



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA**

PAULA ASSUNÇÃO NOVAIS

**AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF V600E EM
AMELOBLASTOMAS**

Aracaju

2019

PAULA ASSUNÇÃO NOVAIS

**AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF V600E EM
AMELOBLASTOMAS**

Monografia apresentada ao Departamento de Odontologia como requisito parcial à conclusão do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe para obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

Área de concentração: Estágio em Clínica Odontológica Integrada.

Orientadora: Profa. Dra. Sílvia Ferreira de Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva

Aracaju

2019

PAULA ASSUNÇÃO NOVAIS

**AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF V600E EM
AMELOBLASTOMAS**

Aracaju, ___/___/_____

Monografia aprovada como requisito parcial à conclusão do Curso de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe para obtenção do grau de cirurgião-dentista.

Prof. Dr. Luiz Carlos Ferreira da Silva
Universidade Federal de Sergipe
Co-orientador

1º Examinador

2º Examinador

Aos meus pais.

AGRADECIMENTOS

Aos meu pais, por sempre estarem presentes com muito amor e por não medirem esforços para que eu chegasse até esta etapa da minha vida.

A Thomas Sales, por ter estado comigo nessa jornada, com amor, dedicação, admiração e apoio incondicional.

Aos meus tios, avó e sogra, pelo amor, confiança e incentivo constantes.

Aos meus amigos, pelos momentos de diversão que tornaram mais leve essa jornada.

À profa. Ignez Aurora, pela amizade, carinho, atenção e gentileza.

À minha orientadora, Profa. Sílvia Ferreira de Sousa, pela paciência, ensinamentos e confiança. Posso dizer que a minha formação, inclusive pessoal, não teria sido a mesma sem a senhora, obrigada por ser um exemplo.

Ao Prof. Luiz Carlos Ferreira da Silva, por ter aceitado ser meu co-orientador e pela sua atenção.

Ao Prof. Roque Pacheco e sua equipe, por terem nos disponibilizado seu laboratório para a realização de parte desse estudo, tornando possível minha prática na pesquisa. Assim como ao Serviço de Patologia da Universidade Federal de Sergipe.

Ao mestrando Lucas Santana, pelos ensinamentos e conhecimentos transmitidos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia da Universidade Federal de Sergipe.

EPÍGRAFE

Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota no mar.

Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

AVALIAÇÃO DA MUTAÇÃO BRAF V600E EM AMELOBLASTOMAS. NOVAIS, Paula Assunção; de SOUSA Silvia Ferreira. Aracaju, 2019.

O ameloblastoma é um tumor odontogênico benigno que apresenta, devido à sua frequência e comportamento, alta relevância clínica. De origem epitelial, assemelha-se, histologicamente, ao órgão do esmalte, sendo caracterizado pelo seu crescimento lento, comportamento agressivo com alto poder infiltrativo e, conseqüentemente, elevada capacidade de recidiva. Seu tratamento é realizado através da ressecção cirúrgica, que irá ocasionar ao paciente deformidade facial e elevado risco de morbidade. Para reduzir os impactos desse tratamento invasivo, pesquisadores têm investigado constantemente a patogênese dos ameloblastomas sólidos e unicísticos, tendo sido encontrada a mutação BRAF V600E em altas frequências nas amostras, a qual também está presente na carcinogênese do melanoma, cânceres de tireoide e colorretal. A presença da mutação pode ser acessada por meio de técnicas sensíveis de investigação, como o PCR aleloespecífico, ou o sequenciamento de Sanger, bem como por meio da identificação da oncoproteína BRAF mutada, com o uso da imunohistoquímica (IHQ). A IHQ é uma técnica mais simples, econômica e já utilizada para avaliação da mutação, bem como da correlação do *status* BRAF V600E com características clínicas dos ameloblastomas. Neste contexto, diante das implicações clínicas da mutação BRAF V600E no tratamento ou comportamento do ameloblastoma e ausência de dados sobre essa mutação nos tumores do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU/UFS), este estudo se propôs a investigar a frequência da mutação BRAF V600E em ameloblastomas do HU/UFS. Foi feita uma busca de blocos de parafina e dados clínicos de amostras do Laboratório de Patologia do HU/UFS e os tumores encontrados foram submetidos a cortes histológicos para análise IHQ com anticorpo anti-BRAFV600E. Das 8 amostras de ameloblastoma encontradas, 62,5% mostraram positividade para a mutação BRAF V600E. Além disso, a média de idade encontrada foi de 27 anos (pacientes mais jovens), havendo predileção pelo sexo feminino e predomínio na região posterior da mandíbula (60%). A alta frequência de mutação encontrada é semelhante aos resultados da literatura e apontam para a possibilidade de uso de uma terapia personalizada em determinados casos de ameloblastoma.

Descritores: Ameloblastoma. Imunohistoquímica. Mutação.

ABSTRACT

EVALUATION OF THE BRAF V600E MUTATION IN AMELOBLASTOMAS. NOVAIS, Paula Assunção; de SOUSA Silvia Ferreira. Aracaju, 2019.

Ameloblastoma is a benign odontogenic tumor that, due to its frequency and behavior, has high clinical relevance. Of epithelial origin, it resembles, histologically, the enamel organ, being characterized by its slow growth, aggressive behavior with high infiltrative power and, consequently, high recurrence capacity. Its treatment is performed through surgical resection, which will cause face deformity and high risk of morbidity to the patient. To reduce the impact of this invasive treatment, researchers have been constantly investigating solid and unicystic ameloblastomas pathogenesis. The BRAF V600E mutation was found in high frequencies in the samples, which is also present in melanoma, thyroid and colorectal cancers carcinogenesis. The presence of the mutation can be accessed through sensitive research techniques, such as allele specific PCR, or Sanger sequencing, as well as through mutated BRAF oncoprotein identification, with the use of immunohistochemistry (IHC). IHQ is a simpler, economical and already used technique for evaluation of the mutation as well as the correlation of the BRAF V600E status with clinical features of ameloblastomas. In this context, in view of BRAF V600E mutation clinical implication in the treatment or behavior of ameloblastoma and absence of data on this mutation in tumors of the University Hospital of the Federal University of Sergipe (HU / UFS), this study intends to investigate the BRAF V600E mutation frequency in the HU / UFS ameloblastomas. A paraffin block search and clinical data from HU / UFS Pathology Laboratory samples and bone tumors were used for histological examinations for IHQ analysis with the anti-BRAFV600E antibody. Of the 8 ameloblastoma samples found, 62.5% were positive for the BRAF V600E mutation. In addition, the average age was 27 years, with a predilection for females and predominance in the posterior region of the mandible (60%). The high frequency of mutations is found in the literature and points to the possibility of using a follow-up therapy in cases of ameloblastoma.

Key-Words: Ameloblastoma. Immunohistochemistry. Mutation.

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 resultante da substituição do aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E) no códon 600
ERK	Via da quinase regulada por sinal extracelular
HE	Hematoxilina-eosina
HU	Hospital Universitário
IHQ	Imunohistoquímica
MAPK	Via da proteína quinase ativada por mitógeno
MEK	Proteína da via intracelular derivada da quinase específica para serina/treonina envolvida na via MAPK
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação de cadeia em polimerase
qPCR	PCR em tempo real
RAF	Proteína quinase específica para serina/treonina na via MAPK
RAS	Proteína quinase específica para serina/treonina na via MAPK
UFS	Universidade Federal de Sergipe

LISTA DE E FIGURAS E TABELAS

Figura 1 – Componentes da via de sinalização MAPK e locais de atuação das drogas alvo-moleculares.....	17
Tabela 1 – Padronização imunohistoquímica para o anticorpo primário usado no estudo	20
Tabela 2 – Dados clínicos correspondentes aos casos de ameloblastomas coletados	21
Figura 2 – Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em amostras de ameloblastoma	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 AMELOBLASTOMA	12
2.2 A MUTAÇÃO BRAF V600E.....	14
2.3 VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK / ERK.....	16
3 OBJETIVOS	18
3.1 OBJETIVO GERAL	18
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
4 METODOLOGIA.....	18
4.1 DESENHO DE ESTUDO	18
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	19
4.3 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS.....	19
4.4 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	19
4.5 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	20
5 RESULTADOS	21
6 DISCUSSÃO	23
7 CONCLUSÃO.....	26
REFERÊNCIAS	27
ANEXOS	32

1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é uma neoplasia odontogênica de origem epitelial, que se assemelha histologicamente ao órgão do esmalte. Apresenta crescimento lento, assintomático e localmente invasivo. Dentre os tumores odontogênicos, é o que apresenta maior incidência, sendo, aproximadamente, 1% de todos os tumores orais. É classificado em multicístico (sólido ou convencional), unicístico e periférico (extraósseo), apresentando esse último baixa frequência (BORAKS, 2011).

O ameloblastoma sólido não apresenta predileção por sexo, sendo mais frequente entre as quarta e quinta décadas de vida e na população negra, estando presente em, aproximadamente 80% dos casos, na região posterior da mandíbula. Apesar do seu lento crescimento, pode atingir um tamanho considerável, além de ocasionar deformidade facial, má oclusão, dificuldade de mastigação e respiratória, podendo, inclusive, levar à morte. Radiograficamente, apresenta-se como múltiplas lesões radiolúcidas, sendo comum a ocorrência de reabsorções radiculares e perfuração da cortical óssea, possuindo aspectos de “bolha de sabão” ou “favos de mel” (SANTOS *et al.*, 2014; NEVILLE, 2017).

Assim como o anterior, o ameloblastoma unicístico também se encontra, na maioria dos casos, localizado na região posterior da mandíbula. No entanto, metade dos casos ocorre com pacientes na segunda década de vida, estando relacionados com a impacção do terceiro molar. Provoca expansão lenta e assintomática da mandíbula e, radiograficamente, apresenta-se como lesão radiolúcida bem definida, sendo frequente a ocorrência de reabsorção radicular e perfuração cortical (EL-NAGAR *et al.*, 2017).

Com o objetivo de melhor compreender a patogênese desse tumor odontogênico e reduzir a agressividade no tratamento do ameloblastoma, pesquisadores identificaram, desde 2014, a presença da mutação BRAF V600E em alta frequência em ameloblastomas sólidos e unicísticos (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016).

O gene BRAF é um oncogene e faz parte da via de sinalização MAPK (Mitogen Activated Protein Kinase), a qual é responsável por regular o crescimento, proliferação, sobrevivência e morte celular (JHAMB; KRAMER, 2014). Logo, mutações no gene BRAF alteram esse equilíbrio, podendo ocasionar o surgimento de neoplasias, sendo a mutação BRAF V600E já identificada como uma mutação tipo driver em tumores benignos e

malignos, como melanomas, câncer de tireoide e colorretal (HUSSAIN *et al.*, 2015). Devido ao seu alto poder de invasão local e de recidivas, o tratamento de eleição dos ameloblastomas é a ressecção cirúrgica, causando ao paciente, deformidade facial e considerável risco de morbidade (GOMES *et al.*, 2014). A identificação recorrente da mutação BRAF V600E em ameloblastomas, pode assim, possibilitar o uso de uma droga-alvo específica para essa mutação, melhorando o tratamento, reduzindo a possibilidade de recidivas, deformidade facial e morbidade. Alguns estudos clínicos têm sido já utilizados no tratamento do ameloblastoma por meio de inibidores alvo da via MAPK, quando na detecção da mutação, com resultados interessantes (KAYE *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018).

Diante da alta ocorrência descrita na literatura da mutação BRAF V600E em ameloblastomas e da relevância dessa mutação inclusive para o uso de novas modalidades terapêuticas, esse estudo se propõe a investigar a frequência da mutação BRAF V600E por meio da análise da oncoproteína BRAF V600E em ameloblastomas de um mesmo Serviço de Aracaju, possibilitando assim, um conhecimento da frequência dessa mutação nessa amostra.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMELOBLASTOMA

O ameloblastoma é um tumor odontogênico benigno que apresenta, devido à sua frequência e comportamento, alta relevância clínica. De origem epitelial, suas células assemelham-se aos ameloblastos, que são células responsáveis pela deposição do esmalte nos dentes em desenvolvimento. É caracterizado pelo seu crescimento lento, comportamento agressivo, com alto poder localmente infiltrativo e, conseqüente, capacidade de recidiva elevada, sendo, no entanto, sua etiologia não bem definida. (JHAMB; KRAMER, 2014). Segundo a classificação de 2017 dos tumores odontogênicos da Organização Mundial de Saúde (OMS) (EL-NAGAR *et al.*, 2017), o ameloblastoma é dividido em 3 subtipos: ameloblastoma sólido/multicístico, ameloblastoma unicístico e ameloblastoma periférico, sendo o último de rara incidência.

O ameloblastoma sólido é o que apresenta maior ocorrência, sendo seu pico de incidência em pacientes entre a 4ª e 5ª décadas de vida e maior frequência em indivíduos negros, não apresentando predileção significativa por sexo (HEIKINHEIMO *et al.*, 2014; SANTOS *et al.*, 2014). Geralmente assintomático, costuma apresentar-se como uma tumefação indolor com expansão dos ossos gnáticos, principalmente na região posterior da mandíbula (cerca de 80-85% dos casos) (SHISART *et al.*, 2018). Seu crescimento não controlado pode ocasionar perda de dentes, má-oclusão, dor, deformidade facial, limitação da abertura bucal, dificuldade de mastigação e, até mesmo, obstrução da passagem de ar, chegando a ser fatal. Radiograficamente, apresenta-se como múltiplas áreas radiolúcidas que se assemelham a “bolhas de sabão” ou “favos de mel”, podendo haver expansão óssea, reabsorção de raízes envolvidas, deslocamentos dentários, associação com dente não irrompido e perfuração cortical (NEVILLE, 2017). Histologicamente, o ameloblastoma sólido é caracterizado pela presença de células semelhantes aos ameloblastos cercado, perifericamente, células estreladas dispostas frouxamente, que remetem ao retículo estrelado do órgão do esmalte; podendo apresentar diversas variantes, sendo as mais comuns a folicular (como se estivessem formando ilhas) e a plexiforme (formação de cordões anastomosados) (HEIKINHEIMO *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014).

O ameloblastoma unicístico, é uma lesão de apresentação de cavidade cística única, encapsulada, bem delimitada, de menor poder infiltrativo e de capacidade de se recidivar, o que a torna menos agressiva do que o ameloblastoma sólido. Apresenta maior frequência em pacientes jovens, geralmente na segunda década de vida, estando geralmente relacionado a dentes inclusos. Assim como o ameloblastoma sólido, não apresenta predileção por sexo e se encontra predominantemente na mandíbula, em sua região posterior (cerca de 90%) (PEREIRA *et al.*, 2016). Clinicamente, exibe um aumento de volume assintomático e de lento crescimento. Radiograficamente, é caracterizada por uma área radiolúcida bem definida, estando geralmente associada aos terceiros molares inferiores não-irrompidos, sendo comum a reabsorção de suas raízes, ocorrendo perfuração da cortical em, aproximadamente, 33% dos casos. Devido às suas características clínicas e radiográficas, assemelha-se aos cistos odontogênicos. A biópsia excisional é necessária para a sua completa análise histopatológica (PEREIRA *et al.*, 2016; NEVILLE, 2017) e a identificação macro e microscópica da peça de uma cavidade cística única é fundamental para a classificação do termo Unicístico. Ao microscópio, o ameloblastoma unicístico pode se apresentar como uma das três variantes: luminal (tumor fica confinado à superfície luminal do cisto), intraluminal (um ou mais

nódulos do ameloblastoma se projetam da cápsula em direção ao lúmen) ou mural (a parede do cisto está infiltrada) (EL-NAGAR *et al.*, 2017).

Com relação ao tratamento, os ameloblastomas sólidos tem a ressecção cirúrgica como tratamento padrão, pois esta apresenta o menor índice de recidivas quando comparada aos meios de tratamento mais conservadores, como a enucleação e curetagem (GOMES *et al.*, 2014; HEIKINHEIMO *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014). Já o ameloblastoma unicístico, tende a ser removido através da enucleação, no entanto, o ameloblastoma unicístico mural, devido à sua infiltração na parede do cisto, se aproxima dos ameloblastomas sólidos, devendo ser tratado da mesma forma, ou seja, através da ressecção cirúrgica e acompanhamento periódico por toda sua vida (PEREIRA *et al.*, 2016; NEVILLE, 2017). Essa intervenção agressiva, contudo, causa ao paciente deformidade facial, além de apresentar risco de morbidade (PEREIRA *et al.*, 2016). Tendo em vista isso, estudos que buscam o esclarecimento do perfil molecular do ameloblastoma e sua patogênese têm sido realizados, para, assim, oferecer ao paciente uma melhor compreensão dos fatores moleculares envolvidos na etiopatogênese do tumor e poder buscar em alguns casos, um tratamento mais conservador e eficaz.

2.2 A MUTAÇÃO BRAF V600E

As células tumorais originam-se de células normais que sofreram alterações no DNA ou em mecanismos que controlam a expressão gênica em um ou mais locos envolvidos no controle da divisão e diferenciação celulares, ou seja, células mutadas. Essas células tumorais resultam de ativações em genes que promovem o seu crescimento celular autônomo, os quais são denominados oncogenes, ou da inativação dos chamados genes supressores de tumor (METZKER, 2010; FILHO, 2017).

Na busca pelo conhecimento do comportamento e patogênese molecular do ameloblastoma, pesquisadores, através do uso de técnicas moleculares, como o sequenciamento de nova geração, identificaram a presença da mutação BRAF V600E em alta frequência nesse tumor odontogênico benigno (GOMES *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016). Além dos métodos de identificação genética, a imunohistoquímica (IHQ) também se mostra como uma técnica útil e efetiva, porém mais econômica, na detecção de tal mutação em amostras de parafina (FREGNANI *et al.*, 2017; CANTO *et al.*, 2019).

A mutação BRAF V600E é um dos principais tipos de mutações que ocorre com o gene *BRAF*, o qual faz parte da via de sinalização MAPK (mitogen-activated protein kinase), sendo resultante da substituição missense da base timina (T) pela adenina (A) no nucleotídeo 1.799, que acarretará na troca do aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E) no códon 600. Essa alteração molecular irá ocasionar uma mudança estrutural da proteína BRAF, desregulando o funcionamento da via MAPK de modo que os processos de diferenciação e proliferação celular fiquem superestimulados, proporcionando o desenvolvimento de tumores (SANTARPIA *et al.*, 2012).

Comumente encontrada em neoplasias malignas como o melanoma, carcinoma papilífero da tireoide, câncer colorretal e adenocarcinomas pulmonares; a mutação BRAF V600E também mostra sua presença, porém menos marcante do que nos primeiros, em tumores benignos como o nevo melanocítico, o tumor neuroectodérmico melanótico da infância dos maxilares, em pólipos do intestino grosso e ameloblastomas (GOMES *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016). Isso demonstra que mutações não são eventos genéticos exclusivos das neoplasias malignas.

A mutação BRAF V600E mostrou-se em maior número em pacientes mais jovens, quando comparada com amostras de ameloblastomas sem essa mutação (34,5 anos de idade durante o diagnóstico contra 53,6 anos), e, geralmente, na mandíbula, propondo que a patogênese entre os ameloblastomas da mandíbula e maxila são diferentes, sendo a da primeira menos agressiva (BROWN *et al.* 2014; HEIKINHEIMO *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.* 2014). Além disso, estudos mostram que na presença da proteína BRAF V600E, as recidivas ocorrem mais tarde quando comparadas com amostras BRAF V600E negativas, não sendo essa mutação, portanto, um indicativo de reincidência da lesão (BROWN *et al.* 2014). No entanto, Fregnani *et al.* (2017), afirmam em seu estudo que BRAF V600E apresenta uma significativa associação com a expressão da proteína PTHrP e do supressor tumoral da p53, proteína responsável pelo controle celular através da apoptose regulada, fazendo com que essa mutação apresente sim correlação com recidivas, além de provocar destruição óssea, aparência radiográfica multilocular e crescimento tumoral, tornando o comportamento clinicopatológico do ameloblastoma agressivo. Além disso, Shizart *et al.* (2018), também obtiveram como resultados que 66,7% de suas amostras positivas para a mutação BRAF V600E eram ameloblastomas recorrentes.

Levando em consideração as altas taxas de BRAF V600E nos ameloblastomas, pesquisadores buscaram sua presença em outros tumores odontogênicos, sendo encontrada também em outras neoplasias odontogênicas que possuem epitélio ameloblástico, como o

fibroma ameloblástico, fibro-odontoma amelobástico, carcinoma ameloblástico e carcinoma odontogênico de células claras; sugerindo que os tumores ameloblásticos apresentam irregularidades genéticas próprias e que o BRAF V600E poderia servir como marcador diagnóstico para esses tumores em alguns casos, e que o tratamento com drogas-alvo já existentes para essa mutação possa se tornar uma possibilidade (BROWN *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; FREGNANI *et al.* 2017).

2. 3 VIA DE SINALIZAÇÃO MAPK / ERK

A via da proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) / via da quinase regulada por sinal extracelular (ERK) funciona como meio de comunicação entre o núcleo celular e o ambiente fora dele, sendo responsável por importantes ações celulares, como a proliferação, diferenciação, senescência e apoptose celular. Sendo, portanto, uma das vias celulares responsáveis pelo desenvolvimento dentário (CANTWELL-DORRIS; OLEARY; SHEILS, 2011; SANTARPIA *et al.*, 2012).

A ativação dessa via ocorre quando o receptor, geralmente de tirosina quinase, ao ser ativado por um determinada substância, como os fatores de crescimento, estimula o RAS, o qual irá ocasionar a fosforilação do RAF e este, numa reação de fosforilação em cascata, irá ativar o MEK e, conseqüente, ERK, que se translocará para o núcleo da célula, acionando a transcrição de genes que participam do ciclo celular (HEIKINHEIMO *et al.*, 2014; JHAMB; KRAMER, 2014) (Figura 1).

Sua alteração irá possibilitar o surgimento de neoplasias, como consequência de alterações genéticas e a superexpressão de seus componentes, principalmente RAS e RAF, sendo uma das isoformas desse último o BRAF V600E, o qual tem sido altamente associado com a patogênese do ameloblastoma (BROWN *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.* 2014; KURPPA *et al.*, 2014; FREGNANI *et al.* 2017).

Várias terapias-alvo que inibem a via de sinalização MAPK já estão sendo utilizadas para o tratamento de cânceres, como o melanoma e câncer colorretal, como é o caso do vemurafenib e dabrafenib que são específicos para BRAF V600E, e trametinib que é específico para MEK (HEIKINHEIMO *et al.*, 2014). Além dessas, há também a pan-RAF, que devido à sua capacidade de atingir todas as isoformas de RAF, reduz a possibilidade de resistência que já foi relatada com o uso de drogas BRAF-seletivas primárias, principalmente o vemurafenib (CANTWELL-DORRIS; OLEARY; SHEILS, 2011; ZHANG *et al.*, 2015).

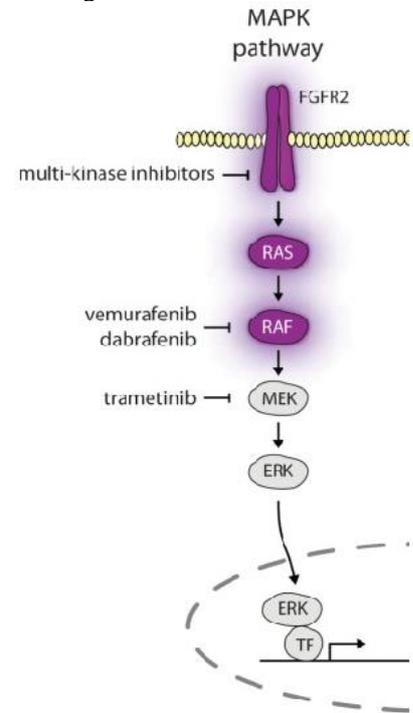
Essas drogas-alvo, devido à semelhança da via de sinalização e genes alterados, poderiam, então, serem utilizadas como tratamento conservador dos ameloblastomas, evitando uma complexa ressecção cirúrgica, reduzindo, dessa forma, a probabilidade de recidivas e morbidade.

Kaye et al. (2014), fizeram o uso de terapia oral direcionada dupla com dabrafenib 150 mg, duas vezes ao dia, e trametinib 2 mg, em dose única, após confirmação, através da imunohistoquímica, da presença da mutação BRAF V600E em um caso raro de ameloblastoma metastático no estágio 4. Após quatro dias do início do tratamento, o paciente já começou a perceber redução do volume do tumor em sua face, cavidade oral e pescoço. Tomografia computadorizada (TC) realizada 20 semanas após o início do tratamento, mostrou que a terapia realizada apresentou bom resultado, ao ser notado que houve resposta tumoral persistente em todos os locais de doença prévia, com a diminuição das lesões encontradas na face, pescoço e pulmões.

Fazendo o uso também do dabrafenib 150 mg, duas vezes ao dia, mas sem o inibidor do MEK, o trametinib, Tan et al. (2016), obteve também como resultado a diminuição da lesão do ameloblastoma mandibular recidivante em paciente de 85 anos, havendo redução em mais de 90% do seu volume. No entanto, ao contrário da ausência de respostas negativas apresentada por Kaye et al. (2014), o paciente optou por descontinuar o tratamento após 73 dias do seu início, devido a presença de sintomas negativos, como a perda de energia, surgimento de placas em sua face, costas e couro cabeludo e abafamento de sua voz.

Para o tratamento de ameloblastoma mandibular recidivante em paciente do sexo feminino de 29 anos, com a mutação BRAF V600E confirmada pela técnica de qPCR alelo-específico, Fernandes et al. (2018), fizeram uso do vemurafenib 960 mg por via oral, duas vezes ao dia. Após 11 meses de tratamento, foi notada evidente redução do volume da lesão (de 24 x 21 x 19 mm para 18 x 13 x 14 mm). A paciente apresentou anorexia, náusea e fadiga, mas até a publicação dessa pesquisa, foi informado o desaparecimento da sintomatologia dolorosa e excelente tolerância ao medicamento.

Figura 1 - Componentes da via de sinalização MAPK e locais de atuação das drogas alvo-moleculares



Fonte: Heikinheimo *et al.* (2014)

Os estudos citados anteriormente (KAYE *et al.*, 2014; TAN *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2018) propõem o uso de drogas-alvo para V600E, com dose e tempo dependentes, dabrafenib e vemurafenib, como possibilidade de recurso terapêutico para ameloblastomas, sendo um auxiliar à cirurgia, oferecendo melhor resultado e reduzindo a deformidade facial e as taxas de recidivas e morbidade.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Investigar a frequência da mutação BRAF V600E em amostras de ameloblastoma coletadas do acervo do Laboratório de Patologia do HU/UFS.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a mutação BRAF V600E na amostra;
- Comparar a frequência encontrada com dados da literatura.

4 METODOLOGIA

4.1. DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo transversal com seres humanos, que utilizou amostra de conveniência.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres humanos da Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob protocolo **CAAE: 82118018.1.0000.5546** (Anexo).

4.3 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DAS AMOSTRAS

Para esse estudo, foram recuperados 8 blocos de parafina de casos diagnosticados como ameloblastoma, do acervo do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da UFS, do período entre 2010 e 2018. Dados clínicos referentes aos pacientes, como sexo, idade, localização, subtipo histológico, foram obtidos por meio dos prontuários e laudos histopatológicos do acervo acima citado.

Foram inclusas lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE), correspondentes aos casos arquivados, com diagnóstico confirmado de ameloblastoma e avaliação dos respectivos subtipos histológicos, por meio da análise de patologista bucal experiente.

4.4 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Os tecidos emblocados em parafina foram submetidos, em micrótomo por profissional experiente, no Laboratório de Patologia do HU/UFS, a cortes histológicos com espessura de 4 μm e montados em lâminas de vidro silanizadas para a realização da técnica imunohistoquímica. O anticorpo primário utilizado foi o anti- BRAF mutado (V600E), (1:100, clone RM8, Abcam, Cambridge Science Park, Cambridge, FL, UK). A técnica foi executada manualmente, conforme orientações do fabricante e adaptações ao protocolo original. Segue abaixo uma descrição resumida da técnica empregada.

No primeiro dia, as lâminas contendo os cortes de ameloblastomas foram submetidas à desparafinação com Xilol (inicialmente a 60°C em estufa e depois a temperatura ambiente), seguidas de hidratação com álcoois em diferentes concentrações (100%, 95% e 80%). Ao término dessa etapa, foram submetidos à lavagem com tampão Tris-Triton X-100, seguida da fase de recuperação antigênica com tampão Citrato (pH 6,0) aquecida em forno

micro-ondas à temperatura de 90°C por 20 min. Após período de repouso da solução em temperatura ambiente para estabelecimento do equilíbrio térmico, procedeu-se a aplicação de BSA (albumina de soro bovino) a 1% para eliminação de coloração de fundo e posterior aplicação do anticorpo primário e incubação *overnight* a 4°C de 14 a 16 horas.

No segundo dia, foi realizada a desincubação das lâminas contendo o anticorpo primário, acompanhada de lavagem com solução de Tris-Triton X-100, seguida de incubação com peróxido de hidrogênio a 3% acrescido de metanol na proporção 1:1, com posterior aplicação do polímero de detecção – Anticorpo secundário (Sistema Dako Envision) e lavagem com tampão Tris-Triton X-100. Após essas etapas, coloração com cromógeno DAB (Diaminobenzidina), lavagem com água destilada para cessar a reação química e contra-coloração com hematoxilina. Por fim, banhos de reidratação com álcoois em diferentes concentrações (70%, 90% e 100%), fixação com xilol e montagem da lâmina para visualização microscópica.

Tabela 1 – Padronização imunohistoquímica para o anticorpo primário usado no estudo.

Anticorpo	Clone	Marca	Recuperação Antigênica	Diluição	Sistema de Detecção
BRAF V600E	RM8	Abcam	Tampão Citrato pH 6,0	1: 100	Dako Envision

Fonte: Autor

4.5 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Todas as reações imunohistoquímicas foram avaliadas em microscópio óptico de luz por dois observadores quanto ao padrão de imunoexpressão da proteína BRAF V600E. A avaliação foi feita conforme descrito em Pereira et al. (2016), sendo a imunoexpressão considerada positiva quando houve marcação citoplasmática observada em quantidade substancial das células tumorais. Marcações isoladas, difusas e fracas foram consideradas negativas. Foi incluída como controle positivo, uma amostra de ameloblastoma com a presença

positiva da mutação BRAF V600E confirmada por meio de PCR alelo específico e sequenciamento de Sanger; e o controle negativo consistiu na omissão do anticorpo primário, conforme descrito por Pereira et al. (2016).

5 RESULTADOS

Foram recuperadas 8 amostras de casos de ameloblastoma do acervo do Laboratório de Patologia da HU/UFS. Destas, 2 ocorreram em pacientes do sexo masculino (25%) e 6 feminino (75%). A média de idade encontrada foi de 27 anos, em intervalo de 19 a 35 anos. Quanto à localização do tumor, 87,5% acometeram a mandíbula e a maior parte (71%) na região posterior. Com relação à classificação histológica, foi semelhante o número de casos sólidos/multicístico e unicísticos (4 para 4). Dos casos multicísticos, 50% corresponderam ao subtipo folicular, 25% plexiforme e 25% células basais. No quesito manifestação tumoral, 7 amostras se mostraram primárias (87%) e 1 recorrente (13%).

Com relação ao status da mutação BRAF V600E, 5 amostras mostraram reatividade positiva para tal marcador (62,5%) e 3 amostras foram negativas (37,5%) (Imagem 2). Estas informações estão descritas na tabela 2, logo abaixo.

Tabela 2 – Dados clínicos correspondentes aos casos de ameloblastomas coletados

Número do caso	Status do BRAF V600E	Idade (anos)	Sexo (F/M)	Osso Maxilar	Localização	Manifestação Tumoral	Subtipo Histológico
Caso 01	+	19	F	Mandíbula	Posterior	Primário	Plexiforme
Caso 02	-	20	F	Mandíbula	Posterior	Primário	Folicular
Caso 03	+	24	F	Mandíbula	Posterior	Primário	Unicístico
Caso 04	+	25	F	Mandíbula	Posterior	Primário	Unicístico
Caso 05	-	29	F	Maxila	Posterior	Primário	Células Basais
Caso 06	+	32	M	Mandíbula	Anterior	Primário	Unicístico

Caso 07	-	34	F	Mandíbula	Posterior	Recorrente	Folicular
Caso 08	+	35	M	Mandíbula	Anterior	Primário	Unicístico

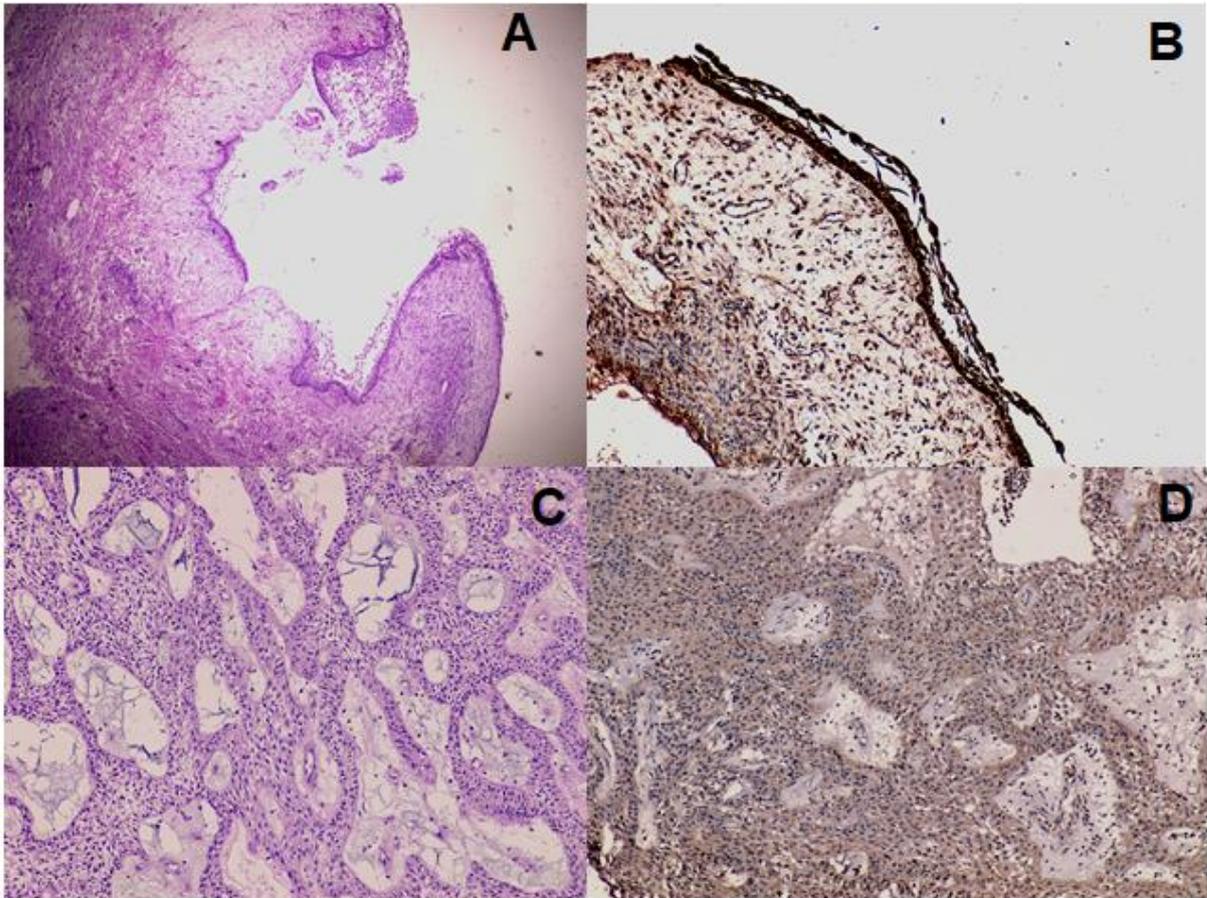
Fonte: Autor

Quanto à presença da mutação BRAF V600E em relação ao sexo, foi observada imunorreatividade em 100% (2/2 dos casos) das amostras masculinas e em 50% (3/6) das femininas. Com relação à idade, a média foi de 27 anos. Das 5 amostras que se mostraram positivas ao marcador, todas (100%) foram localizadas na mandíbula, sendo que 3 na região posterior (60%) e 2 na anterior da mandíbula (40%).

Com relação às características histológicas, somente 1 das 5 amostras positivas para o BRAF V600E mostrou-se ser do tipo multicístico, ou seja, 20%, sendo a mesma do subtipo plexiforme. Sendo, portanto, 80% dos casos ameloblastomas unicísticos.

Dos 8 casos de ameloblastomas analisados, 7 foram primários e somente 1 recidivante, tendo este último apresentado reação negativa para o anticorpo específico para o BRAF V600E. Ou seja, das 5 amostras que apresentaram imunorreatividade para essa mutação, todas (100%) eram tumores primários.

Figura 2 - Análise imunohistoquímica da mutação BRAF V600E em amostras de ameloblastoma. A - Ameloblastoma unicístico (H&E, aumento de 200X); B - Imunopositividade citoplasmática para o marcador BRAF V600E, em ameloblastoma unicístico, observado ao longo da extensão do epitélio odontogênico (aumento de 200X); C - Ameloblastoma sólido (H&E, aumento de 200X); D - Imunopositividade para BRAF V600E, em ameloblastoma sólido, observada na porção central das ilhas de epitélio odontogênico (aumento de 200X).



Fonte: Autor

6 DISCUSSÃO

Apesar de ser classificado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um tumor odontogênico benigno, em razão do seu crescimento lento, assintomático e localmente invasivo (EL-NAGAR *et al.*, 2017), o ameloblastoma apresenta caráter agressivo em

consequência da sua capacidade infiltrativa elevada e, consequentes, alto índice de recidivas e significativa morbidade (JHAMB; KRAMER, 2014).

Em busca da melhor compreensão de sua patogênese e redução da hostilidade do seu tratamento convencional, diversos estudos, desde 2014, vêm identificando a presença da mutação BRAF V600E tanto em ameloblastomas sólidos quanto unicísticos. Diante da alta frequência encontrada e da possibilidade, por esse motivo, do uso de drogas-alvos específicas para essa mutação, este estudo foi realizado para verificar a ocorrência do BRAF V600E em amostras de ameloblastomas do Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe.

O padrão ouro de identificação da mutação BRAF V600E é através do sequenciamento, ou de técnicas sensíveis como o PCR com uso de sonda específica para identificação de alelo BRAF mutado na transversão T >A na posição c.1799. Entretanto, a identificação da mutação por técnicas de biologia molecular são caras e muitas vezes não podem ser realizadas por vários centros de Diagnóstico. Assim, o uso da ferramenta da imunohistoquímica na identificação da oncoproteína BRAF V600E se mostra mais econômica e sensível.

Resultados conflitantes são observados na literatura quanto a detecção da presença da mutação, por técnicas como o PCR alelo específico, ou o sequenciamento de Sanger, e a confirmação da proteína BRAF mutada, por meio da imunohistoquímica. Brown et al. (2014) e Kurppa et al. (2014), demonstraram a presença dessa mutação em, aproximadamente, 60% (31 de 50 peças) dos casos de ameloblastomas sólidos analisados, havendo total concordância entre as técnicas utilizadas.

Ao analisar a presença da mutação BRAF V600E em 8 amostras de ameloblastomas unicísticos comparando o uso das técnicas qPCR com sonda TaqMan alelo-específica e a imunohistoquímica (IHQ), Pereira et al. (2016) encontraram divergências entre os resultados dos dois métodos utilizados, A IHQ mostrou imunorreatividade em todas as amostras de ameloblastomas unicísticos avaliadas, enquanto que o qPCR apresentou resposta positiva para 62% das amostras analisadas (5 de 8). Os resultados do sequenciamento de Sanger foram idênticos aos observados com o qPCR, sendo similares aos obtidos por Brown et al. (2014) e Kurppa et al. (2014). Como conclusão, Pereira et al. (2016) afirmam que a imunohistoquímica não é um método totalmente confiável, visto que já apresentou resultados falso-positivos em casos de melanoma e câncer colorretal em estudos previamente realizados, devendo os patologistas interpretá-la com precaução.

Em relação à frequência do BRAF V600E, obtivemos que 62,5% das amostras analisadas foram positivas para tal mutação. Sendo similar ao publicado por Brown et al. (2014), Kurppa et al. (2014) e Pereira et al. (2016). Contudo, Shizart et al. (2018), ao investigarem, por meio apenas da imunohistoquímica, a presença dessa oncoproteína em 30 amostras de ameloblastomas mandibulares, obtiveram uma baixa frequência, em que somente 33,3% das amostras (10) apresentaram-se positivas para o V600E, sendo que 9 apresentaram coloração forte e 1 coloração intermediária.

Ao analisarmos as características clínicas das amostras de ameloblastomas com a mutação BRAF V600E tipo driver confirmada, notamos que a média de idade encontrada foi de 27 anos, ou seja, pacientes mais jovens, havendo predileção pelo sexo feminino (60% dos casos), similar aos achados de Kurppa et al. (2014) e Fregnani et al. (2014), que notaram uma leve predominância em mulheres. No entanto, segundo Kurppa et al. (2014) não existe correlação entre a situação do BRAF V600E com a idade dos pacientes.

Quanto à localização, 100% dos casos com imunorreatividade para o BRAF V600E estavam localizados na mandíbula, sendo a maior parte, 60% das amostras, encontrada na região posterior da mandíbula. Tal como esse resultado obtido, Brown et al. (2014), Kurppa et al. (2014), Sweeney et al. (2014) e Pereira et al. (2016) afirmam a maior presença do BRAF V600E em ameloblastomas localizados na mandíbula.

Em relação aos tipos e subtipos histológicos, 80% dos casos foi do tipo ameloblastoma unicístico e 20% ameloblastoma sólido. Kurppa et al. (2014) e Fregnani et al. (2017), não obtiveram nenhuma correlação entre a expressão do BRAF V600E e subtipo histológico. Por outro lado, Shizart et al. (2018) encontraram forte correlação entre a presença da mutação BRAF V600E e a variante plexiforme, ao contrário de Brown et al. (2014) e Sweeney et al. (2014) que obtiveram a variante plexiforme mais frequente nos casos de ameloblastoma com BRAF V600E negativo.

Ao investigarem o comportamento dos ameloblastomas com o BRAF V600E, Sweeney et al. (2014) afirmaram que a mutação faz com que a lesão se apresente de forma mais agressiva, estando ligada à presença de recorrências e interrupção da cortical óssea basal. Shirsat et al. (2018) também relatam maior incidência do BRAF V600E em lesões recidivantes. No entanto, Brown et al. (2014) afirmam o contrário, que a mesma se mostrou menos frequente em recidivas. No presente estudo, das 8 amostras coletadas para a realização dessa pesquisa, somente uma era recidivante, a qual mostrou reação negativa ao anticorpo específico para a mutação utilizado, entretanto, devido à quantidade de tumor recidivante

avaliado ter se restringido a um, não é possível inferir qualquer relação da mutação com o comportamento do ameloblastoma na amostra avaliada.

Em nossos ensaios foi empregado o anticorpo BRAF V600E (Clone RM8) para verificar a presença da mutação, o qual, embora seja um marcador pouco reconhecido pela literatura, já existem trabalhos que atestam sua aplicabilidade clínica, afirmando que o mesmo apresenta precisão diagnóstica similar ao qPCR (KRISHNAMURHTY et al., 2018). Contudo, o anticorpo monoclonal BRAF V600E (VE1) é o marcador de referência para avaliar a presença da mutação em ameloblastomas e o mais utilizado por todos os trabalhos com ameloblastomas até o momento (KURPPA et al., 2014; PEREIRA et al., 2016; FREGNANI et al., 2017). Entretanto, por questões de custo do clone VE1, nosso estudo se restringiu a trabalhar com o clone RM8, já usado na literatura para análise de outras neoplasias, porém é a primeira vez que esse clone foi usado em amostras de ameloblastoma.

Além disso, para a realização deste estudo, não foi realizada nenhuma técnica molecular além da imunohistoquímica, que pudessem melhor caracterizar a presença da mutação e identificar assim, possíveis falso-positivos ou falso-negativos encontrados na imunohistoquímica, de maneira que, os resultados obtidos devem ser interpretados com cautela. Apesar das limitações do estudo, é a primeira vez que se tem reportada a identificação da mutação BRAF V600E em ameloblastomas da população do estado de Sergipe, e isso abre a expectativa de que possibilidades terapêuticas alvo moleculares possam ser pensadas em alguns casos de tumores como os recidivantes e de ocorrência em pacientes pediátricos.

7 CONCLUSÃO

Houve uma alta ocorrência da mutação BRAF V600E nos ameloblastomas da população coletada, semelhantes aos resultados da literatura. Diante disso, inferimos que a mesma pode se apresentar como um marcador de diagnóstico para os ameloblastomas dessa população e possibilitar que novos ensaios clínicos com a terapia alvo-molecular possam ser empregados, a exemplo do que já ocorre em melanomas, através do uso de drogas inibidoras de BRAF ou de outros componentes da via MAPK.

Entretanto, devido ao pequeno número de amostras encontradas, e a utilização de marca não usual de anticorpo para a mutação BRAF V600E em ameloblastoma, os resultados aqui obtidos devem ser interpretados com cautela, especialmente no que se refere ao uso dessa mutação como marcador de prognóstico, uma vez que não realizamos um estudo prospectivo.

REFERÊNCIAS

BORAKS, S. **Medicina bucal: tratamento clínico-cirúrgico das doenças bucomaxilofaciais**. São Paulo: Artes Médicas, 2011.

BROWN, N.A. et al. Activating FGFR2-RAS-BRAF mutations in ameloblastoma. **Clinical Cancer Research**, American Association for Cancer Research, v. 20, n.21, p.5517-5526, July 2014;

BRUNNER, P. et al. BRAF p.V600E mutations are not unique to ameloblastoma and are shared by other odontogenic tumors with ameloblastic morphology. **Oral Oncology**, Elsevier BV, v. 51, n. 10, p.77-78, Oct. 2015;

CANTO, A.M. et al. Immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in ameloblastomas. **Clinical Oral Investigations**, Springer Science and Business Media LLC, v. 23, n. 2, p. 779-784, Feb. 2019;

CANTWELL-DORRIS, E.R.; O'LEARY, J.J.; SHEILS, O.M. BRAFV600E: Implications for Carcinogenesis and Molecular Therapy. **Molecular Cancer Therapeutics**, American Association for Cancer Research (AACR), v. 10, n. 3, p.385-394, Mar. 2011;

DINIZ, M.G. et al. Assessment of BRAFV600E and SMOF412E mutations in epithelial odontogenic tumours. **Tumor Biology**, Springer Nature, v. 36, n. 7, p.5649-5653, Feb. 2015;

EL-NAGAR, A.K. et al. WHO: Classification of Head and Neck Tumours. 4. ed. IARC: Lyon, 2017;

FERNANDES, G.S. et al. Clinical benefit and radiological response with BRAF inhibitor in a patient with recurrent ameloblastoma harboring V600E mutation. **BMC Cancer**, Springer Nature America, v. 18, n 1, p. 887, oct. 2018;

FREGNANI E.R. et al. BRAF-V600E expression correlates with ameloblastoma aggressiveness. **Histopathology**, Wiley, v. 70, n. 3, p. 473-484, nov. 2016;

GOMES, C.C.; DINIZ M.G.; GOMEZ R.S. Progress towards personalized medicine for ameloblastoma. **The Journal of Pathology**, Wiley, v. 232, n. 5, p. 488-491, mar. 2014;

HEIKINHEIMO, K; KURPPA, K.J.; ELENIUS K. Novel Targets for the Treatment of Ameloblastoma. **Journal of Dental Research**, SAGE Publications, v. 94, n. 2, p. 237-240, nov. 2014;

HUSSAIN, M.R. et al. BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. **Saudi Journal of Biological Sciences**, Elsevier BV, v. 22, n. 4, p. 359-373, july 2015;

JHAMB, T. et al. Molecular concepts in the pathogenesis of ameloblastoma: Implications for therapeutics. **Experimental And Molecular Pathology**, Elsevier BV, v. 97, n. 3, p. 345-353, dec. 2014;

KAYE, F.J. et al. Clinical and Radiographic Response With Combined BRAF-Targeted Therapy in Stage 4 Ameloblastoma. **JNCI Journal of the National Cancer Institute**, Oxford University Press (OUP), v. 107, n. 1, p. 378, dec. 2014;

KRISHNAMURTHY, A. et al. Clinical utility of immunohistochemistry using the novel anti-BRAF V600E antibody (clone RM8) for detection of the BRAF V600E mutant protein in papillary thyroid cancers. **International Journal Of Molecular And Immuno Oncology**, Scientific Scholar, v. 3, n. 1, p. 28-33, feb. 2018;

KURPPA, K.J. et al. High frequency of BRAF V600E mutations in ameloblastoma. **The Journal of Pathology**, Wiley, v. 232, n. 5, p. 492-498, Jan. 2014;

METZKER, M.L. Sequencing technologies – the next generation. **Nature Reviews Genetics**, Springer Nature, v. 11, n.1, p. 31-46, Dec. 2009;

NEVILLE, B.W. et al. **Patologia Oral e Maxilofacial**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

PEREIRA, N.B. et al. BRAFV600E mutation in the diagnosis of unicystic ameloblastoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Wiley, v. 45, n. 10, p. 780-785, Apr. 2016;

SANTARPIA, L.; LIPPMAN S.M.; EL-NAGGAR, A.K. Targeting the MAPK–RAS–RAF signaling pathway in cancer therapy. **Expert Opinion On Therapeutic Targets**, Informa Healthcare, v. 16, n. 1, p. 103-119, Jan. 2012;

SANTOS, T.S. et al. Ameloblastoma in the Northeast region of Brazil: A review of 112 cases. **Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology**, Medknow, v. 18, n. 4, p. 66-71, Sep. 2014.

SHIRSAT, P.M. et al. Low frequency of BRAF V600E immunoexpression in mandibular ameloblastomas: An institutional study. **Journal Of Oral And Maxillofacial Pathology**, Medknow, v. 22, n. 3, p. 353-359, Dec. 2018.

SWEENEY, R.T. et al. Identification of recurrent SMO and BRAF mutations in ameloblastomas. **Nature Genetics**, Springer Nature, v. 46, n. 7, p. 722-725, May 2014;

TAN, S. et al. BRAF inhibitor treatment of primary BRAF-mutant ameloblastoma with pathologic assessment of response. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, Elsevier BV, v. 122, n. 1, p. 5-7, July 2016;

ZHANG, C. et al. RAF inhibitors that evade paradoxical MAPK pathway activation. **Nature**, Springer Nature, v. 526, n. 7574, p. 583-586, Oct. 2015.

ANEXO

Continuação do Parecer: 2.517.569

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo observacional, analítico, transversal com seres humanos, utilizando amostra de conveniência com blocos arquivados de tecido fixado em formol e embebido em parafina, bem como tecidos frescos recuperados dos arquivos do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da UFS, sendo blocos de parafina, de cistos e tumores de boca armazenados nos últimos 5 anos.

Os dados clínicos nas fichas de biópsia serão também coletados

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

termos adequados.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplicam.

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_INFORMACOES_BASICAS_DO_PROJETO_1051322.pdf	17/01/2018 00:58:14		Aceito
Outros	AnuenciaCoordenadorAmbulatorio.PDF	17/01/2018 00:54:11	SILVIA FERREIRA DE SOUSA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	17/01/2018 00:52:15	SILVIA FERREIRA DE SOUSA	Aceito
Outros	AnuenciaCoordenacaoPatologia.PDF	17/01/2018 00:47:53	SILVIA FERREIRA DE SOUSA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	17/01/2018 00:46:27	SILVIA FERREIRA DE SOUSA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	AnuenciaLaboratorio.PDF	17/01/2018 00:43:14	SILVIA FERREIRA DE SOUSA	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	17/01/2018 00:42:22	SILVIA FERREIRA DE SOUSA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Rua Cláudio Batista s/n°
 Bairro: Sanatório CEP: 49.060-110
 UF: SE Município: ARACAJU
 Telefona: (79)3194-7208 E-mail: cephu@ufs.br

UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



Continuação do Parecer: 2.517.569

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

ARACAJU, 28 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
Anita Hermínia Oliveira Souza
(Coordenador)

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº
Bairro: Sanatório **CEP:** 49.060-110
UF: SE **Município:** ARACAJU
Telefone: (79)3194-7208 **E-mail:** cephu@ufs.br