



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA E SAÚDE**



ERNESTO SANTOS SOUSA NETO

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES EM ONCOGENES E GENES
SUPRESSORES DE TUMORES EM MIXOMAS ODONTOGÊNICOS
POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

**SALVADOR
2019**

ERNESTO SANTOS SOUSA NETO

**INVESTIGAÇÃO DE MUTAÇÕES EM ONCOGENES E GENES
SUPRESSORES DE TUMORES EM MIXOMAS ODONTOGÊNICOS
POR SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO**

Tese apresentada ao programa de Pós- Graduação em Odontologia e Saúde, curso de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutor em Odontologia e Saúde.

Orientador: Prof. Dr. JEAN NUNES DOS SANTOS

SALVADOR
2019

AGRADECIMENTOS

À Deus,

Pela vida e por ter permitido chegar até aqui.

Aos meus pais Elci e Washington,

Mesmo estando distantes, são um porto seguro para os momentos de dificuldade pessoal e profissional.

À minha família,

Por entender que minha ausência é consequência do caminho escolhido.

Ao meu orientador prof. Dr. Jean Nunes dos Santos,

Pela confiança, ensinamentos, e pelo exemplo de compromisso e seriedade pela pesquisa. Você sempre será minha referência! Obrigado por mais essa oportunidade de ser orientado por você!

Aos professores Ricardo Gomes e Carolina Gomes,

Sem palavras, agradeço imensamente a prontidão, paciência e disponibilidade de sempre responder as minhas dúvidas e questionamentos. Sem vocês nada disso aqui seria possível!

Ao Programa de Pós Graduação em Odontologia e Saúde,

Na pessoa da coordenadora professora Dra. Águida Cristina Gomes Henriques Leitão.

A toda equipe da UFMG,

Pela recepção, pelo acolhimento no período que passei por lá. Josiani e Silvia Ferreira muito obrigado por toda ajuda. Jamais esquecerei vocês!!!

À amiga e colega Adna Barros,

Por sua amizade, estímulo e confiança de sempre.

Aos colegas de doutorado,

Daniela Adorno, Getúlio, Rosangela Rabelo, Maira Freitas, Inessa Barbosa, Livia Andrade,

Ana Carolina, pelos bons momentos vividos e pela contribuição que cada um de vocês tiveram para o meu crescimento.

A Daniel Luiz,

Por mais uma vez ter demonstrado apoio incondicional, pelas palavras de encorajamento, pelo incentivo e pela ajuda dada sempre que precisei. Mais uma vez minha gratidão eterna a você!

À Tayla, Edilson e Mirian,

Pela companhia nas manhãs de quinta, durante esses 04 anos.

À Viviane Palmeira e Isabele Cardoso, amigas do pós-doc

Pela convivência e apoio dado durante o meu doutorado.

À Sueli, secretária do programa

Por ser tão solícita sempre que precisei.

À Faculdade de Odontologia da UFBA,

Instituição que me acolheu durante a graduação, especialização, mestrado e agora na finalização de mais um ciclo da minha vida acadêmica.

A CAPES,

Pelo apoio financeiro durante o doutorado e incentivo à pesquisa brasileira.

“O cientista não é o homem que fornece
as verdadeiras respostas,
É quem faz as verdadeiras perguntas.”

Clauder Lévi-Strauss

RESUMO

O mixoma odontogênico (MO) é uma neoplasia odontogênica agressiva benigna cuja patogenia ainda não foi bem esclarecida. Mutações patogênicas têm sido descritas em tumores odontogênicos (TO) epiteliais benignos, como ameloblastomas e tumores odontogênicos adenomatóides, no entanto, a patogênese molecular do MO ainda é pouco caracterizada, dificultando o desenvolvimento de um tratamento personalizado. O sequenciamento de nova geração (SNG) consiste em um dos métodos usado para traçar o perfil molecular de patologias e já está sendo utilizado para identificar mutações genéticas e polimorfismos de nucleotídeo único associados a muitas lesões odontogênicas. Com o objetivo de encontrar mutações genéticas no MO, realizou-se sequenciamento de nova geração (SNG) em nove casos utilizando o painel Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2, que investiga 2.855 mutações em 207 amplicons de 50 genes. Após controle de qualidade, três amostras foram excluídas do estudo e apenas 06 amostras seguiram no experimento. O SNG revelou cinco variantes de nucleotídeo único: KDR (rs1870377); TP53 (rs1042522); PIK3CA (rs2230461); KIT (rs3822214); JAK3 (rs3213409), no entanto nenhuma mutação foi predita como patogênica. Em conclusão esses tumores agressivos não abrigam mutações patogênicas em genes comumente mutados em cânceres humanos cobertos por este painel, ou se o fazem, essas mutações provavelmente ocorrem em baixa proporção de casos.

Palavras-chave: Mixoma odontogênico, Sequenciamento de Nova Geração,

ABSTRACT

Odontogenic myxoma (OM) is a benign aggressive odontogenic neoplasm whose pathogenesis has not yet been well understood. Pathogenic mutations have been described in benign epithelial odontogenic tumors (OT), such as ameloblastomas and adenomatoid odontogenic tumors; however, the molecular pathogenesis of OM is still poorly characterized, making it difficult to develop a personalized treatment. New generation sequencing (SNG) is one of the methods used to trace the molecular profile of pathologies and is already being used to identify genetic mutations and single nucleotide polymorphisms associated with many odontogenic lesions. In order to find genetic mutations in the MO, new generation sequencing (SNG) was performed in nine cases using the Ion AmpliSeq™ Panel Cancer Hotspot Panel v2, which investigates 2,855 mutations in 207 amplicons of 50 genes. After quality control, three samples were excluded from the study and only six samples were followed in the experiment. The SNG revealed five single nucleotide variants: KDR (rs1870377); TP53 (rs1042522); PIK3CA (rs2230461); KIT (rs3822214); JAK3 (rs3213409), however no mutation was predicted as pathogenic. In conclusion, these aggressive tumors do not harbor pathogenic mutations in commonly mutated genes in human cancers covered by this panel, or if they do, such mutations probably occur in a low proportion of cases.

Keywords: Odontogenic Myxoma, New Generation Sequencing,

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização dos casos de MO sequenciados no estudo.....	27
Tabela 2	Resultado das corridas do SNG.....	28
Tabela 3	Variante missense detectada na coorte de amostras de MO utilizando painel hotspot de 50 genes do câncer.....	29
Tabela 4	Espectro mutacional do MO no sequenciamento da próxima geração.....	30

LISTA DE SIGLAS, ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ABL1	ABL proto-oncogene 1, non-receptor tyrosine kinase
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
ALK	ALK receptor tyrosine kinase
APC	Adenomatous polyposis coli
ATM	ATM serine/threonine kinase
BRAF	B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase
C	Célcios
CDH1	Cadherin 1
CDKN2A	Cyclin dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
COG	Cisto odontogênico glandular
CNC	Complexo de Carney
CSF1R	Colony stimulating factor 1 receptor
CTNNB1	Catenin Beta 1
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DNase	Desoxirribonuclease
dbSNP	Single nucleotide polymorphism database
EGFR	Epidermal growth factor receptor
ERBB2	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 2
ERBB4	Erb-b2 receptor tyrosine kinase 4
EUA	Estados Unidos da América
EZH2	Enhancer of zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit
FBXW7	F-box and WD repeat domain containing 7
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FGFR2	Fibroblast growthh factor receptor 2
FGFR3	Fibroblast growth factor receptor 3
FLT	Fms related tyrosine kinase 3
GNA11	G protein subunit alpha 11
GNAQ	G protein subunit alpha q
GNAS	Guanine nucleotide binding protein
GNAS1	Guanine nucleotide binding protein, alpha 1

H&E	Hematoxilina e eosina
HNF1A	HNF1 homeobox A
HRAS	Hras proto-oncogene, GTPase
IDH1	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+)) 1, cytosolic
IDH2	Isocitrate dehydrogenase (NADP(+))2, mitochondrial
IGF2BP3	Insulin like growth factor 2 mRNA binding protein 3
IGV	Integrative genomics viewer
Indel	Inserção/deleção
JAK2	Janus kinase 2
JAK3	Janus kinase 3
KDR	Kinase insert domain receptor
KIT	KIT proto-oncogene receptor tyrosine kinase
KRAS	KRAS proto-oncogene, GTPase
MAF	Minor allele frequency
MAPK	Mitogen-activated protein Kinase
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
MO	Mixoma odontogênico
MPL	MPL proto-oncogene, thrombopoietin receptor
MLH1	MuL homolog 1
mRNA	Ácido ribonucléico mensageiro
NOTCH1	Notch 1
NPM1	Nucleophosmin 1
NRAS	NRAS proto-oncogene, GTPase
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDGFRA	Platelet derived growth factor receptor alpha
pH	Potencial de hidrogênio
PIK3CA	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha
PKA	Protein kinase A
PRKAR1A	Protein kinase cAMP-dependent type I regulatory subunit alpha
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
PTPN11	Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11
qPCR	PCR quantitativo

RAS	Ras protein
RB1	RB transcriptional corepressor 1
RET	Ret proto-oncogene
RNA	Ácido ribonucléico
SCBCN	Síndrome do carcinoma basocelular nevíide
SIFT	Sorting tolerant from intolerant
SNG	Sequenciamento de nova geração
SMAD4	SMAD family member 4
SMARCB1	SWI/SNF related, matrix associated, actin dependent regulator of chromatin, subfamily b, member 1
SMO	Smoothened, frizzled class receptor
SNV	Single nucleotide variation
SNP	Single nucleotide polimorphism
SRC	SRC proto-oncogene, non-receptor tyrosine kinase
STK11	Serine/threonine kinase 11
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TP53	Tumor protein p53
TO	Tumor odontogênico
TOA	Tumor odontogênico adenomatóide
TOP	Tumor
UFBA	Universidade Federal da Bahia
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UCSC	Universidade Californiana Santa Cruz
VEGFA	Vascular endothelial growth factor A
VEGFR	Receptor vascular endothelial growth factor
VHL	Von Hippel-Lindau tumor supressor

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
2	REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1	MIXOMA ODONTOGÊNICO	15
2.2	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	16
2.3	ALTERAÇÕES MOLECULARES EM LESÕES ODONTOGÊNICAS	17
2.4	ALTERAÇÕES MOLECULARES EM MIXOMAS (ODONTOGÊNICOS)	20
3	OBJETIVOS	23
3.1	OBJETIVO GERAL	23
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4	METODOLOGIA	24
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	24
4.2	PACIENTES E AMOSTRAS	24
4.3	EXTRAÇÃO DE DNA	24
4.4	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (SNG)	25
5	RESULTADOS	27
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	27
5.2	SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO	27
6	DISCUSSÃO	31
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS	35
	REFERÊNCIAS	36
	ANEXOS	41

1 INTRODUÇÃO

Os tumores odontogênicos (TO) são lesões derivadas do epitélio odontogênico e portanto, encontrados exclusivamente nos ossos maxilares. Esses tumores ocorrem frequentemente em crianças ou adultos jovens e apresentam variação histológica considerável. Geralmente ocorrem intraósseo e contém componentes epiteliais que interagem com o microambiente tumoral, fazendo com que apresentem comportamento local invasivo com alto risco de recorrência, embora benignos (TAKATA, SLOOTWEG, 2017; EL-NAGGAR et al., 2017).

A etiologia dos TO ainda é desconhecida, e a maioria dessas lesões parecem desenvolver-se sem um fator causal (REICHART; PHILIPSEN, 2004). Muitas controvérsias existem em relação ao surgimento dos TO, e vários estudos para identificar alterações celulares, genéticas e moleculares estão sendo realizados na tentativa de explicar os mecanismos de desenvolvimento, diferenciação celular e progressão tumoral (KUMAMOTO, 2006; PEACHOCK; COX; SCHMID, 2010; SWEENEY et al, 2014; GÜLTEKIN, SENGÜVEN, AZIZ, HEYDT, BUETTN, 2017).

Dentre os TO, destaca-se o MO representando entre 1% e 17,7% de todos esses tumores (BUCHNER, MERRELL, CARPENTER, 2006; MARTÍNEZ-MATA et al, 2008). O MO é uma neoplasia benigna intra-óssea agressiva com alto índice de recidiva, sendo a cirurgia sua principal modalidade terapêutica, variando de procedimentos menos invasivos, como curetagem ou mandibulectomia marginal, até ressecções totais (NOFFKE, RAUBENHEIMER, CHABIKULI, BOUCKAERT, 2007, BOFFANO et al, 2011). Além da cirurgia, a descrição molecular de diferentes tipos de tumores vem sendo usados para definir diferentes abordagens terapêuticas (BROWN et al, 2014; KURPPA et al, 2014; SWEENEY et al, 2014; GÜLTEKIN, SENGÜVEN, AZIZ, HEYDT, BUETTN, 2017).

O desenvolvimento de terapias não invasivas para tratamento dos tumores odontogênicos tem sido dificultado pela falta da compreensão da patogênese molecular dessas lesões. Vias moleculares tem exercido papel crítico na sua patogênese, e a frequente associação com mutações em genes que codificam vários transdutores de sinais, tem sido ligados à respostas terapêuticas, levando a análise do perfil molecular de alguns desses tumores (Brown

et al, 2014; KURPPA et al, 2014; SWEENEY et al, 2014; GÜLTEKIN, SENGÜVEN, AZIZ, HEYDT, BUETTIN, 2017).

Assim como ocorre nos TO, alterações moleculares no MO são raramente investigadas, e sua patogênese molecular permanece incerta. Nesse contexto, o sequenciamento de nova geração (SNG) constitui-se em uma ferramenta valiosa para interrogar simultaneamente várias mutações genéticas em amostras raras. Consiste em um dos métodos usados para traçar o perfil molecular de patologias e já está sendo utilizado para identificar mutações genéticas ou polimorfismos de nucleotídeo único associados a muitas lesões odontogênicas. Portanto ao nosso conhecimento, pela primeira vez essa tecnologia foi utilizada em MO para investigar centenas de mutações do câncer nesta lesão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. MIXOMA ODONTOGÊNICO

O mixoma odontogênico (MO) é uma neoplasia intra-óssea benigna que apresenta agressividade local e altos índices de recidiva. Sua frequência varia entre 1% e 17,7% de todos os tumores odontogênicos (TO). Provavelmente o MO é derivado do mesênquima de um dente em desenvolvimento ou de células mesenquimais indiferenciadas do ligamento periodontal (KANGUR; DAHLIN; TURLINGTON, 1975; SIMON, 2004).

O MO pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais comum entre a segunda e terceira décadas de vida e, histologicamente, é caracterizado por células fusiformes ou estreladas, embebidas em uma matriz extracelular mixóide abundante, contendo pouca quantidade de colágeno. Nos casos em que há maior quantidade de colágeno, pode ser denominado de fibromixoma (SINGARAJU; WANJARI; PARWANI, 2010; EL-NAGGAR et al., 2017).

Na maioria dos casos, o MO mostra predileção pelo sexo feminino. São caracterizados pela sua agressividade devido a capacidade de expansão óssea e infiltração no osso adjacente, podendo ocorrer recidiva após seu tratamento (EL-NAGGAR et al., 2017). O diagnóstico do MO ocorre em exames radiográficos de rotina (LEISER, ABU-EL-NAAJ, PELED, 2009; SINGARAJU; WANJARI; PARWANI, 2010), sendo caracterizados por uma imagem radiolúcida uni ou multilocular, expansão óssea, associada ou não à presença de dentes. Faz-se importante realizar o diagnóstico diferencial com ameloblastomas, queratocistos odontogênicos e cisto ósseo aneurismático (LEISER, ABU-EL-NAAJ, PELED, 2009; SINGARAJU; WANJARI; PARWANI, 2010).

A cirurgia é a sua principal modalidade terapêutica, variando de procedimentos menos invasivos, como curetagem ou mandibulectomia marginal, até ressecções totais (NOFFKE, RAUBENHEIMER, CHABIKULI, BOUCKAERT, 2007, BOFFANO et al, 2011). A curetagem está associada a altas taxas de recorrência, enquanto a cirurgia está associada a deformidade facial significativa e morbidade (MACDONALD-JANKOWSKY, YEUNG, LEE, LI, 2002; LI, SUN, LUO, 2006; LEISER, ABU-EL-NAAJ, PELED, 2009; ODELL; ADEBIYI, 2017; GÜLTEKIN, SENGÜVEN, AZIZ, HEYDT, BUETTIN, 2017; WHO, 2017).

2.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (SNG)

O primeiro método popular de sequenciamento de DNA, foi o método de sequenciamento por terminação de cadeia, conhecido como “sequenciamento de Sanger”(SANGER et al., 1977). O sequenciamento de Sanger foi o método utilizado no Projeto Genoma Humano (PGH), cujo principal objetivo foi o de gerar sequências de DNA de boa qualidade para os cerca de 3 bilhões de pares de bases e identificar todos os genes humanos. O PGH durou 13 anos, ao custo de US\$ 2.7 bilhões (HUMAN GENOME PROJECT), onde ficou evidente a limitação desta técnica em projetos de alta demanda e larga escala, levando o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e baratas para o sequenciamento de genomas (YOHE, THYAGARAJAN, 2017).

A partir de 2005, diversas plataformas de SNG foram surgindo, tornando o sequenciamento em larga escala (HGS – *Hight throughput sequencing*) mais rápido, barato e acessível, fazendo com que o uso desta tecnologia se tornasse cada vez mais parte da rotina de diversos centros de pesquisa e clínicas de diagnóstico de todo o mundo (MARDIS, 2011; GODWIN, MCPHERSON, MCCOMBIE, 2016, YOHE, THYAGARAJAN, 2017). Apesar de se diferenciarem entre si, todos os sequenciadores de nova geração se baseiam no processamento paralelo massivo de fragmento de DNA, podendo ler bilhões de fragmentos ao mesmo tempo. Esta alta capacidade de geração de dados, somada ao desenvolvimento de programas computacionais para leitura e interpretação (*pipelines*) levou o SNG a apresentar um amplo espectro de aplicações na pesquisa científica, sendo utilizado não apenas no estudo do genoma completo (BHATIA; BURTNESS, 2017) , mas também no estudo de um conjunto específico de genes (*target sequencing*) já envolvidos com a doença de interesse através de painéis genéticos (LUBIN et al., 2019), objetivando encontrar alterações em regiões codificantes para os quais se possa atribuir causalidade direta a um fenótipo observado.

Cada tecnologia de sequenciamento possui estratégias diferentes, mas em geral, pode-se identificar etapas comuns entre todos os sequenciadores como: preparo da amostra (onde o DNA é fragmentado de forma aleatória, para que todo o genoma seja coberto uniformemente); amplificação da biblioteca (onde gera-se milhares de cópias de cada fragmento de DNA por PCR para aumentar o sinal a ser captado pelos sequenciadores) e sequenciamento (reações químicas que irão gerar sinais que serão detectados para permitir a determinação da sequência de bases que estão sendo sequenciadas) (VARUZZA, 2013). Dentre os sequenciadores

disponíveis no mercado, destaca-se o sequenciador de bancada da plataforma Ion Torrent PGM™ (Life Technologies, Thermo Scientific), lançada em 2011, direcionada para sequenciamento de pequenos genomas e/ou grupos de genes. A maioria dos sequenciadores utiliza uma DNA polimerase para gerar a fita complementar ao *template*, bases marcadas por fluoróforos e câmeras de detecção, no entanto, no caso do sequenciador da Ion Torrent, este apresenta uma química de sequenciamento totalmente independente de moléculas modificadas, sem uso de nucleotídeos fluorescentes, tornando o equipamento e seus reagentes mais baratos do mercado, uma vez que sua detecção é feita pela variação do pH, que é captada por um transistor e convertida em um sinal elétrico (VARUZZA, 2013).

O Sequenciamento de nova geração tem permitido o estabelecimento do perfil genômico de diversas lesões, tendo se constituído uma ferramenta adicional para entender, classificar e desenvolver novas modalidades terapêuticas dos mais variados tipos de doenças. Nos últimos anos, essa tecnologia vem sendo empregada no estudo de lesões odontogênicas permitindo a identificação de mutações e polimorfismo de nucleotídeo único em ameloblastomas (KURPA et al., 2014, BRUNER et al., 2015), tumor odontogênico adenomatóide (GOMES et al., 2016), cisto odontogênico glandular (SIQUEIRA et al., 2017), queratocistos odontogênico (CHA et al., 2017; FRANÇA et al., 2018) e tumor odontogênico primordial (MIKAMI et al., 2018).

2.3 ALTERAÇÕES MOLECULARES EM LESÕES ODONTOGÊNICAS

Mutações genéticas e polimorfismo de nucleotídeo único em genes que codificam diversos transdutores de sinais de vias moleculares estão sendo identificados em muitas lesões odontogênicas e relacionados à sua patogênese. Kurppa et al. (KURPPA et al., 2014) analisaram 24 amostras de ameloblastomas para a mutação do gene BRAF por sequenciamento de cDNA. A imuno-histoquímica específica do BRAFV600E também foi realizada para os casos em que as secções adequadas do tumor estavam disponíveis. De 24 tumores, 15 (63%) apresentaram mutação BRAFV600E (17909T>A). Apesar das mutações terem sido encontradas em pacientes com diferentes etnias, não houve associação significativa para uma etnia específica. Não foi observada também correlação da mutação BRAF com o sexo ou idade dos pacientes, histologia do tumor, recorrência ou nível de expressão do EGFR ($p>0,1$). De acordo com os autores do trabalho, a presença de mutações ativadoras de BRAF sugere o envolvimento de uma via hiperativa de RAS-RAF-MAPK na patogênese dos ameloblastomas, seja pela sinalização

mediada por EGFR ou por meio de mutações ativadoras do gene BRAF, o que oferece uma justificativa para o planejamento de terapias direcionadas nos casos de ameloblastoma.

O gene BRAF, membro da família RAF Serina/Treonina quinase, é um regulador chave na via MAPK/ERK. A mutação pontual BRAFV600E foi identificada como uma mutação oncogênica comum em melanoma maligno e outras neoplasias malignas e benignas (KATO, LIPPMAN, FLAHERTY & KURZROCK, 2016). Além dos trabalhos realizados por Kupp et al. (KURPPA et al., 2014), estudos mostraram a função oncogênica da mutação BRAFV600E em outros tumores odontogênicos, a exemplo do fibroadenoma ameloblástico, fibroma ameloblástico e carcinoma ameloblástico, como um indutor da sinalização mitogênica (BRUNNER et al, 2015). Em um recente estudo, Cha et al. (CHA et al., 2017) observaram que a mutação BRAFV600E também é encontrada com frequência em ceratocistos odontogênicos e sugerem que outras mutações possam existir nestas lesões.

Devido a ocorrência de relatos na literatura de mutações BRAFV600E nos ceratocistos odontogênicos, França et al. (FRANÇA et al., 2018) avaliaram a incidência desta mutação em um conjunto de 28 ceratocistos odontogênicos. Destes, 20 amostras eram de ceratocistos esporádicos e 8 amostras eram de ceratocistos associados a Síndrome do Carcinoma Basocelular Nevóide (SCBN). Dez amostras dos ceratocistos esporádicos e 08 amostras dos ceratocistos associados a SCBN foram submetidos ao sequenciamento de nova geração (SNG). Nas outras 10 amostras de ceratocistos odontogênicos esporádicos foram avaliadas a mutação BRAFV600E usando o qPCR através do ensaio TaqMan®. Nenhuma das 18 amostras sequenciadas mostrou a mutação BRAFV600E (ou qualquer outro V600). A mutação BRAFV600E foi detectada apenas pelo qPCR em um dos 10 ceratocistos esporádicos avaliados pelo ensaio TaqMan®. Os autores concluíram que o BRAFV600E não desempenha um papel central na patogênese do ceratocisto odontogênico.

Gomes et al. (GOMES et al., 2016) avaliaram amostras do tumor odontogênico adenomatóide (TOA) de um paciente portador da síndrome de Schimmelpenning com múltiplos TOAs e dois TOAs esporádicos para mutações em um painel de 50 oncogenes e genes supressores de tumor, incluindo a família RAS. Os autores também investigaram a mutação KRASG12V em 06 amostras adicionais de TOAs pelo ensaio TaqMan®. A mutação KRAS foi detectada nas três amostras sequenciadas, bem como em quatro das seis amostras adicionais e validada pelo sequenciamento de Sanger. Nenhuma outra mutação patogênica foi detectada. Os

autores ainda determinaram a especificidade da mutação KRASG12V no contexto de tumores odontogênicos avaliando amostras de ameloblastomas, tumores de células fantasmas dentinogênicas e de mucosa oral utilizando o ensaio TaqMan®, sendo todas negativas para a referida mutação. Além da identificação da mutação recorrente de KRASG12V em uma alta proporção de TOAs, os autores encontraram uma deleção, englobando o gene IGF2BP3, cujo papel potencial na tumorigenese ainda está por ser determinado.

Siqueira et al. (SIQUEIRA et al., 2017) investigaram alterações moleculares no cisto odontogênico glandular (COG) utilizando um painel contendo 2856 mutações somáticas previamente descritas em 50 oncogenes e genes supressores de tumor através do sequenciamento de nova geração em uma amostra de conveniência de 07 espécimes de COG fixados e embebidos em parafina. Foram identificadas 06 variantes de nucleotídeo único (SNVs) missenses nos genes TP53 p.Pro72Arg, KDR p.Gln472His, PIK3CA p.Glu689Lys, PIK3CA p.Ala708Thr, KIT p.Met541Leu e TP53 p.Leu289Phe. Os SNVs PIK3CA p.Glu689Lys, PIK3CA p.Ala708Thr e TP53 p.Leu289Phe ocorreram em uma frequência inferior a 5% abaixo do limite de detecção do ensaio. Nenhuma das outras três SNVs filtradas com frequência superior a 5% (TP53 p.Pro72Arg, KDR p.Gln472His e KIT p.Met541Leu) foi relatada como patogênica ou predita como deletéria ou danosa, porém são relatadas como polimorfismo de nucleotídeo único comum (SNPs) no The UCSC Genome Browser. O estudo mostrou a ausência de variantes genéticas com efeito patogênico no COG.

Mikami et al. (MIKAMI et al., 2018) submeteram seis casos de tumor odontogênico primordial (TOP) à análise imunohistoquímica e ao sequenciamento de nova geração (SNG) para investigar sua patogênese e a possível razão da não formação de esmalte e dentina por esta lesão. Foram avaliados 151 genes associados ao câncer, 42 genes associados à odontogênese e o nível da expressão de mRNA por SNG. A expressão de proteínas associadas à amelogênese e dentinogênese foram examinadas através da imuno-histoquímica. Não foram detectadas mutações somáticas em nenhum dos 151 genes associados ao câncer e 42 genes associados à odontogênese ao comparar o resultado do sequenciamento com as sequências gênicas de referência e base de dados de dSNP, ou às sequências gênicas de DNA de tecido estromal. Os autores concluíram que apesar do TOP ser uma lesão de origem odontogênica, sua patogênese é geneticamente diferente das demais lesões. Embora não tenha sido possível elucidar os mecanismos dos defeitos na formação de dentina pelo TOP, os autores enfatizaram a necessidade de um maior acúmulo de dados clínicos, morfológicos e genéticos para este fim.

2.4 ALTERAÇÕES MOLECULARES EM MIXOMAS (ODONTOGÊNICOS)

A patogênese molecular do MO ainda é pouco conhecida e sua natureza clonal ainda é controversa. Gomes et al. (GOMES et al., 2009) avaliaram a clonalidade de tumores odontogênicos baseada no ensaio HUMARA e de acordo com os referidos autores, apesar da maioria dos tumores odontogênicos possuírem uma origem monoclonal, no caso do MO não foi possível estabelecer sua natureza clonal, uma vez que das duas amostras incluídas no estudo, uma revelou monotipia, enquanto a outra amostra revelou policlonalidade (GOMES et al, 2009; GOMES et al, 2011).

Perdigão et al. (PERDIGÃO et al., 2005) rastrearam mutações do gene PRKAR1A em 17 casos de MO de pacientes sem CNC e avaliaram a expressão da proteína PRKAR1A através da imuno-histoquímica nesses espécimes. Mutações da região codificadora do gene PRKAR1A foram identificadas em dois tumores, ambas heterozigotas. Nos dois espécimes observou-se ausência ou diminuição significativa da marcação do PRKAR1A quando comparados com os tecidos normais circundantes. Uma mutação (c.725C>A) levou a substituição de aminoácidos não conservativa em uma área altamente conservada do gene (A213D); outra levou a uma deleção de um único par de bases que levava a um desvio de quadro (del774C) e um códon de parada de 11 aminoácidos a jusante do local da mutação. Sete, dos 15 tumores sem mutações mostraram ausência de PRKAR1A nas células tumorais e uma abundante marcação imuno-histoquímica para a referida proteína. Os autores concluíram que o PRKAR1A pode estar envolvido na patogênese dos MO pela sua regulação negativa, causados por mutações e/ou outros mecanismos genéticos.

Maleszewski, Larsen, Kip et al. (MALESZEWSKI, LARSEN, KIP et al., 2014), avaliaram 103 casos de mixomas cardíacos esporádicos e 07 casos de mixomas cardíacos associados ao Complexo de Carney (CNC), uma síndrome neoplásica endócrina múltipla associada a vários tipos de mixomas, mas não MO, e observaram a ocorrência de alterações no gene PRKAR1A, que codifica a subunidade reguladora de proteína quinase A (PKA), um gene que funciona como supressor de tumores, em ambos os tipos de mixoma cardíacos. Através do sequenciamento de Sanger e da avaliação imuno-histoquímica para a proteína PRKAR1A, respectivamente, observaram que a mutação PRKAR1A é de natureza somática, e que exerce um papel no desenvolvimento de ambas as variantes do mixoma cardíaco tanto ao nível

genético quanto ao nível protéico, uma vez que a expressão de PRKAR1A foi totalmente perdida em todos os tumores associados ao CNC e em 32% dos mixomas cardíacos isolados.

As semelhanças histopatológicas compartilhadas entre mixomas cardíacos e mixomas odontogênicos, juntamente com a escassez de relatos de genes envolvidos na patogênese desta lesão, motivaram Boson et al. (BOSON et al., 1998) a investigar a presença de mutações GNAS em 23 casos de mixomas odontogênicos esporádicos. Os fragmentos genômicos das lesões foram amplificados por meio de PCR. As mutações não foram encontradas em nenhum dos tumores analisados e desta forma os autores concluíram que os mixomas odontogênicos não estão associados à mutações ativadoras do gene GNAS.

Willems et al. (WILLEMS et al., 2009) analisaram uma série de 10 casos de mixomas intramusculares e 10 casos de mixofibrossarcomas de grau I, ambos tumores mesenquimais caracterizados por uma abundante matriz extracelular mixóide, para as mutações GNAS, KRAS e TP53. Mutações ativadoras do GNAS foram encontradas exclusivamente em 50% dos mixomas intramusculares. Não foram detectadas mutações no códon KRAS 12/13 ou no TP53. Os autores concluíram que apesar da sobreposição histológica dos mixomas intramusculares e mixofibrossarcomas de grau I, a análise da mutação GNAS pode ser útil para distinguir as referidas lesões e explicar seu comportamento clínico diversificado, uma vez que diferentes aberrações genéticas moleculares e diferentes composição da MEC foram encontradas em ambas as lesões.

Com o objetivo de verificar a prevalência das mutações do gene GNAS no códon 201 em lesões mixomatosas, como o mixoma intramuscular, mixoma atrial e outras lesões mixóides, Walther et al. (WALTHER et al., 2014), por meio de PCR e sequenciamento direto, analisaram o status da mutação GNAS usando DNA genômico isolado de 97 amostras fixadas e embebidas em parafina, incluindo 63 mixomas intramusculares, 19 casos de outras lesões mixóides, 8 casos de displasia fibrosa esporádica e 07 casos de mixoma atrial. Dentre as lesões mixomatosas apenas foram detectadas mutações do GNAS em 36,5% dos pacientes com mixoma intramuscular, sendo os hotspots mutacionais R201H e R201C igualmente afetados. Mutações do GNAS também foram encontradas em 62,5% das displasias fibrosas. Os autores concluíram que este gene desempenha um papel importante em diferentes vias e procedimentos metabólicos, codificando a subunidade alfa da proteína G, que está expressa de forma onipresente. As mutações no gene GNAS estão associadas a diferentes doenças e podem causar

mudanças significativas na sinalização celular, além de que a análise de tal mutação pode ajudar a distinguir casos de mixofibrossarcoma de baixo grau e mixoma intramuscular.

Em um estudo recente, Bekers et al. (BEKERS et al., 2019) avaliaram um total de 34 amostras de mixoma intramuscular (MI) quanto a presença da mutação no gene GNAS. Destas, 29 amostras foram analisadas utilizando o ensaio TaqMan para detecção de mutações GNAS c.601C>T e c.602G>A em MI e 32 amostras foram avaliadas usando uma nova abordagem baseada no sequenciamento de nova geração empregando sondas de inversão molecular marcada com molécula única (smMIP) para identificar mutações no exon 8 e 9 do GNAS. Foram encontradas mutações GNAS em 57% das amostras analisadas pelo SNG e em 55% das amostras analisadas pelo ensaio TaqMan. Ao combinar os resultados de ambos os testes, 68% das amostras analisadas mostraram presença da mutação no GNAS, sendo esta mutação identificadora deste tipo de mixoma. Os resultados entre os dois ensaios foram comparados quanto a capacidade de detectar mutações no GNAS e, de acordo com os autores do trabalho, tanto o ensaio TaqMan quanto o SNG mostraram um alto grau de concordância na detecção de mutações hotspot GNAS em MI com sensibilidade comparável (BEKERS et al., 2019).

Alterações epigenéticas relacionadas à regulação de genes envolvidos no controle do ciclo celular têm sido descritas em diferentes neoplasias benignas e malignas. Dentre essas, a metilação do DNA é um eficiente mecanismo epigenético de repressão transcricional que promove o remodelamento da cromatina tornando-a menos ou mais acessível à transcrição. Moreira et al. (MOREIRA et al., 2011) investigaram o padrão de metilação dos genes P16 (CDKN2A), P21 (CDKN1A), P27 (CDKN1B), P53 (TP53) e RB1, todos genes supressores de tumores, em MO e polpas dentárias. O estudo revelou que no MO, dentre os genes estudados, apenas os genes P27, P53 e RB1 sofrem hipometilação e que mais estudos são necessários para delinear a importância dessas alterações epigenéticas na patogênese do MO.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar alterações genômicas presentes no MO.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar 2.855 mutações hotspot em 50 oncogenes e genes supressores de tumores em neoplasias humanas no MO;
- Identificar e caracterizar as variantes encontradas, comparando-as em relação às amostras do estudo;
- Identificar os genes com efeito patogênico associados ao MO.
- Descrever e caracterizar as variantes patogênicas, comparando-as em relação a amostra do estudo;

4 METODOLOGIA

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os pacientes selecionados foram informados sobre os objetivos do estudo, tendo a oportunidade de esclarecer quaisquer dúvidas. Foi solicitada a leitura e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) pelo paciente ou responsável, caso concordasse em participar. O paciente também foi informado que durante qualquer etapa do projeto de pesquisa ele teria o direito de desistir e não sofreria nenhuma penalização, nem seriam interrompidos os procedimentos necessários para o término do seu tratamento. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais [CAAE: 30405514.5.0000.5149(Anexo 1)].

4.2 PACIENTES E AMOSTRAS

Foram incluídas no estudo 09 amostras de tecidos com o diagnóstico de mixoma odontogênico. Seis das amostras foram obtidas de tecidos frescos coletadas na clínica de Semiologia e Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG. Os materiais foram obtidos durante os procedimentos cirúrgicos de biópsia. Os fragmentos foram coletados do interior da lesão e acondicionados em criotubos contendo as soluções *RNA later* e *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, CA, EUA), sendo ambos armazenados a - 80°C. Um fragmento adicional de cada amostra foi fixado em formol tamponado a 10%, processado e incluído em parafina para avaliação histopatológica. Três amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina foram recuperadas dos arquivos do serviço de patologia bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal da Bahia. Todos os diagnósticos foram revisados por dois patologistas orais experientes (J.N.S e R.S.G).

4.3 EXTRAÇÃO DE DNA

A extração de DNA das 06 (seis) amostras de tecidos frescos armazenadas em *Tissue-Tek* (Sakura Finetek, CA, EUA) a - 80°C foi realizada utilizando o *Kit Dneasy tissue Kit* (QIAGEN®, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo do fabricante. Para a extração do material genético nas 03 (três) amostras incluídas em parafina, utilizamos o QiAMP DNA FFPE

Tissue Kit (formalina fixed paraffin embedded – FFPE samples; Qiagen Inc., Valência, CA) seguindo o protocolo também do respectivo fabricante.

O DNA resultante de cada amostra foi quantificado com o Qubit® Fluorometer (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) antes do preparo da biblioteca para o sequenciamento de nova geração. A medição da pureza do ácido nucleico foi realizada utilizando o NanoDrop 2000 (ThermoFisher Scientific In., Waltham, MA). As amostras que não atingiram a qualidade necessária para a preparação da biblioteca de DNA foram descartadas.

4.4 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO (SNG)

O sequenciamento de nova geração foi realizado, utilizando um painel (pool de primers) Ion Ampliseq™ Cancer Hotspot Panel v2 (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). O painel foi utilizado em uma PCR multiplex para preparação de bibliotecas de amplicons de regiões genômicas frequentemente mutadas no câncer. Este painel investiga mutações em 207 amplicons dos seguintes 50 genes: SMARCB1, RB1, TP53, ERBB4, FBXW7, BRAF, KIT, GNAS, HRAS, EGFR, PDGFRA, PIK3CA, CDKN2A, ERBB2, ABL1, JAK2, KRAS, NRAS, NOTCH1, ATM, FGFR1, STK11, PTPN11, APC, SMAD4, PTEN, SMO, CTNNB1, RET, IDH2, SRC, EZH2, VHL, MPL, NPM1, FLT3, FGFR3, CDH1, KDR, HNF1A, MLH1, ALK, IDH1, GNAQ, AKT1, JAK3, FGFR2, GNA11, MET e CSF1R.

Inicialmente, no preparo da biblioteca, foi realizada uma reação de PCR para amplificar regiões alvo do DNA genômico, utilizando Ion Ampliseq™ HiFi Mix, Ion Ampliseq™ Primer Pool (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), DNA da amostra e água nuclease-free. Após a termociclagem foi realizada uma digestão parcial das sequências dos primers, adicionando-se o reagente FuPa e submetendo a outra termociclagem. A etapa seguinte consistiu na ligação dos adaptadores aos amplicons, utilizando-se os reagentes Switch Solution, barcode adapter mix e DNA ligase (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), seguida de nova termociclagem. Posteriormente foi realizada a purificação das bibliotecas amplificadas, utilizando o reagente Agencourt® AMPure® XP (Beckman Coulter, Beverly, Ma, EUA), etanol 70% e uma raque magnética. As bibliotecas foram quantificadas por PCR em tempo real, usando Ion Library Quantitation Kit (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), e diluídas a uma concentração de 100 pM.

As amostras foram então amplificadas através de PCR em emulsão no instrumento Ion One Touch 2. Após amplificação, as amostras foram submetidas ao controle de qualidade, usando o teste Ion Sphere™ quality control e aquelas adequadas foram enriquecidas no One Touch™ ES de acordo com as instruções do fabricante. O sequenciamento utilizou Ion 314™ Chip v2 e Ion 316™ Chip v2 no equipamento Ion Personal Genome Machine System - Ion PGMTM System (Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA).

O programa Ion Reporter 5.2 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) foi utilizado para o alinhamento das leituras ao genoma humano (hg19). Variantes missenses e somáticas foram filtradas considerando variantes de nucleotídeo único (SNV), inserções ou deleções, variantes de múltiplos nucleotídeos (MNV) e longas deleções. As variantes resultantes foram visualmente analisadas através do programa Integrative Genomics Viewer- IGV versão 2.3 (Broad Institute, Cambridge, MA) para avaliar a representatividade bidirecional e identificar eventuais falsas variantes (THORVALDSDÓTTIR; ROBINSON; MESIROV, 2013). Selecionamos as variantes que apresentam alta profundidade de sequenciamento (maior que x100) e frequência superior a 10% (SINGH; PATEL, ROUTBORT et al, 2013). As ferramentas online PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2 acessado em <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>) (ADZHUBEI et al., 2010) e SIFT (Sorting Tolerant From Intolerant acessado em <https://sift.bii.a-star.edu.sg/>)(NG; HENIKOFF, 2001) foram usadas para predição do possível impacto funcional da substituição de um aminoácido na constituição da proteína. Variantes eleitas candidatas à validação de Sanger foram estabelecidas como aquelas relatadas na ClinVar (LANDRUM et al., 2016)(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/periodicos.capes.gov.br/clinvar/>) como variantes patogênicas ou aquelas classificadas como prejudicial e não-tolerado pelos escores SIFT (NG; HENIKOFF, 2001) e PolyPhen (ADZHUBEI et al., 2010).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Seis das nove amostras iniciais de MO incluídas em nosso estudo passaram pelas etapas de controle de qualidade após a preparação da biblioteca e foram sequenciadas. Três amostras foram de indivíduos do sexo masculino e três de indivíduos do sexo feminino, variando de 21 a 53 anos de idade (idade mediana: 25 anos). Uma delas estava localizado na maxila e as outras na região de mandíbula posterior. As amostras 01 e 04 de mixomas foram de FFPE, as demais foram de tecido fresco (Tabela 1).

Tabela 1 - Caracterização dos casos de MO sequenciados no estudo

Amostra	Sexo	Idade	Localização	Tipo de Amostra
01	M	22	Mandíbula direita	FFPE
02	M	22	Hemi mandíbula	Tecido fresco
03	F	29	Maxila esquerda	Tecido fresco
04	F	21	Mandíbula direita	FFPE
05	F	53	Mandíbula esquerda	Tecido fresco
06	M	28	Mandíbula direita	Tecido fresco

Fonte: Elaborada pelo autor

5.2 SEQUENCIAMENTO DE NOVA GERAÇÃO

No SNG foram obtidas entre 272,441 a 359,853 reads por amostra. O comprimento médio foi de 119pb. O número de bases sequenciadas variou de 33.158.218 a 40.333,712 e 100% das bases apresentaram valor de qualidade maior igual a 20 ($\geq Q20$) (EWING et al., 1998) (Tabela 02).

Tabela 2 – Resultado das corridas do SNG

Barcode Name	Sample	Bases	≥Q20	Reads	Mean Read Length
IonXpress_011	01	40,333,712	39,241,234	359,853	112 bp
IonXpress_001	02	37,251,563	35,759,983	313,882	136 bp
IonXpress_002	03	36,362,228	34,949,019	309,172	118 bp
IonXpress_008	04	35,717,168	34,097,284	318,263	112 bp
IonXpress_013	05	35,872,226	34,252,801	300,853	119 bp
IonXpress_014	06	33,158,208	31,662,790	272,441	122 bp

Fonte: Elaborada pelo autor

As análises resultaram nas seguintes variantes missense de nucleotídeo único (Tabela 03): PIK3CA p.Ile391Met nas amostras 02, 04 e 06; KIT p.Met541Leu nas amostras 02, 05 e 06; TP53 p.Pro72Arg nas amostras 01, 02, 03, 04, 05 e 06; KDR p.Gln472His nas amostras 01, 02, 03 e 05; SMARCB1 p.Thr72Lys apenas na amostra 03 e JAK3 p.Val722Ile apenas na amostra 04. Após análise de todas as variantes identificadas pelo programa Integrative Genomics Viewer- IGV versão 2.3 (Broad Institute, Cambridge, MA), a variante SMARCB1 p.Thr72Lys identificada na amostra 03 foi excluída e reportamos apenas às demais variantes. Todas as variantes foram preditas como benignas e toleráveis pelos programas PolyPhen e SIFT, respectivamente, à exceção da variante JAK3 p.Val722Ile, ocorrida na amostra 04, que obteve um escore SIFT $\leq 0,05$ em que de acordo com sua classificação a mudança de aminoácido é prevista como prejudicial. Nenhuma variante patogênica foi detectada nos casos estudados. Em todas as 06 amostras sequenciadas foram identificadas variantes de nucleotídeo único missenses que representam um potencial polimorfismo, por apresentarem a frequência do alelo minoritário (MAF) maior que 1%. (Tabela 04).

Tabela 3 – Variantes missense detectadas na coorte de amostras de mixoma odontogênico utilizando painel hotspot de 50 genes do câncer

Caso	Posição	Genes	Frequência (%)	Exon	Transcrito	Variante	Mudança de amino ácido	dbSNP	MAF*
01*	Chr4:55972974	KDR	52.70	11	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	rs1870377	0.235
	Chr17:7579472	TP53	50.73	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
02	chr3:178927410	PIK3CA	26.72	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
	chr4:55593464	KIT	78.65	10	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	rs3822214	0.064
	chr4:55972974	KDR	100	11	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	rs1870377	0.235
	chr17:7579472	TP53	50.64	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
03	chr4:55972974	KDR	52.93	11	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	rs1870377	0.235
	chr17:7579472	TP53	52.21	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
	chr22:24134064	SMARCB1	9,05	2	NM_003073.3	c.215C>A	p.Thhr72Lys	-	-
04*	chr3:178927410	PIK3CA	63.93	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
	chr17:7579472	TP53	48.34	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
	chr19:17945696	JAK3	58.74	16	NM_000215.3	c.2164G>A	p.Val722Ile	rs3213409	0.004
05	chr4:55593464	KIT	51.23	10	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	rs3822214	0.064
	chr4:55972974	KDR	100	11	NM_002253.2	c.1416A>T	p.Gln472His	rs1870377	0.235
	chr17:7579472	TP53	87.68	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398
06	chr3:178927410	PIK3CA	40.23	7	NM_006218.2	c.1173A>G	p.Ile391Met	rs2230461	0.073
	chr4:55593464	KIT	49.85	10	NM_000222.2	c.1621A>C	p.Met541Leu	rs3822214	0.064
	chr17:7579472	TP53	98.68	4	NM_000546.5	c.215C>G	p.Pro72Arg	rs1042522	0.398

*MAF>0.01 (1000 Genomes Project) são consideradas variantes de nucleotídeo único comuns e representam, potenciais polimorfismos

DbSNP, single nucleotide polymorphism database; MAF, minor allele frequency.

Fonte: Elaborada pelo autor

Tabela 4 - Espectro mutacional do MO no sequenciamento da próxima geração

Caso	Posição	Genes	SIFT^a	PolyPhen^b	SNPs comuns na UCSC	ClinVar	Validação Sanger
1*	Chr4:55972974	KDR	Tolerado	Benigno	Sim	Alelo não testado	Não
	Chr17:7579472	TP53	Tolerado	Benigno	Sim	Não patogênico	Não
2	chr3:178927410	PIK3CA	Tolerado	Benigno	Sim	Benigno	Não
	chr4:55593464	KIT	Tolerado	Benigno	Sim	Prov. Benigno	Não
	chr4:55972974	KDR	Tolerado	Benigno	Sim	Alelo não testado	Não
	chr17:7579472	TP53	Tolerado	Benigno	Sim	Não patogênico	Não
3	chr4:55972974	KDR	Tolerado	Benigno	Sim	Alelo não testado	Não
	chr17:7579472	TP53	Tolerado	Benigno	Sim	Não patogênico	Não
	chr22:24134064	SMARCB1	Tolerado	Benigno	Sim	-	Excluída
4*	chr3:178927410	PIK3CA	Tolerado	Benigno	Sim	Benigno	Não
	chr17:7579472	TP53	Tolerado	Benigno	Sim	Não patogênico	Não
	chr19:17945696	JAK3	Prejudicial	Benigno	Não	Não testado	Não
5	chr4:55593464	KIT	Tolerado	Benigno	Sim	Prov. Benigno	Não
	chr4:55972974	KDR	Tolerado	Benigno	Sim	Alelo não testado	Não
	chr17:7579472	TP53	Tolerado	Benigno	Sim	Não patogênico	Não
6	chr3:178927410	PIK3CA	Tolerado	Benigno	Sim	Benigno	Não
	chr4:55593464	KIT	Tolerado	Benigno	Sim	Prov. Benigno	Não
	chr7:7579472	TP53	Tolerado	Benigno	Sim	Não patogênico	Não

Fonte: Elaborada pelo autor

6 DISCUSSÃO

A base molecular da patogênese do MO permanece desconhecida e os estudos moleculares desta entidade ainda estão escassos. Ao nosso conhecimento, esta foi a primeira vez que o SNG foi utilizado para investigar mutações no MO, e desta forma o presente estudo vem a contribuir com a descrição de alterações genéticas para esta lesão. Devido ao fato do MO se tratar de um tumor ectomesenquimal, foi estabelecida uma comparação com sarcomas, uma vez que descobertas recentes em sarcomas apontam para mutações em genes cobertos pelo painel utilizado por nós.

No presente estudo, observou-se em três amostras de MO uma mutação KIT, variante de nucleotídeo único (SNV, Single nucleotide variant) missense, p.Met541Leu. A análise desta variante de acordo com as plataformas SIFT (NG; HENIKOFF, 2001) e PolyPhen (ADZHUBEI et al., 2010), mostrou-se tratar de uma mutação tolerada e benigna, respectivamente. De acordo com o Projeto 1000 Genomas (1000 Genomes Project, 2012), a frequência do alelo minoritário para esta variante (MAF>0,01) sugere polimorfismo genético. As vias de sinalização estimuladas pela proteína KIT controlam muitos processos celulares importantes, como crescimento e divisão celular (proliferação), sobrevivência e movimento (migração), sendo importante também para a função de células como mastócitos e melanócitos. Mutações no gene KIT foram identificadas por Movva et al. (MOVVA et al., 2015) em osteosarcomas e sarcomas sinovial e por Vitiello et al. (VITIELLO et al., 2019) em sarcoma gastrintestinal. Essa mesma mutação foi encontrada por Siqueira et al. (SIQUEIRA et al., 2017) no COG, outra lesão de origem odontogênica, ao utilizar um painel semelhante, porém, como no presente estudo, esta mutação não foi relatada como patogênica ou predita como deletéria ou danosa.

Todas as amostras de MO deste estudo exibiram variante de nucleotídeo único (SNV) missense não patogênico TP53 p.Pro72Arg. Apesar disso, de acordo com a Universidade Californiana Santa Cruz (UCSC) esta variante encontrada está incluída como polimorfismo de nucleotídeo único comum encontrado na população brasileira. O gen TP53 fornece instrução para produção da proteína tumoral p53, que atua como supressora de tumor, regulando a divisão celular, impedindo que a célula prolifere de maneira rápida e descontrolada. Mutações patogênicas neste gene foram descritas em angiossarcoma nos estudos realizados por Italiano

et al. (ITALIANO et al, 2012) e Movva et al. (MOVVA et al, 2015). Karga et al. (KARGA et al., 2000) também não identificaram mutações patogênicas nos genes TP53 ao estudar mixomas cardíacos. Nossos achados, juntamente com os achados de karga et al. (KARGA et al., 2000) é plausível, uma vez que anormalidades neste gene foram descritas em uma variedade de cânceres humanos, mas raramente foram descritas em neoplasias benignas.

No presente estudo, quatro amostras de MO exibiram a variante de nucleotídeo único KDR p.Gln472His. Apesar do significado clínico ainda não ter sido testado, está previsto ser tolerado e benigno pelo SIFT (NG; HENIKOFF, 2001) e PolyPhen (ADZHUBEI et al., 2010) respectivamente. O gene KDR é responsável pela codificação de um dos receptores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGFR), um receptor tirosina quinase tipo III, localizado no cromossomo 4q11-q12, que atua como um mediador da proliferação endotelial induzida pelo VEGF (LU et al, 2000). Movva et al. (MOVVA et al., 2015) identificaram mutações patogênicas no gene KDR em sarcomas pleomórficos indiferenciados, angiossarcomas, sarcoma sinovial e Vitinello et al. (VITINELLO et al., 2019) identificou mutações patogênicas neste gene no sarcoma gastrointestinal. De acordo com a base de dados de mutações em câncer, COSMIC, a maior frequência de mutações neste gene, ocorre em cânceres de tecidos moles (FORBES et al., 2017). No que diz respeito aos mixomas, Sakamoto et al. (SAKAMOTO et al., 2004) identificaram a expressão do gene KDR em mixomas cardíacos e Bologna-Molina et al. (BOLOGNA-MOLINA et al., 2015) observaram que no MO existe uma imunoe expressão significativa do VEGF, embora os autores não tenham investigado uma possível expressão do gene KDR nessas lesões. Apesar do tamanho de nossa amostra ter sido pequena e não podermos afirmar com veemência que esta variante está relacionada com o desenvolvimento do mixoma odontogênico, essa possibilidade não pode ser descartada.

Uma outra variante missense encontrada pelo sequenciamento de nova geração em três casos de MO estudados por nós, foi a mutação em PIK3CA p.Ile391Met. Esta mutação de acordo com os preditores PolyPhen (ADZHUBEI et al., 2010) e ClinVar (LANDRUM et al., 2016) é dita como benigna e toletada pelo SIFT (NG; HENIKOFF, 2001). A sinalização mediada pelo PIK3 é importante para muitas atividades celulares, incluindo crescimento e divisão celular (proliferação), movimento de células (migração), produção de novas proteínas, transporte de materiais dentro das células e sobrevivência celular (ZHAO; VOGT, 2008). Mutações neste gene resultam na produção de uma subunidade p110 α alterada que permite que

a PIK3 sinalize sem regulação, contribuindo para uma proliferação descontroladas de células, e que juntamente com outras mutações combinadas em outros genes possam levar ao desenvolvimento do câncer. Movva et al. (MOVVA et al., 2015) identificou a mutação PIK3CA em 04 casos de lipossarcomas mixóides e em 01 caso de lipossarcoma pleomórfico de alto grau e em um estudo recente, Niklander et al. (NIKLANDER et al., 2019) identificou a mesma mutação no carcinoma amelobástico.

Uma das amostras de MO apresentou mutação no JAK3 p.Val722Ile. Esta variante de nucleotídeo único ocorre na região que corresponde ao domínio da proteína quinase 1 do JAK3. De acordo com a plataforma SIFT é predito como prejudicial (NG; HENIKOFF, 2001), porém benigno pelo PolyPhen (ADZHUBEI et al., 2010). Apesar desta mutação não estar incluída no banco de dados de SNPs comuns da UCSC, provavelmente represente um SNP, uma vez que a frequência do menor alelo foi maior que 1% (1000 Genomes Project, 2012). A proteína JAK3 faz parte da via JAK/STAT, cuja função é transmitir sinais que regulam o crescimento e a maturação de células T, células B e células natural killer, ajudando a regular todo o sistema imunológico. A maioria das mutações neste gene impede a produção da proteína JAK3 ou resulta em uma proteína instável, rapidamente quebrada, levando a escassez de células protetoras do organismo, deixando-o susceptível a infecções (PESU et al., 2005). Mutações em JAK3 foram descritas em lipossarcomas mixóides (MOVVA et al, 2015) e já foi relatado como germinativo em outros tumores. Como a amostra cuja mutação JAK3 identificada foi em uma amostra de FFPE, composta exclusivamente pelo tumor, não foi possível interrogar se esta mutação ocorreu no DNA da linhagem germinativa desse paciente.

No presente estudo, apesar do painel utilizado incluir as mutações hotspot no GNAS1, nenhuma variante foi detectada neste gene em nossas amostras. Estes achados corroboram com os resultados negativos de mutações no GNAS1 em mixomas odontogênicos realizados em estudos anteriores (BOSON et al., 1998). Mutações no GNAS1 foram implicadas na patogênese do mixoma intramuscular (WILLEMS et al, 2009; BEKERS et al., 2019), podendo explicar seu comportamento clínico e também servindo para diferenciá-lo de outros tipos de mixomas, uma vez que existem a sobreposição histopatológica entre eles, dificultando seu diagnóstico. O gene GNAS1 codifica a subunidade alfa da proteína G, e mutações ativadoras somáticas neste gene levam ao aumento dos níveis de AMPc e ativação da proteína quinase A e da via MAPK, aumentando a transcrição da proteína c-Fos, que está envolvida no crescimento e na inibição da apoptose (BEKERS et al., 2019).

Os resultados do SNG utilizando este painel não identificou nenhuma variante no gene KRAS em mixomas odontogênicos, entretanto mutações neste gene foram implicadas na patogênese de outros tipos de mixomas, a exemplo de um subgrupo de mixomas cardíacos (KARGA et al, 2000). De acordo com os autores Karga et al. (KARGA et al, 2000), 03 casos de 19 mixomas cardíacos estudados, expressaram um alto nível de proteínas p21-ras, sendo que em dois desses casos foram identificadas mutações missense nos genes RAS, sugerindo que os oncogenes RAS podem ter papel na patogênese desses tumores. A mutação do gene RAS é relativamente comum tanto em neoplasias malignas como benignas, ocorrendo frequentemente em adenomas de cólon, adenoma e/ou carcinoma de tireóide, sendo a mutação de RAS considerada um evento precoce no desenvolvimento de algumas neoplasias. Dentre as lesões odontogênicas, os estudos de Gomes et al. (GOMES et al., 2016) detectaram pela primeira vez uma mutação recorrente em KRAS (KRASG12V) nos tumores odontogênicos adenomatóides e uma deleção englobando o gene IGF2BP3, cujo seu papel na tumorigênese ainda está por ser elucidado. Os autores também investigaram, porém não encontraram, esta mutação em ameloblastomas e tumores de células fantasmas dentinogênicas.

Apesar de Perdigão et al. terem identificado mutações no gene PRKAR1A em dois espécimes de MO e concluírem que tais mutações podem estar envolvidas na patogênese do MO pela sua regulação negativa (PERDIGÃO et al., 2005), o painel utilizado em nosso estudo não incluiu a investigação de mutações neste gene. Isso mostra a necessidade de mais estudos como este utilizando um painel com uma cobertura maior ou até mesmo o sequenciamento completo do exoma desta lesão para maiores esclarecimentos a respeito da patogênese do mixoma odontogênico.

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente estudo mostrou que variantes genéticas potencialmente patogênicas em genes mutados no câncer cobertos por este painel não são encontrados em MO.

É possível que os MO exibam mutação em outros genes não incluídos no painel alvo utilizado neste estudo.

Foram identificados polimorfismo de nucleotídeo único em todas as amostras de MO investigadas e é possível que tais SNVs possam exercer papel específico no contexto da patogênese desta lesão.

Estudos futuros, como o sequenciamento completo do exoma do MO, poderiam revelar alterações genômicas ainda não encontradas que fundamentem a sua patogênese.

REFERÊNCIAS

- 1000 GENOMES PROJECT CONSORTIUM, ABECASIS, G. et al. An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes. *Nature*, v. 491, n. 7422, p. 56–65, 2012.
- ADZHUBEI, I. et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. **Nat Methods**, v. 7, n. 4, p. 248–9, 2010.
- BHATIA, A.; BURTNESSE, B. Novel molecular targets for chemoprevention in malignancies of the head and neck. *Cancers*, v. 9, n. 9, 2017.
- BEKERS et al. Identification of novel GNAS mutations in intramuscular myxoma using next-generation sequencing with single-molecule tagged molecular inversion probes. **Diagnostic Pathology**, 2019, Vol.14
- BOLOGNA-MOLINA R, MOSQUEDA-TAYLOR A, DOMÍNGUEZ-MALAGÓN H, SALAZAR-RODRÍGUEZ S, TAPIA G, GÓNZALEZ-GÓNZALEZ R, MOLINA-FRECHERO N. Immunolocalization of VEGF-A and orosomucoid-1 in odontogenic myxoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2015;56(2):465-73.
- BOSON WL, GOMEZ RS, ARAUJO L, KALAPOTHAKIS E, FRIEDMAN E, DE MARCO L. Odontogenic myxomas are not associated with activating mutations of the Gs alpha gene. **Anticancer Res**. 1998;18(6A):4415-7.
- BROWN NA, ROLLAND D, MCHUGH JB, WEIGELIN HC, ZHAO L, LIM MS et al. 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:e77–8.
- BUCHNER A, MERRELL PW, CARPENTER WM. Relative frequency of central odontogenic tumors: a study of 1,088 cases from Northern California and comparison to studies from other parts of the world. **J Oral Maxillofac Surg**. 2006;64(9):1343-52.
- BP, GALLESIO C, BARRECA A, BIANCHI FA, GARZINO-DEMO P, Roccia F. Surgical treatment of odontogenic myxoma. **J Craniofac Surg**. 2011;22:982-7.
- CHA YH, CHO ES, KANG HE, KO J, NAM W, KIM HJ, et al. Frequent oncogenic BRAF V600E mutation in odontogenic keratocyst. **Oral Oncol**. Elsevier; 2017;74(April):62–7.
- EL-NAGGAR A. K. et al. **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4rd. ed. Lyon, France: IARC, 2017.
- EWING B, HILLIER L, WANDL MC, GREEN P. Base-calling of automated sequencer traces using phred. Accuracy assessment. **Genome Research**. 1998; 8(3): 175-185.
- FORBES, S. et al. Cosmic: somatic cancer genetics at high-resolution. **Nucleic Acids Res.**, v. 45, n. D1, p. D777–D783, 2017.

FRANÇA JA, DE SOUSA SF, DINIZ, MG ET AL. Absence of BRAFV600E mutation in odontogenic keratocysts. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, 2018, Vol.47 (2), p.186-192

GOMES CC, OLIVEIRA CDAS, CASTRO WH, DE LACERDA JC, GOMEZ RS. Clonal nature of odontogenic tumours. **J Oral Pathol Med** 2009;38:397-400.

GOMES CC, DINIZ MG, DUARTE AP, BERNARDES VF, GOMEZ RS. Molecular review of odontogenic myxoma. **Oral Oncol**. 2011;47:325-328.

GOMES CC, DE SOUSA SF, DE MENEZES GH, DUARTE AP, PEREIRA TDOS S, MOREIRA RG, DE CASTRO WH, VILLACIS RA, ROGATTO SR, DINIZ MG, GOMEZ RS. Recurrent KRAS G12V pathogenic mutation in adenomatoid odontogenic tumours. **Oral Oncol**. 2016;56:e3-5

GOODWIN, S.; MCPHERSON, J. D.; MCCOMBIE, W. R. Coming of age: Ten years of next-generation sequencing technologies. **Nature Reviews Genetics**, v. 17, n. 6, p. 333–351, 2016.

GÜLTEKIN SE, SENGÜVEN B, AZIZ R, HEYDT C, BUETTIN R. Molecular Profiling of Odontogenic Tumors - Pilot Study. **Balk J Dent Med**, Vol 21, 2017

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

HUMAN GENOME PROJECT COMPLETION: Disponível em: <http://www.genome.gov/human.genome.project>. NHGRI. NIH. Acesso em: Maio de 2019.

ITALIANO, A et al.. Alterations of the p53 and PIK3CA/AKT/mTOR pathways in angiosarcomas: a pattern distinct from other sarcomas with complex genomics. **Cancer**. 2012;118:5878–5887.

KANGUR TT, DAHLIN CD, TURLINGTON, EG. Tumores mixomatosos das mandíbulas. **J Oral Surg**. 1975; 33 : 523-8.

KARGA H, PAPAIOANNOU P, KARAYIANNI M, PAPADIMITRIOU K, PRIFTIS D, VOJUKLAKIS T, MIGDOU B, NANAS J, PAPAPETROU P. Ras oncogenes and p53 tumor suppressor gene analysis in cardiac myxomas. **Pathol Res Pract**. 2000;196(9):601-5.

KATO S, LIPPMAN SM, FLAHERTY KT, KURZROCK R. The Conundrum of Genetic “Drivers” in Benign Conditions. **J Natl Cancer Inst**. 2016;108 (8): djw036

KUMAMOTO H. Molecular pathology of odontogenic tumor. **J Oral Pathol Med** (2006) 35:65–74

KURPPA KJ, CATÓN J, MORGAN PR, RISTIMÄKI A, RUHIN B, KELLOKOSKI J, ELENUS K, HEIKINHEIMO K. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **J Pathol**. 2014;232(5):492-8.

LAZEBNIK Y. What are the hallmarks of cancer? **Nat Rev Cancer**. Nature Publishing Group; 2010;10(4):232–3.

LEISER Y, ABU-EL-NAAJ I, PELED M. Odontogenic myxoma: a case series and review of the surgical management. **J Craniomaxillofac Surg**. 2009;37:206-9.

LANDRUM, M. et al. Clinvar: public archive of interpretations of clinically relevant variants. **Nucleic Acids Res.**, v. 44, n. D1, p. D862-8, 2016.

LI TJ, SUN LS, LUO HY. Odontogenic myxoma: a clinicopathologic study of 25 cases. **Arch Pathol Lab Med**. 2006;130:1799-806.

LU D, KUSSIE P, PYTOWSKI B, PERSAUD K, BOHLEN P, WITTE L, ZHU Z. Identification of the residues in the extracellular region of KDR important for interaction with vascular endothelial growth factor and neutralizing anti-KDR antibodies. **J Biol Chem**. 2000; 275: 14321-30.

LUBIN, J., DANIEL ; TOORENS, J., ERIK ; ZHANG et al. Adenomyoepitheliomas of the breast frequently harbor recurrent hotspot mutations in PIK3-AKT pathway related genes and a subset show genetic similarity to salivary gland epithelial-myoeplithelial carcinoma. **The American Journal of Surgical Pathology**, 2019, Vol.43(7), pp.1005-1013

MACDONALD-JANKOWSKY DS, YEUNG R, LEE KM, LI TKL. Odontogenic myxoma in the Hong Kong Chinese: clinico radiological presentation and systematic review. **Dentomaxillofac Radiol** 2002;21:71-83

MALESZEWSKI JJ, LARSEN BT, KIP NS, CASTONGUAY MC, EDWARDS WD, CARNEY JA, KIPP BR. PRKAR1A in the development of cardiac myxoma: a study of 110 cases including isolated and syndromic tumors. **Am J Surg Pathol**. 2014;38(8):1079-87.

MARINO-ENRIQUEZ A, FLETCHER CD. Shouldn't we care about the biology of benign tumours? **Nat Rev Cancer**. 2014;14(11):701-2.

MARTÍNEZ-MATA G, MOSQUEDA-TAYLOR A, CARLOS-BREGNI R, DE ALMEIDA OP, CONTRERAS-VIDAURRE E, VARGAS PA, CANO-VALDÉZ AM, DOMÍNGUEZ MALAGÓN H. Odontogenic myxoma: clinico-pathological, immunohistochemical and ultrastructural findings of a multicentric series. **Oral Oncol**. 2008;44(6):601-7.

MIKAMI T, BOLOGNA-MOLINA R, PEREIRA-PRADO V, et al. Pathogenesis of primordial odontogenic tumour based on tumourigenesis and odontogenesis. **Oral Diseases**, 2018, Vol.24 (7), p.1226-1235

MOREIRA PR, CARDOSO FP, BRITO JA, BATISTA AC, GOMES CC, GOMEZ RS. Hypomethylation of tumor suppressor genes in odontogenic myxoma. **Braz Dent J**. 2011;22(5):422-7

MOVVA S, WEN W, CHEN W, MILLIS SZ, GATALICA Z, REDDY S, VON MEHREN M, VAN TINE BA. Multi-platform profiling of over 2000 sarcomas: identification of biomarkers and novel therapeutic targets. **Oncotarget**. 2015;6(14):12234-47.

NIKLANDER et al. Identification OF novel copy number alterations in ameloblastoma and ameloblastic carcinoma from nigeria. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology & Oral Radiology**, 2019, Vol.128 (1), p.e45

NG, P.; HENIKOFF, S. Predicting deleterious amino acid substitutions. **Genome Res**, v. 56 11, n. 5, p. 863–74, 2001.

NOFFKE CE, RAUBENHEIMER EJ, CHABIKULI NJ, BOUCKAERT MM. Odontogenic myxoma: review of the literature and report of 30 cases from South Africa. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**. 2007;104:101-9.

PEACHOCK ZS; COX D; SCHMID BLS. Involvement of PTCH1 mutations in the calcifying epithelial odontogenic tumor. **Oral Oncology**, Vol 46, Issue 5, May 2010, p 387-392.

PERDIGÃO PF, STERGIPOULOS SG, DE MARCO L, MATYAKHINA L, BOIKOS SA, GOMEZ RS, PIMENTA FJ, STRATAKIS CA. Molecular and immunohistochemical investigation of protein kinase a regulatory subunit type 1A (PRKAR1A) in odontogenic myxomas. **Genes Chromosomes Cancer**. 2005;44(2):204-11.

PESU et al. Jak3, severe combined immunodeficiency, and a new class of immunosuppressive drugs. **Immunol Rev**. 2005 Feb;203:127-42

REICHART PA, PHILIPSEN HP. Odontogenic tumors and allied lesions. London, UK: **Quintessence Publishing**, 2004; 41–332

SANGER F, NICKLEN S, COULSON AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(12):5463-5467.

SAKAMOTO H1, SAKAMAKI T, KANDA T, TSUCHIYA Y, SATO M, SATO H, OYAMA Y, SAWADA Y, TAMURA J, NAGAI R, KURABAYASHI M. Vascular endothelial growth factor is an autocrine growth factor for cardiac myxoma cells. **Circ J**. 2004;68(5):488-93.

SINGH RR, PATEL KP, ROUTBORT MJ, et al. Clinical validation of a next-generation sequencing screen for mutational hotspots in 46 cancer-related genes. **J Mol Diagn** 2013; 15: 607–622.

SIQUEIRA EC ; DE SOUSA SF; FRANÇA JA; DINIZ M; ET AL. Targeted next-generation sequencing of glandular odontogenic cyst: a preliminary study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology & Oral Radiology**, 2017, Vol.124 (5), p.490-495.

SINGARAJU S, WANJARI SP, PARWANI RN. Odontogenic myxoma of the maxilla: A report of a rare case and review of the literature. **J Oral Maxillofac Pathol**. 2010;14:19-23.

SIMON ENM, MERKX MAW, VUHAHULA E, NGASSAPA D, STOELINGA PJW. Odontogenic myxoma: a clinicopathological study of 33 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2004;33:333–7.

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

TAKATA T; SLOOTWEG PJ. Odontogenic myxoma/myxofibroma. In: El-Naggar, A.K., Chan, J.K.C., Grandis, J.R., Takata, T., Slootweg PJ (Eds). **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4th ed. Lyon; 2017. 205.

THORVALDSDÓTTIR H, ROBINSON JT, MESIROV JP. Integrative Genomics Viewer (IGV): High-performance genomics data visualization and exploration. **Brief Bioinform**. 2013;14(2):178-192. doi:10.1093/bib/bbs017.

VARUZZA, L. Introdução à análise de dados de sequenciadores de nova geração. Versão 2.0.1. 2013.

VITIELLO et al. Differential immune profiles distinguish the mutational subtypes of gastrointestinal stromal tumor. **Journal of Clinical Investigation**, 2019, Vol.129(5), p.1863(15)

WALTHER I, WALTHER BM, CHEN Y, PETERSEN I. Analysis of GNAS1 mutations in myxoid soft tissue and bone tumors. **Pathol Res Pract**. 2014;210(1):1-4

WILLEMS SM, et al. Cellular/intramuscular myxoma and grade I myxofibrosarcoma are characterized by distinct genetic alterations and specific composition of their extracellular matrix. **J Cell Mol Med**. 2009;13(7):1291-30

YOHE, SOPHIA ; THYAGARAJAN, BHARAT. Review of clinical next-generation sequencing. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2017, Vol.141 (11), p.1544-1558

ANEXO 1. Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética e Pesquisa (COEP)



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

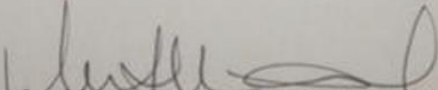
Projeto: CAAE – 30405514.5.0000.5149

Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez
Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia
Odontológicas
Faculdade de Odontologia- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de maio de 2014, o projeto de pesquisa intitulado "**Avaliação de alterações moleculares em Tumores Odontogênicos**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Prof. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG