL, Loyola AM, Gomez RS. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. *Tumour Biol*. 2015 Jul;36(7):5649-53. doi: 10.1007/s13277-015-3238-0.

do Canto AM, Rozatto JR, Schussel JL, de Freitas RR, Hasséus B, Braz-Silva PH. Immunohistochemical biomarkers in ameloblastomas. *Acta Odontol Scand* [Internet]. 2016 Aug [citado 3 set. 2016]; 30:1-6. Disponível em: <http://www.tandfonline.com/loi/iode20>.

Fregnani ER, Perez DE, Paes de Almeida O, Fonseca FP, Soares FA, Castro-Junior G, Alves FA. BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. *Histopathology*. 2017 Feb;70(3):473-84. doi: 10.1111/his.13095.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

Gardner DG, Heikinheimo K, Shear M, Philipsen HP, Coleman H, Ameloblastoma. In: Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours, Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 296–300.

Gomes CC, Diniz MG, Gomez RS. Progress towards personalized medicine for ameloblastoma. *J Pathol*. 2014 Apr;232(5):488-91.

Heikinheimo K, Kurppa KJ, Elenius K. Novel targets for the treatment of ameloblastoma. *J Dent Res*. 2015 Feb;94(2):237-40. doi: 10.1177/0022034514560373. Review.

Jhamb T, Kramer MJ. Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: implications for therapeutics. *Exp Mol Pathol*. 2014 Dec;97(3):345-53. doi: 10.1016/j.yexmp.2014.09.001.

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 Dec 3;107(1):378. doi: 10.1093/jnci/dju378.

Kennedy WR, Werning JW, Kaye FJ, Mendenhall WM. Treatment of ameloblastoma and ameloblastic carcinoma with radiotherapy. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Oct;273(10):3293-7. doi: 10.1007/s00405-016-3899-3.

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 Apr;232(5):492-8. doi: 10.1002/path.4317.

McClary AC, West RB, McClary AC, Pollack JR, Fischbein NJ, Holsinger CF, Sunwoo J, Colevas AD, Sirjani D. Ameloblastoma: a clinical review and trends in management. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2016 Jul;273(7):1649-61. doi: 10.1007/s00405-015-3631-8.

Pereira NB, Pereira KM, Coura BP, Diniz MG, de Castro WH, Gomes CC, Gomez RS. BRAFV600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. *J Oral Pathol Med*. 2016 Nov;45(10):780-5. doi: 10.1111/jop.12443.

Premalatha BR, Patil S, Rao RS, Reddy NP, Indu M. Odontogenic tumor markers - an overview. *J Int Oral Health*. 2013 Apr;5(2):59-69. Review.

Sweeney RT, McClary AC, Myers BR, Biscocho J, Neahring L, Kwei KA, Qu K, Gong X, Ng T, Jones CD, Varma S, Odegaard JI, Sugiyama T, Koyota S, Rubin BP, Troxell ML, Pelham RJ, Zehnder JL, Beachy PA, Pollack JR, West RB. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. *Nat Genet* 2014 Jul;46(7):722-5. doi: 10.1038/ng.2986.

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 Jul;122(1):e5-7. doi: 10.1016/j.oooo.2015.12.016.

Thillaikarasi R, Balaji J, Gupta B, Ilayaraja V, Vani NV, Vidula B, Saravanan B, Ponniah I. Cystic granular cell ameloblastoma. *J Maxillofac Oral Surg* 2010 Sep;9(3):310-3. doi: 10.1007/s12663-010-0083-y.

Vakiani E, Solit DB. KRAS and BRAF: drug targets and predictive biomarkers. *J Pathol*. 2011 Jan;223(2):219-29. doi: 10.1002/path.2796. Review.

Anexo A – Parecer do Comitê de ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Biomarcadores em ameloblastomas

Pesquisador: Paulo Henrique Braz da Silva

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 57127316.0.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.664.742

Apresentação do Projeto:

O presente projeto de pesquisa terá como instituições colaboradoras o Serviço de Patologia Cirúrgica do Departamento de Estomatologia da FOU SP e o Serviço de Cirurgia Bucomaxilofacial do Hospital Erasto Gaertner, Curitiba. Para o grupo controle, serão selecionados 30 casos diagnosticados como capuz pericoronário, oriundos do serviço de Patologia da FOU SP. Serão coletados todos os dados clínicos e imaginológicos disponíveis nas fichas clínicas dos pacientes, assim como condutas diagnósticas, terapêuticas e seguimento pós-operatório dos casos. Os casos serão classificados histopatologicamente pela análise de lâminas coradas em hematoxilina e eosina, segundo critérios propostos pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2005. As reações de imunohistoquímica serão realizadas em cortes parafinados de 3m dos casos selecionados com a utilização do kit Envision Dual Link System HRP® (DakoCytomation®, Carpinteria, USA) e dos seguintes anticorpos:

Anticorpo Clone Fabricante

CD10 56C6 DakoCytomation®

Ck 14 LL002 AbCam®

Ck 19 RCK108 DakoCytomation®

Podoplanina D2-40 DakoCytomation®

BerEp4 Ber-EP4 DakoCytomation®

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 1.664.742

A análise da imunexpressão dos marcadores acima será realizada de maneira quantitativa por meio da utilização do programa PRECISION Image Analysis®, Aperio. Os resultados obtidos serão correlacionados com as informações histopatológicas, clínicas e imaginológicas dos casos analisados.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Estudar marcadores imunohistoquímicos característicos de agressividade em ameloblastomas, assim como sua associação com características clínicas apresentadas nesses tumores. Objetivo Secundário: a) Mensurar e quantificar a expressão dos marcadores imunohistoquímicos CK14, 19; CD10; podoplanina e BerEP4 em ameloblastomas; b) Avaliar os resultados da expressão imunohistoquímica dos marcadores propostos e correlacioná-los com informações clínicas do paciente, assim como o comportamento biológico do tumor.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: mínimos por tratar-se de pesquisa com material de arquivo (blocos parafinados).

Benefícios: nenhum benefício direto aos participantes da pesquisa; benefícios indiretos para a área de conhecimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto apresenta -se muito bem estruturado e possibilitará a análise imunohistoquímica de biomarcadores associados à agressividade, correlacionando aos dados clínicos e imaginológicos de 60 casos de ameloblastomas de conhecimento, o que é de extrema relevância para a área de conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta os termos necessários à realização do projeto:

- 1) Autorização para uso do Laboratório de Imunohistoquímica do Depto. de Estomatologia da FOUSP.
- 2) Autorização para uso de blocos de parafina do arquivo de do Serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Erasto Gaertner.
- 3) Autorização para utilização do material parafinado do Serviço de Patologia Cirúrgica do Depto. de Estomatologia da FOUSP.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 1.664.742

Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_740548.pdf	28/06/2016 10:48:36		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	projetoameloblastomaCEP2.docx	28/06/2016 10:23:31	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Investigador	justificativacorrecao.pdf	28/06/2016 10:12:05	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Outros	folhaderosto.pdf	16/06/2016 18:54:43	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacaoerasto.pdf	16/06/2016 08:33:03	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacaolab.pdf	16/06/2016 08:16:39	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacaopatologiafo.pdf	16/06/2016 08:16:27	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA.docx	15/06/2016 11:21:09	Paulo Henrique Braz da Silva	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 1.664.742

SAO PAULO, 05 de Agosto de 2016

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br