



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

ELLEN MAIANY RIBEIRO SANTANA

IMUNOEXPRESSÃO DE BAP1 EM
AMELOBLASTOMAS

Aracaju
2020

ELLEN MAIANY RIBEIRO SANTANA

**IMUNOEXPRESSÃO DE BAP1 EM
AMELOBLASTOMAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia como requisito parcial à conclusão do curso de Odontologia na Universidade Federal de Sergipe para obtenção do grau de Cirurgião-Dentista.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sílvia Ferreira de Sousa

Co-orientador: Prof. Dr. Cleverson Luciano Trento

**Aracaju
2020**

ELLEN MAIANY RIBEIRO SANTANA

**IMUNOEXPRESSÃO DE BAP1 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. Antônio Carlos Marqueti – Presidente
Universidade Federal de Sergipe

Prof^a. Dr^a. Liane Maciel de Almeida Souza - 1º Examinador
Universidade Federal de Sergipe

CD Lucas Alves da Mota Santana - 2º Examinador
Universidade Federal de Sergipe

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por ter me mantido perseverante diante das dificuldades.

À minha mãe, Karina e às minhas irmãs, Thainá e Kamilli, minha base, obrigada por sempre acreditarem em mim, por toda motivação, compreensão, por não medirem esforços para que eu chegasse até aqui. Vocês são meu porto seguro.

Aos meus familiares, em especial ao meu pai Washington, meu tio Wildon, minha tia Akátia e minhas avós que sempre confiaram em mim, acreditaram no meu futuro e me ajudaram a correr atrás dos meus objetivos.

A Mattheus, por todo amor, companheirismo, incentivo e apoio incondicional.

Aos amigos que a odontologia me presenteou, em especial à Bia, Carol, Jorge, Anne, Sílvia, Paula, Julie, Karol e Allen pela alegria diária, momentos de descontração, ajuda quando necessário e por tornar essa jornada mais leve.

À minha dupla, Mari, pela cumplicidade, paciência e momentos compartilhados.

À minha orientadora, Profa. Sílvia Ferreira de Sousa, por todos os ensinamentos e incentivo. Sou grata por todas as oportunidades que me deu e que contribuíram para minha formação profissional e pessoal. És uma inspiração.

Ao mestrando Lucas Santana, pela parceria, paciência ao ensinar e conhecimentos transmitidos.

Aos professores e funcionários do Departamento de Odontologia, assim como à equipe do serviço de Patologia da Universidade Federal de Sergipe.

Enfim, agradeço a todos que contribuíram para minha formação e realização deste trabalho. Muito Obrigada!

RESUMO

IMUNOEXPRESSÃO DE BAP1 EM AMELOBLASTOMAS. SANTANA, Ellen Maiany Ribeiro; de SOUSA Sílvia Ferreira. Aracaju, 2020.

O ameloblastoma é um tumor odontogênico de origem epitelial de grande relevância clínica devido ao seu comportamento biológico localmente invasivo e de alto índice de recidiva. O tratamento de escolha, na maioria dos casos, envolve métodos radicais que causam morbidade e deformidade facial ao paciente. A sua patogênese ainda é fonte de controvérsias, porém estudos recentes descreveram a presença frequente da mutação *BRAF* V600E, já descrita em melanomas cutâneos, uveais, orais e lesões melanocíticas benignas. O gene supressor de tumor *BAP1* codifica a proteína nuclear BAP1. A perda de expressão nuclear de BAP1 tem sido descrita em diferentes tumores humanos. Uma possível combinação entre a mutação *BRAF* V600E e a perda de expressão de BAP1 tem sido descrita em proliferações melanocíticas. Considerando a alta frequência de *BRAF* V600E em ameloblastomas, o objetivo deste estudo foi investigar a imunexpressão de BAP1 em ameloblastomas. E como a perda de BAP1 se associa com pior prognóstico dos tumores, a imunexpressão de BAP1 foi associada com parâmetros clínico-patológicos do ameloblastoma. Para isso, uma amostra de conveniência de 33 ameloblastomas sólidos e unicísticos foi selecionada e submetida à imunohistoquímica para detecção de BAP1. Dados clínico-patológicos também foram coletados. A maioria dos casos de tumor (60,6%; 20/33) exibiu uma alta perda de expressão de BAP1, ou seja, > 70% dos núcleos tumorais com perda de expressão de BAP1. Não foi possível estabelecer associação significativa entre a expressão de BAP1 e as variáveis clínicas avaliadas. Detectamos perda da expressão nuclear de BAP1 em alta proporção de casos de ameloblastoma, independentemente dos parâmetros clínico-patológicos investigados. Estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar se o BAP1 desempenha um papel na tumorigênese dos ameloblastomas.

Descritores: Ameloblastoma. Imunohistoquímica. Mutação.

ABSTRACT

IMMUNOEXPRESSION OF BAP1 IN AMELOBLASTOMAS. SANTANA, Ellen Maiany Ribeiro; de SOUSA Sílvia Ferreira. Aracaju, 2020.

Ameloblastoma is an odontogenic tumor of epithelial origin of great clinical relevance due to its aggressive, locally invasive nature and high rate of relapse. The treatment of choice, in most cases, involves radical methods that cause morbidity and facial deformity to the patient. Its pathogenesis is still controversial, but recent studies have described the frequent presence of the BRAF V600E mutation, already described in cutaneous melanoma, uveal melanoma, oral melanoma and benign melanocytic lesions. The tumour suppressor gene *BAP1* encodes the nuclear protein BRCA-1 associated protein 1 (BAP1). Loss of BAP1 nuclear expression has been reported in several human tumours. A possible combination between the *BRAFV600E* mutation and loss of BAP1 expression has been reported in melanocytic proliferations. Considering the high frequency of *BRAFV600E* in ameloblastomas, we aimed to investigate the immunoexpression of BAP1 in ameloblastomas. And, because loss of BAP1 strongly associates with poor prognosis of the tumors, the immunoexpression were associated with clinicopathological parameters of the ameloblastomas. For this a convenience sample of 33 solid and unicystic ameloblastomas were selected and submitted to immunohistochemistry for detection of BAP1. Clinicopathological data were also collected. Most tumour cases (60.6%; 20/33) exhibited a high loss of BAP1 expression, i.e. > 70% of tumour nuclei with loss of BAP1 expression. No significant association between BAP1 expression with clinical variables evaluated could be established. We detected loss of BAP1 nuclear expression in a high proportion of ameloblastoma cases, independently of the clinicopathological parameters investigated. Additional studies are warranted to better characterize if BAP1 plays a role in ameloblastomas tumorigenesis.

Key-Words: Ameloblastoma. Immunohistochemistry. Mutation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Fotomicrografia dos tipos histológicos do ameloblastoma.....	15
Figura 2 – Achados microscópicos em casos representativos de ameloblastomas investigados para expressão de BAP1.....	28
Figura 3 - Fotomicrografias representativas que ilustram a expressão heterogênea de BAP1 em um ameloblastoma sólido.....	28

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Dados clínico-patológicos e imunohistoquímicos dos 34 casos de ameloblastomas	26
Tabela 2 – Análise univariada da associação entre variáveis clínico-patológicas e perda da expressão de BAP1	27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BAP1</i>	Gene supressor de tumor <i>Breast Cancer Associated Protein 1</i>
BAP1	Proteína supressora tumoral (BRCA-1 Associado à Proteína 1)
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
<i>BRAF V600E</i>	Mutação no gene BRAF devido à substituição do valina (V) pelo ácido glutâmico (E) no códon 600
BSA	Albumina sérica bovina
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAB	Cromógeno diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERK	Via da quinase regulada por sinal extracelular
HCF1	Host cell factor 1
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
°C	Graus celsius
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
TP53	Gene que codifica a proteína p53 (proteína de tumor)
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UFS	Universidade Federal de Sergipe
µm	Micrômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1 AMELOBLASTOMA	12
2.2 PATOGÊNESE DO AMELOBLASTOMA.....	16
2.3 O GENE E A PROTEÍNA BAP1	19
3 OBJETIVOS	21
3.1 OBJETIVO GERAL	21
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
4 METODOLOGIA.....	21
4.1 DESENHO DE ESTUDO.....	21
4.2 ASPECTOS ÉTICOS.....	21
4.3 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS.....	22
4.4 REAÇÃO DE IMUNOHISTOQUÍMICA.....	22
4.5 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA.....	24
5 RESULTADOS	24
6 DISCUSSÃO	29
7 CONCLUSÃO.....	31
REFERÊNCIAS	32
ANEXOS	38
ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFS.....	38
ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG.....	39
ANEXO C - ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO HISTOPATHOLOGY.....	40

1 INTRODUÇÃO

O ameloblastoma é um tumor odontogênico de origem epitelial de grande relevância clínica (UGRAPPA *et al.*, 2017). Representa 11% dos tumores odontogênicos e sua origem ainda é fonte de controvérsias (NEVILLE *et al.*, 2009; MILMAN *et al.*, 2016; MAIA; SANDRINI, 2017). Caracteriza-se por exibir comportamento agressivo, localmente invasivo e com alto índice de recidiva, e atualmente, está classificado em três tipos clínicos principais: ameloblastoma convencional (sólido/ multicístico), ameloblastoma unicístico e periférico (extra-ósseo) (HEIKINHEIMO *et al.*, 2015; KREPPEL; ZÖLLER, 2018; WRIGHT; VERED, 2017).

Em geral, os subtipos do ameloblastoma não mostram predileção por sexo e o principal sítio de manifestação é a região posterior de mandíbula (GIRADDI *et al.*, 2017; BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). Comumente, o ameloblastoma convencional acomete os indivíduos principalmente entre as terceira e sexta décadas de vida. A sua sintomatologia é vasta, incluindo crescimento lento e expansão cortical óssea, fazendo atingir assim grandes proporções, bem como causar significativas deformidades faciais, parestesia, dor e alterações dentárias (JHAMB; KRAMER, 2014; HEIKINHEIMO, *et al.*, 2015; BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). Rotineiramente, a apresentação radiográfica é descrita em “bolhas de sabão” ou “favos de mel”, a depender do tamanho das loculações ósseas (MORE *et al.*, 2012).

A variante unicística afeta usualmente pessoas mais jovens, assumindo também um crescimento lento. Radiograficamente, apresenta-se como uma radiolucência unilocular e pode estar em associação com um dente não irrompido. Similarmente à variante sólida (convencional), pode-se observar, em alguns casos, a presença de deslocamento de unidades dentário, reabsorção radicular ou destruição de corticais ósseas (HSU *et al.*, 2014; BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). O tratamento de escolha para o ameloblastoma, na maioria dos casos, envolve métodos radicais devido ao comportamento biológico agressivo e às taxas de recorrência significativas (ABDI *et al.*, 2016; BORELLO *et al.*, 2016; ARAMANADKA *et al.*, 2018).

Com o objetivo de elucidar a patogênese e desenvolver futuros alvos terapêuticos mais conservadores para esta neoplasia, desde 2014, diversos autores descreveram a ocorrência frequente de uma mutação no gene *BRAF* em ameloblastomas, sendo a mutação *BRAF*

V600E a mais comum (SWEENEY *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016). Esta já foi descrita em neoplasias malignas e benignas, incluindo lesões orais como fibromas ameloblásticos, fibro-odontomas ameloblásticos e carcinomas ameloblásticos (BROWN *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016; KREPPEL; ZÖLLER, 2018).

Estudos ainda mais recentes reportaram que, tanto neoplasias malignas, ~~como~~ (melanomas cutâneos e uveais), quanto lesões melanocíticas benignas, além de apresentarem mutações recorrentes em *BRAF V600E* estão associadas à alteração na expressão em *BAP1* (*BRCA1-Associated Protein 1*), um gene supressor de tumor que realiza um papel fundamental para a carcinogênese (WIESNER *et al.*, 2012; GAMMON *et al.*, 2013; PIRIS *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2017). Sendo assim, mutações ocasionais neste gene poderiam levar a sua inativação e perda de expressão, comprometendo sua atividade supressora tumoral e consequentemente, levar à pré-disposição e ao avanço de muitos tumores malignos, como já foi descrito (SHAH *et al.*, 2013; WEBSTER *et al.*, 2018). Neste contexto, alguns estudos sugerem a combinação da expressão positiva da proteína mutada *BRAF V600E* e a perda de expressão nuclear em *BAP1* (WIESNER *et al.*, 2012; BUSAM *et al.*, 2013).

Diante da alta frequência da mutação *BRAF V600E* recentemente reportada em ameloblastomas e da possibilidade de uma perda de expressão da proteína *BAP1* combinada com a mutação *BRAF V600E*, similarmente ao demonstrado em proliferações melanocíticas (DAMSKY e BOSENBERG, 2017), este estudo se propôs a investigar a imunoexpressão de *BAP1* em ameloblastomas. E como a perda de expressão *BAP1* se associa com pior prognóstico dos tumores, a imunoexpressão de *BAP1* foi associada com parâmetros clínicopatológicos do ameloblastoma.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 AMELOBLASTOMA

Os tumores odontogênicos consistem em um grupo heterogêneo de lesões que acometem, particularmente, o interior dos ossos maxilofaciais ou, mais raramente, estabelecem-se nos tecidos moles provocando inchaço gengival e tem a sua origem em células responsáveis pela odontogênese (MORGAN, 2011; WRIGHT *et al.*, 2014; YUKIMORI *et al.*, 2017). Apresentam comportamento biológico diversificado, podendo exibir formação hamartomatosas, que constituem verdadeiras anomalias do desenvolvimento até neoplasias benignas de comportamento agressivo ou neoplasias verdadeiramente malignas (WRIGHT; TEKKESIN, 2017). Quanto à origem tecidual, podem ser classificados em tumor epitelial, mesenquimal ou misto (BILODEAU *et al.*, 2019).

Dentre esses tumores de grande relevância para clínica odontológica está o ameloblastoma. Este é o tumor odontogênico de origem epitelial mais comum (UGRAPPA *et al.*, 2017). Ele representa cerca de 1% dos tumores de cabeça e pescoço e aproximadamente 11% dos tumores odontogênicos com uma taxa de ocorrência global de 0,92% por milhões de pessoas ao ano (MILMAN *et al.*, 2016; HENDRA *et al.*, 2019). A sua origem é fonte de controvérsias, mas especula-se que esteja vinculada aos restos da lâmina dentária, do órgão do esmalte em desenvolvimento, do revestimento epitelial de um cisto odontogênico ou das células basais da mucosa oral (NEVILLE *et al.*, 2009; MAIA; SANDRINI, 2017).

Apesar de ser raro, o ameloblastoma é o segundo tumor odontogênico de maior prevalência, sendo o primeiro o odontoma (PATSA *et al.*, 2016; ARAMANADKA *et al.*, 2018). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017), os ameloblastomas são classificados quanto ao seu aspecto clínico-radiográfico em três subtipos: ameloblastoma convencional (sólido/multicístico), ameloblastoma unicístico e ameloblastoma periférico (extra-ósseo) (WRIGHT; VERED, 2017; SPEIGHT; TAKATA, 2018). Este último representa a variante mais rara do ameloblastoma e difere dos outros subtipos em sua localização: surge nos tecidos moles da cavidade oral que revestem os ossos maxilares. Além disso, geralmente, não manifesta comportamento agressivo, podendo ser tratado por excisão conservadora (BORRELLO *et al.*, 2016).

O ameloblastoma convencional é a variante de maior ocorrência e caracteriza-se por exibir comportamento agressivo, localmente invasivo e com alto índice de recidiva (HEIKINHEIMO *et al.*, 2015; KREPPPEL; ZÖLLER, 2018). A faixa etária de acometimento é variável, mas os maiores índices estão registrados entre 3ª e 6ª décadas, com idade média em torno de 36 anos e pico de incidência na 5ª década. Além disso, não mostra predileção significativa por sexo e homens e mulheres costumam ser atingidos em semelhante proporção de 1,2:1 (BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPPEL; ZÖLLER, 2018).

Anatomicamente, a mandíbula representa o principal sítio de manifestação do tumor, sendo afetada quatro vezes mais, em comparação com a maxila e em ambas as áreas, a região posterior costuma ser mais atingida (GIRADDI *et al.*, 2017; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). Em estágios iniciais do desenvolvimento, apresenta-se como uma massa indolor de crescimento lento, podendo ser pequeno e assintomático, detectável em sua grande maioria por exames radiográficos de rotina, enquanto em lesões mais evoluídas, pode atingir grandes proporções, causar expansão óssea, assimetria, deformidades faciais, parestesia, sintomatologia dolorosa e alterações dentárias, incluindo deslocamento e reabsorção radicular (JHAMB; KRAMER, 2014; HEIKINHEIMO, *et al.*, 2015; BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018).

Em imagens radiográficas, o ameloblastoma convencional costuma exibir um aspecto radiolúcido multilocular, descrito pela literatura como “bolhas de sabão” ou “favos de mel”, a depender do tamanho das loculações (MORE *et al.*, 2012). De modo geral, o aspecto radiográfico pode mostrar o tumor em associação com dente não irrompido, provocando deslocamento de unidades dentárias, promovendo reabsorção radicular ou destruindo corticais ósseas (BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). No entanto, o ameloblastoma convencional pode se apresentar ainda como defeitos radiolúcidos uniloculares, similar às lesões císticas (NEVILLE, *et al.*, 2009; BILODEAU *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). Devido a esta similaridade com demais lesões odontogênicas e não-odontogênicas, torna-se importante fazer o diagnóstico radiográfico diferencial com as seguintes afecções: ceratocisto odontogênico, cisto dentígero, lesão central de células gigantes, ou cisto ósseo simples (HERTOG *et al.*, 2012).

A variante unicística foi descrita pela primeira vez por Robson e Martínez em 1977 (CHOUINARD *et al.*, 2017). É um tipo de ameloblastoma que afeta usualmente pessoas mais jovens, assumindo um crescimento lento e com comportamento relativamente agressivo (HSU *et al.*, 2014). Costuma mimetizar o aspecto de lesão cística, porém contendo linhas de epitélio odontogênico, cuja camada de células está organizada em paliçada e expressando polarização reversa (SOLUK-TEKKEŞİN; WRIGHT, 2017). Em razão desse conteúdo epitelial, pode ser subcategorizado em três formas: luminal, quando o tumor está restrito na superfície luminal do cisto; intraluminal, as células neoplásicas migram em direção ao interior do lúmen, sem para isso, infiltrar no tecido conjuntivo da parede cística; mural, algumas ilhas de epitélio odontogênico invadem a parede do cisto (GARCIA *et al.*, 2016).

Microscopicamente, o ameloblastoma apresenta seis subtipos histológicos principais, porém, sem significância clínica ou prognóstica. Esses padrões estão associados a

variante sólida ou convencional. Dentre essas variantes, o padrão folicular e plexiforme são os mais comuns, enquanto o acantomatoso, de células granulares, desmoplásico e de células basais são menos frequentes (JHAMB; KRAMER, 2014; WRIGHT; VERED, 2017; ARAMANADKA *et al.*, 2018; KREPPEL; ZÖLLER, 2018) (**Figura 1**). Não raro, tem sido descrita a possibilidade de combinação destas variantes, resultando assim em casos híbridos da lesão ou a união com outras neoplasias odontogênicas (IWASE *et al.*, 2017; SATHYANARAYANA *et al.*, 2017).

Independente da forma de apresentação, pode-se encontrar em comum nessas lesões, uma disposição em ilhas ou cordões de tecido epitelial, semelhantes aos tecidos do órgão do esmalte, com células periféricas exibindo morfologia cúbica ou colunar, núcleos hipercromáticos e com polarização reversa e centralmente há um tecido semelhante ao retículo estrelado do órgão do esmalte, imersos em um estroma de tecido conjuntivo maduro (JHAMB; KRAMER, 2014; HEIKINHEIMO *et al.*, 2015; BILODEAU *et al.*, 2018).

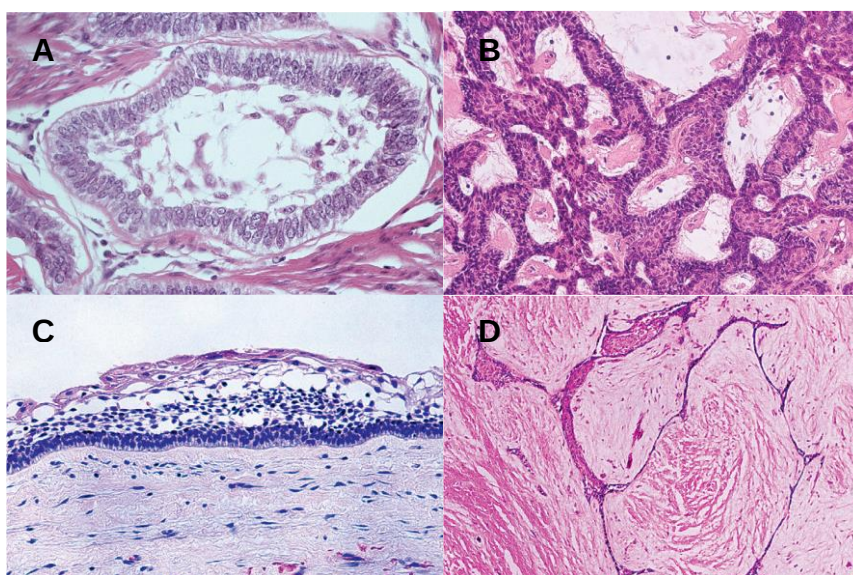


Figura 1 – Fotomicrografia dos tipos histológicos do ameloblastoma (H&E) **Fig. 1A** – Ameloblastoma Folicular; **Fig. 1B** – Ameloblastoma Plexiforme; **Fig. 1C** – Ameloblastoma Unicístico; **Fig. 1D** – Ameloblastoma Desmoplásico. **Fonte:** Neville *et al.*, 2009.

A terapêutica do ameloblastoma é diversificada e envolve métodos conservadores ou radicais, a depender do tipo, localização, proximidade com estruturas nobres, tamanho do tumor e idade do paciente (ABDI *et al.*, 2016; BORELLO *et al.*, 2016; ARAMANADKA *et al.*, 2018). Técnicas conservadoras, como marsupialização, enucleação e curetagem, tornam-

se úteis especialmente para reduzir o crescimento do tumor e diminuir a necessidade de cirurgias extensas que causam deformações anatômicas importantes, principalmente em pacientes pediátricos e em pacientes com tumores de grandes proporções, minimizando assim o risco de morbimortalidade e dificuldade de reabilitação (JHAMB; KRAMER, 2014).

Contudo, devido ao seu comportamento biológico agressivo e às taxas de recorrência significativas, o tratamento de escolha na maioria dos casos é a ressecção cirúrgica, constituindo, assim, o padrão ouro. Nos casos de lesões unicísticas, o tratamento conservador pode ser indicado, assim como para lesões grandes (JHAMB; KRAMER, 2014; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). Porém, a taxa de recorrência com o tratamento conservador ainda é alta, cerca de 60%, em comparação ao tratamento radical (ARAMANADKA *et al.*, 2018).

2.2 PATOGÊNESE DO AMELOBLASTOMA

O termo neoplasia foi descrito pelo oncologista britânico Willis como “uma massa anormal de tecido, cujo crescimento é excessivo e não coordenado com aquele dos tecidos normais, e persiste após a interrupção do estímulo que originou as alterações” (KUMMAR *et al.*, 2010). Dessa forma, os tumores benignos ou malignos são resultantes de alterações genéticas que permitem a proliferação desregulada e independente do estímulo fisiológico de crescimento.

Estas alterações genéticas ocorrem em genes que nas células normais estão envolvidos com o controle do ciclo celular, seja no reparo do DNA danificado ou por indução da apoptose: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (KUMMAR *et al.*, 2010). Os proto-oncogenes promovem o crescimento celular. Estes podem sofrer mutações gerando os oncogenes que sintetizam oncoproteínas, responsáveis pelo descontrole na divisão e proliferação celulares, resultando em uma neoplasia. Os genes supressores de tumor inibem o crescimento celular e reduzem a probabilidade de uma célula se tornar um tumor. Uma mutação em tal gene, portanto, aumenta a possibilidade de formação de uma neoplasia (LEE; MULLER, 2010; KUMMAR *et al.*, 2010). Embora a patogênese do ameloblastoma ainda não esteja elucidada, a partir das suas características neoplásicas e dos conceitos abordados, discute-se que a sua origem e seu crescimento esteja associado a falhas no

processo de controle do ciclo celular com envolvimento dos oncogenes e genes supressores de tumor (DINIZ *et al.*, 2017).

Estudos recentes, através de técnicas moleculares como o sequenciamento de Sanger e o sequenciamento de nova geração, demonstraram a presença de uma mutação em um gene específico de uma das vias de sinalização celular, a via *MAPK* (*Mitogen Activated Protein Kinase*) (BROWN *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; SWEENEY *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016). Essa é definida como uma cascata de quinases que conectam sinais extras e intracelulares, responsáveis por processos fundamentais como proliferação, diferenciação e sobrevivência celular e frequentemente encontra-se desregulada em neoplasias humanas (PEREIRA *et al.*, 2016; LEE *et al.*, 2016; SONG *et al.*, 2018). O gene *BRAF*, codifica a proteína de mesmo nome que participa da via de sinalização MAPK. Desde 2014, diversos autores descreveram a ocorrência frequente de uma mutação no gene *BRAF* em ameloblastomas (SWEENEY *et al.*, 2014; KURPPA *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015; PEREIRA *et al.*, 2016).

A mutação *BRAF* V600E é reportada como a mais comum nos ameloblastomas, consequência da substituição do aminoácido valina (V) pelo ácido glutâmico (E) no códon 600 (BROWN *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014; SOLTANI *et al.*, 2018). Estudos mostram a presença de tal mutação em 46% até 82% dos casos de ameloblastoma (SWEENEY *et al.*, 2014; BROWN *et al.*, 2014; DINIZ *et al.*, 2015; SHIRSAT *et al.*, 2018). Brown *et al.* (2014) relataram mutações *FGFR2-RAS-BRAF* presente em 88% dos ameloblastomas, sendo o *BRAF* V600E o mais comum (62%). Diniz *et al.* (2015) identificaram essa mutação em uma proporção maior, por volta de 82% dos ameloblastomas avaliados, enquanto Sweeney *et al.* (2014) relataram mutações *BRAF* em uma frequência menor, 46%.

Embora a mutação *BRAF*V600E tenha sido originalmente descrita em neoplasias malignas como melanomas cutâneos, uveais e de boca, carcinoma papilar da tireóide, adenocarcinomas pulmonares e adenocarcinomas colorretais, esta alteração genética foi também encontrada em outras lesões benignas como nevos melanocíticos, pólipos do intestino grosso e no tumor neuroectodérmico melanótico da infância (BROWN *et al.*, 2014; GOMES *et al.*, 2014; PEREIRA *et al.*, 2016; KREPPEL; ZÖLLER, 2018). Além disso, estudos detectaram essa mutação em outras lesões orais, como fibromas ameloblásticos, fibro-odontomas ameloblásticos e carcinomas ameloblásticos, sugerindo que a ativação da via MAPK via *BRAF* tem papel fundamental na patogênese de tumores odontogênicos com um componente ameloblástico (BROWN *et al.*, 2014; BRUNNER *et al.*, 2015; DINIZ *et al.*, 2015).

Em adição, o espectro de patologias do complexo crânio-facial afetadas pela mutação BRAF estende-se além dos tumores já citados, envolvendo inclusive os craniofaringiomas, neoplasias intra-cranianas de natureza epitelial, cujo desenvolvimento anátomo-fisiológico assemelha-se ao padrão de histogênese observado em ameloblastomas (BARTELS *et al.*, 2018; GOMES *et al.*, 2018).

Diante da ocorrência da mutação BRAF V600E em alta frequência nos ameloblastomas, alguns estudos verificaram a presença da proteína BRAF mutada (BRAFFV600E) através de exames imunohistoquímicos (CANTO *et al.*, 2018; FREGNANI *et al.*, 2017). Nessa técnica, o anticorpo monoclonal anti-BRAF V600E é utilizado como um marcador específico para a proteína BRAFFV600E. Diante disso, Kurppa *et al.* (2014) encontraram a presença da referida mutação em 63% (15/24) dos casos, cujo resultado foi validado através do sequenciamento de Sanger.

Semelhantemente, Brown *et al.* (2015) detectaram a presença de BRAF V600E em 62% das amostras e compararam a eficácia e sensibilidade da análise imunohistoquímica (IHQ) e biologia molecular (PCR) para a detecção desta mutação, encontrando uma concordância de 100% nos resultados. Estudos posteriores reforçam esses achados, como de Fregnani *et al.* (2017) e de Canto *et al.* (2018) que relataram frequência positiva em 46,6% (34/73) e 78,6% (66/84) para o anticorpo anti-BRAF V600E, respectivamente.

Entretanto, no trabalho de Pereira *et al.* (2016) foram encontrados dados conflitantes entre os resultados de IHQ e o sequenciamento de Sanger. Todos ameloblastomas unicísticos (8/8) apresentaram coloração BRAFFV600E uniforme positiva ao longo do comprimento do revestimento epitelial, porém a mutação não foi confirmada por qPCR e sequenciamento de Sanger em três amostras. Concluíram que a identificação da mutação BRAF V600E em tumores que dependem apenas da IHQ deve ser interpretada com precaução pelos patologistas e que qPCR ou sequenciamento Sanger são os métodos mais apropriados para a identificação inequívoca da mutação.

Caracteristicamente, ameloblastomas com a proteína BRAF V600E positiva apresentaram comportamento mais agressivo e invasivo, associado estatisticamente à presença de recidivas, aparência radiográfica multilocular e ruptura da cortical óssea basal (FREGNANI *et al.*, 2017). Tais características demonstram a relevância clínica da compreensão molecular da patogênese dos ameloblastomas para o posterior manejo através de drogas inibidoras do BRAF, fornecendo benefício para os pacientes com uma opção terapêutica adicional, como descrito em ensaios clínicos de Kurppa *et al.* (2014) e Brown *et al.* (2015).

Não obstante, vários inibidores de MEK (um transdutor da cascata de sinalização RAS-RAF-MAPK - clássica via MAPK) têm sido utilizados no contexto clínico e outros estão em diferentes estágios de desenvolvimento clínico. A terapia com agente único usando trametinib, cobimetinib ou uma combinação de inibidores de MEK e RAF, como dabrafenib e vemurafenib, está atualmente em andamento em vários tipos de câncer, como melanoma e carcinoma pulmonar de células não pequenas (ZHAO; ADJEI, 2014; MARTINELLI *et al.*, 2017).

Tan *et al.* (2016), em seu estudo, obteve resposta de 90% de redução do volume do tumor com o uso do dabrafenib (inibidor de *BRAF*). Kaye *et al.* (2014) relataram um caso de ameloblastoma com múltiplas recidivas após cirurgias radicais com desenvolvimento de metástase pulmonar. A mutação *BRAF* V600E foi detectada e a terapia com dabrafenib e trametinib (inibidor de MEK) iniciou-se com a resolução completa dos sintomas e uma excelente resposta radiológica. Fernandes *et al.* (2018) relataram um caso de controle de um ameloblastoma recorrente com monoterapia com o inibidor de *BRAF*, vemurafenib, resultando também em benefício clínico e resposta radiológica. Apesar de serem dados preliminares, esses achados sugerem que as características moleculares do ameloblastoma poderiam ser úteis para a seleção de terapia personalizada.

2.3 O GENE E A PROTEÍNA BAP1

Neoplasias malignas como melanomas cutâneos e uveais, bem como lesões melanocíticas benignas como o nevo melanocítico e o tumor de Spitz, além de exibirem mutações recorrentes em *BRAF* V600E, estão associados às alterações na expressão nuclear em *BAP1* (*BRCA1-Associated Protein 1*), um gene supressor de tumor localizado no braço curto do cromossoma 3 (3p21.1) (WIESNER *et al.*, 2012; PIRIS *et al.*, 2015; SONG *et al.*, 2017).

O *BAP1* codifica uma enzima removedora de ubiquitina de histonas (proteínas envolvidas na modificação da cromatina e em processos transcricionais), realizando a regulação de eventos-chave na carcinogênese, principalmente, no ciclo celular, promovendo a deubiquitinação do regulador transcricional HCF1 (host cell factor 1) o que influencia na proliferação celular na fase G1/S, atuando no remodelamento da cromatina, de histonas como a H2A e H2AX (SCHEUERMANN *et al.* 2010), além de influenciar na morte celular e na

resposta ao dano ao DNA (MURALI *et al.*, 2013; SONG *et al.*, 2017). Assim, mutações neste gene podem levar a sua inativação e perda de expressão, comprometendo sua atividade supressora tumoral, como já relatado em casos de câncer de pulmão e de mama, em que frequentes deleções da região 3p21 (locus do gene BAP1) tem sido comumente observadas (SONG *et al.*, 2017). Ainda segundo Yu *et al.* (2014), o BAP1 é um dos agentes supressores tumorais mais inativos em cânceres, juntamente com o gene TP53.

Mutações que conduzem à inativação em BAP1 foram associadas à pré-disposição e ao avanço de muitos tumores malignos. Em melanomas cutâneos, a deleção de BAP1 está relacionada não só ao aumento do crescimento do tumor e à migração celular, mas também ao risco de gerar lesões mais agressivas e de maior chance de recidiva (WEBSTER *et al.*, 2018). Assim como no melanoma uveal, o tumor maligno intraocular primário mais comum no adulto, a inativação de BAP1 se mostrou associada ao risco aumentado de metástases (SHAH *et al.*, 2013). Estas neoplasias malignas, bem como lesões melanocíticas benignas como o nevo melanocítico e o tumor de Spitz, além de apresentarem alteração na expressão em BAP1 estão relacionadas às mutações recorrentes em BRAF V600E (WIESNER *et al.*, 2012; GAMMON *et al.*, 2013; PIRIS *et al.*, 2015). Nesse contexto, alguns estudos sugerem a combinação da expressão positiva da proteína mutada BRAF V600E e a perda de expressão nuclear em BAP1 (WIESNER *et al.*, 2012; BUSAM *et al.*, 2013).

A respeito dos tumores melanocíticos em boca, alterações genéticas em BAP1 foram demonstradas, tanto por meio da ocorrência de mutação, como por meio da perda de imunoeexpressão nuclear da proteína, como ilustrado por meio da imunohistoquímica no melanoma de mucosa oral (SONG *et al.*, 2017). Esse tipo de tumor é associado também com a mutação BRAFV600E, embora com uma frequência bem menor quando comparada a dos melanomas cutâneos e uveais. Song *et al.* (2017) identificaram 4/12 casos com a mutação e concluiu que a perda de expressão nuclear de BAP1 é um fator prognóstico independente, de baixa sobrevida global e associada a metástases.

Dessa forma, sabendo da presença da mutação BRAF V600E recentemente reportada em ameloblastomas e da possibilidade de uma perda de expressão da proteína BAP1 combinada com a mutação BRAF V600E, como já descrito em melanomas e outros tumores melanocíticos, este estudo se propõe a investigar a imunoeexpressão de BAP1 em ameloblastomas e assim, tentar identificar um novo evento molecular na patogênese do ameloblastoma.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL:

- Investigar a imunoexpressão da proteína supressora de tumor BAP1 em ameloblastomas.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Avaliar a imunoexpressão do BAP1 em amostras de ameloblastomas.
- Associar, quando possível, a presença ou ausência da proteína supressora de tumor BAP1 com características clínico-patológicas do tumor.

4 METODOLOGIA

4.1 DESENHO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo e transversal. Foi empregada uma amostra de conveniência.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS

Em conformidade com a resolução nº **466** de 2012 do Conselho Nacional de Saúde (CNS), o presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com seres

humanos de duas Universidades: a Universidade Federal de Sergipe (UFS) sob protocolo **CAAE: 82118018.1.0000.5546** (Anexo A), e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob protocolo **CAAE: 13195119000005149** (Anexo B).

4.3 COLETA E CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS

A amostra selecionada compreendeu ao todo de 34 casos diagnosticados histologicamente como ameloblastomas emblocados em parafina, mas 33 foram analisadas quanto a imunohistoquímica. Todos os casos obtidos foram recuperados dos arquivos do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário da UFS, entre os anos de 2014 e 2018 e do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG, entre os anos de 2017 e 2019.

Dados clínicos como sexo, idade, localização, tipo histológico e presença de recidiva, foram obtidos dos prontuários e das fichas dos arquivos supracitados. Lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram recuperadas dos arquivos e incluídas no estudo para confirmação diagnóstica e subsequente classificação histopatológica. Todos os casos incluídos tiveram os diagnósticos revisados por uma mesma patologista bucal (Prof. Dra. Sílvia Ferreira de Sousa), em conformidade com os critérios propostos na última classificação de tumores odontogênicos da Organização Mundial de Saúde (OMS, 2017). Os tumores foram classificados em sólido (com seus respectivos subtipos histológicos) e em unicístico.

4.4 REAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA (IHQ)

Parte do material foi submetido à IHQ no Laboratório de Biologia Molecular que fica alocado no serviço de Patologia Geral do Hospital Universitário e outra no Laboratório de Biologia Molecular da Faculdade de Odontologia da UFMG. Os cortes histológicos apresentaram espessura de 4 µm e foram montados em lâminas de vidro silanizadas (StarFrost®, Knittel Gläser, Germany). O anticorpo primário utilizado foi o anti-BAP1 (Cat n. ab199396, policlonal, Abcam, UK), na diluição 1:100. A técnica foi executada manualmente, conforme padronização sugerida pelo fabricante e adequações necessárias ao protocolo.

Segue abaixo uma descrição resumida da técnica empregada.

Primeiro dia:

- As lâminas com cortes de ameloblastomas foram submetidas à desparafinação com Xilol (inicialmente a 60°C em estufa e depois a temperatura ambiente);
- Hidratação com álcoois em concentrações decrescentes (100%, 95% e 80%);
- Lavagem das lâminas com água destilada;
- Recuperação antigênica com tampão EDTA (pH 8,5) aquecida em forno micro-ondas à temperatura de 90°C por 20 min;
- Aguardou-se período de repouso da solução em temperatura ambiente, até atingir o equilíbrio térmico;
- Prosseguiu-se incubação com peróxido de hidrogênio a 3%, em 2 x 15min, para bloqueio da peroxidase endógena;
- Logo após, lavagem com solução de Tris-Triton 3 x 5 min e posterior incubação em BSA a 1% diluído em solução Tris-HCL (pH 7,4) para eliminação de coloração de fundo;
- Ao término da primeira etapa, aplicação do anticorpo primário e incubação overnight a 4°C por 14 ou 16 horas.

Segundo dia:

- Desincubação das lâminas contendo o anticorpo, seguida de lavagem em solução de Tris-Triton por 2 x 5 min;
- Aplicação do polímero de detecção – anticorpo secundário (Envision) (Dako, Carpinteria, CA, USA) e lavagem das lâminas com tampão Tris-Triton;
- Coloração com cromógeno DAB (Dako, Carpinteria, CA, USA), lavagem com água para cessar a reação química e contra-coloração com hematoxilina;
- Por fim, foram realizados banhos de reidratação com álcoois, fixação com xilol e logo depois montagem das lâminas para visualização microscópica.

4.5 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOHISTOQUÍMICA

Todas as reações imunohistoquímicas foram avaliadas em microscópio óptico (Zeiss, Meditec, Oberkochen, Germany).

Devido à marcação heterogênea de BAP1, a imunorreatividade nuclear foi avaliada semiquantitativamente com base na contagem de núcleos positivos e negativos de 10 campos na área “*hot-spot*” do tumor sob aumento de 400x. Esses 10 campos histológicos foram realizados em um eixo único (horizontal ou vertical). Os eixos escolhidos apresentaram a maior quantidade de células tumorais (pontos quentes) com ampliação de 100x. O número médio de células negativas obtidas nos 10 campos foi expresso em porcentagem. A expressão de BAP1 foi pontuada usando um sistema de categorização de 3 pontos: leve (menos de 30% dos núcleos tumorais com perda de expressão), moderado (31-69% dos núcleos tumorais com perda de expressão) e alto (> 70% dos tumores núcleos com perda de expressão). A presença de coloração citoplasmática foi interpretada como negativa, não sendo considerada durante a avaliação. Fibroblastos, linfócitos e células endoteliais serviram de controle interno positivo para o marcador.

5 RESULTADOS

Dos 34 casos selecionados, 33 casos de ameloblastoma foram submetidos à IHQ por questões relacionadas à qualidade da amostra. Os resultados clínico-patológicos e da IHQ dos ameloblastomas incluídos no presente estudo estão resumidos na **Tabela 1**. A maioria dos casos estava localizada na mandíbula (91,2%), principalmente na região posterior (80,6%) e apresentou discreta predominância masculina (58,8 %), com uma relação homem / mulher de 1,4: 1. A idade média no momento do diagnóstico foi de 34 anos, variando de 6 a 73 anos. Considerando a classificação clínico-patológica, a maioria dos casos (27/34) foi do tipo sólido, com discreto predomínio pelo subtipo histológico folicular (44,5%; 12/27). Em relação ao estado do tumor, 70,6% (24/34) dos casos eram tumores primários e 29,4% (10/34) eram recorrentes, com tempo médio de acompanhamento de 4,1 anos. As **Figuras 2A-C** ilustram exemplos de casos sólidos e unicísticos.

Considerando a imunexpressão de BAP1, foi observada marcação heterogênea e perda da expressão de BAP1 nuclear em áreas de células semelhantes aos ameloblastos, bem como áreas semelhantes ao retículo estrelado do órgão de esmalte (**Figura 2D**). Todas as amostras de ameloblastoma avaliadas apresentaram perda de expressão em pelo menos um dos 10 campos avaliados. A perda de expressão de BAP1 foi considerada alta na maioria dos casos (60,6%; 20/33), e alguns casos apresentaram baixa (**Figura 2E, 2F**) e moderada perda de expressão nuclear de BAP1. A marcação citoplasmática de BAP1, embora não tenha sido avaliada, foi observada.

Não foi possível estabelecer associação significativa entre a expressão de BAP1 e as variáveis clínico-patológicas avaliadas (**Tabela 2**).

A heterogeneidade na imunocoloração nuclear BAP1, representada por áreas bem demarcadas de ausência de expressão nuclear de BAP1 coexistindo com a presença de expressão nuclear de BAP1 no mesmo campo, estava presente em todos os tumores avaliados, embora fosse mais evidente em algumas amostras (**Figura 3**).

Tabela 1 - Dados clínico-patológicos e imunohistoquímicos dos 34 casos de ameloblastomas.

Caso	Idade (anos)	Sexo	Localização	Região	Subtipo clínico	Subtipo histológico Sólido	Manifestação tumoral	Perda de expressão de BAP1
# 1	6	F	Mandíbula	Posterior	Unicístico	—	Primário	Moderada
# 2	11	M	Mandíbula	Posterior	Unicístico	—	Recorrente	Alta
# 3	13	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Baixa
# 4	13	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 5	14	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 6	19	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 7	20	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 8	21	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 9	25	F	Mandíbula	Posterior	Unicístico	—	Primário	Moderada
# 10	24	F	Mandíbula	Posterior	Unicístico	—	Primário	Alta
# 11	26	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Moderada
# 12	28	F	Mandíbula	Anterior	Unicístico	—	Recorrente	Alta
# 13	28	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Recorrente	Moderada
# 14	29	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 15	29	F	Maxila	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 16	29	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Baixa
# 17	32	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Moderada
# 18	32	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Alta
# 19	32	M	Mandíbula	Anterior	Unicístico	—	Primário	Moderada
# 20	33	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Alta
# 21	34	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Recorrente	Baixa
# 22	35	M	Mandíbula	Anterior	Sólido	Plexiforme	Primário	Alta
# 23	35	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Plexiforme	Recorrente	Alta
# 24	39	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Alta
# 25	47	F	Mandíbula	Anterior	Unicístico	—	Primário	Moderada
# 26	48	M	Maxila	Posterior	Sólido	Folicular	Recorrente	NA
# 27	52	F	Mandíbula	Posterior	Sólido	Desmoplásico	Recorrente	Alta
# 28	54	M	Maxila	Posterior	Sólido	Folicular	Recorrente	Alta
# 29	54	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Células basais	Recorrente	Moderada
# 30	54	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Células granulares	Recorrente	Moderada
# 31	58	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Moderada
# 32	63	M	Mandíbula	Anterior	Sólido	Folicular	Primário	Alta
# 33	69	M	Mandíbula	Anterior	Sólido	Células granulares	Primário	Alta
# 34	73	M	Mandíbula	Posterior	Sólido	Folicular	Primário	Alta

M, masculino; F, feminino; —, Não aplicável; NA, Não avaliado;

Tabela 2 - Análise univariada da associação entre variáveis clínico-patológicas e perda da expressão de BAP1.

Variáveis clínicas	Perda de expressão de BAP1			Valor-P*
	Número de casos	Baixa	Alta	
Idade (anos)	<i>n</i> = 33			
< 32	19	8	11	1,00
≥32	14	5	9	
Sexo	<i>n</i> = 33			
Masculino	19	6	13	0,472
Feminino	14	7	7	
Localização	<i>n</i> = 33			
Mandíbula	31	13	18	0,508
Maxila	2	0	2	
Região da mandíbula	<i>n</i> = 31			
Anterior	6	2	4	1,00
Posterior	25	11	14	
Classificação clínica	<i>n</i> = 33			
Sólido	26	9	17	0,393
Unicístico	7	4	3	
Subtipo histológico sólido	<i>n</i> = 26			
Folicular	11	5	6	0,419
Outros	15	4	11	
Manifestação tumoral	<i>n</i> = 33			
Primária	24	9	15	1,00
Recorrente	9	4	5	

* Valor P para o teste exato de Fisher. Significativo quando o valor P <0,05

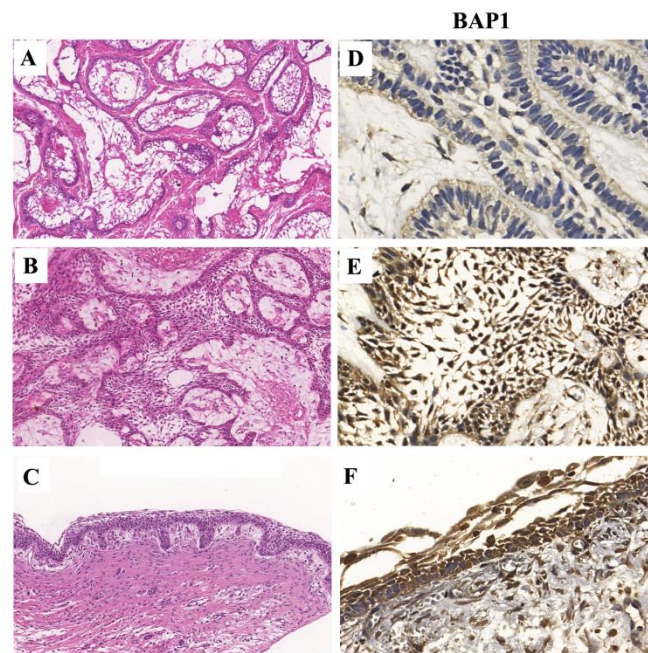


Figura 2 - Achados microscópicos em casos representativos de ameloblastomas investigados para expressão de BAP1. **Fig. 2A** - Os ameloblastomas sólidos exibem células epiteliais odontogênicas em proliferação na periferia, semelhantes aos ameloblastos, dispostas em ilhas de padrão folicular, e cordões anastomosados contínuos do subtipo plexiforme (**Fig. 2B**) dentro de um estroma fibroso (aumento de 100 x). **Fig. 2C** - A variante unicística mostra uma cápsula revestida por epitélio ameloblástico (ampliação de 100 x). **Fig. 2D** - Células de ameloblastoma mostrando alta perda de expressão de BAP1 nuclear em células periféricas colunares em paliçadas, semelhantes aos ameloblastos e nas células frouxamente arranjadas que se assemelham ao retículo estrelado no centro (imunocoloração, aumento de 400). **Fig. 2E e 2F** - Células de ameloblastoma exibindo a baixa (**E, F**) perda da expressão de BAP1 nuclear (imunocoloração, aumento de 400 x).

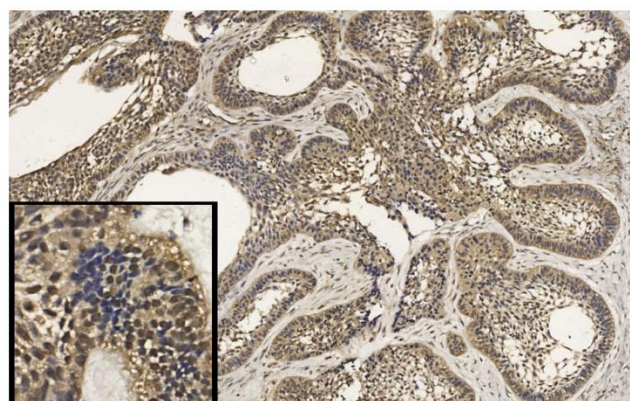


Figura 3 - Fotomicrografias representativas que ilustram a expressão heterogênea de BAP1 em um ameloblastoma sólido. Na caixa detalhada, uma coexistência de perda e presença de coloração nuclear de BAP1 no mesmo campo (imunocoloração, ampliação de 100 x 400).

6 DISCUSSÃO

Ameloblastomas exibem alterações moleculares em proteínas que compõe a via MAPK, sendo a mutação *BRAF V600E* a mais comum. Não obstante, essa oncoproteína tem sido descrita como agente participativo na patogênese de várias outras lesões, especialmente em tumores melanocíticos, os quais também exibem alterações de inativação em *BAP1*. De fato, alguns estudos sugerem a combinação da mutação no *BRAF* e a perda de expressão nuclear em *BAP1* (WIESNER *et al.*, 2011; WIESNER *et al.*, 2012; BUSAM *et al.*, 2013; PIRIS *et al.*, 2015; WEBSTER *et al.*, 2018).

Tumores com perda de expressão nuclear em *BAP1* tendem a apresentar um pior prognóstico, sobretudo por alguns aspectos, que envolvem a migração celular acentuada, sobrevivência, agressividade tumoral, expansão e risco prevalente de metástase (KALIRAI *et al.*, 2014; CHEN *et al.*, 2018). Nesse sentido, a possibilidade de perda de expressão de *BAP1* em ameloblastomas, pode explicar em parte o comportamento neoplásico do tumor, incluindo o seu caráter agressivo, bem como as elevadas taxas de recidiva e os casos que desenvolvem malignização.

Song *et al.* (2017) identificaram a perda de expressão em *BAP1*, em 04 das 12 amostras de melanoma oral analisadas e, até o momento, caracteriza-se como a única lesão de boca a exibir alterações tanto em *BAP1* quanto em *BRAF*. Além disso, ensaios *in vivo* demonstraram que a supressão em *BAP1* colabora conjuntamente com *BRAF* para o desenvolvimento de melanomas cutâneos e sugerem que a deleção em *BAP1* exerce um papel chave para expansão tumoral e migração celular (WEBSTER *et al.*, 2018). Interessante que esse mesmo trabalho revelou que tumores com perda de expressão em *BAP1* responderam adequadamente à terapia com vemurafenib e cobimetinib, fármacos aplicados no tratamento de lesões *BRAF V600E*-positivas (WEBSTER *et al.*, 2018).

No presente estudo, 60% dos ameloblastomas apresentaram alta perda da expressão nuclear de *BAP1*. Devido à heterogeneidade da marcação observada em toda extensão do tecido tumoral, optou-se por estabelecer um score diferente daquele definido para as lesões melanocíticas e demais tumores com alteração em *BAP1*, que empregam uma análise binária positiva ou negativa, quanto à presença de marcação nuclear (MOCHEL *et al.*, 2015; PIRIS *et al.*, 2015; FARQUHAR *et al.*, 2018). Além disso, foi a primeira tentativa de estabelecer um padrão de interpretação desse tipo de marcador em ameloblastomas. A

abordagem adotada para não classificar os tumores simplesmente como positivos ou negativos pode caracterizar melhor os resultados, uma vez que considera a heterogeneidade intratumoral encontrada.

Em estudos de Song *et al.*, (2017), a perda da expressão nuclear de BAP1 foi considerado um fator prognóstico independente de baixa sobrevida global e associado a metástases distantes no melanoma de mucosa oral. Diferentemente, neste trabalho, não houve associação entre a perda da expressão nuclear de BAP1 e as características tumorais que caracterizam mau prognóstico, como recorrência ou variante sólida. No entanto, o tamanho da amostra foi limitado com apenas 7 casos unicísticos versus 26 do tipo sólido, e o período de acompanhamento foi relativamente curto.

A análise da expressão nuclear do BAP1 por meio da IHQ se mostrou como um bom indicador dessa inativação. Este método foi utilizado por Song *et al.* (2017) para identificar a perda da expressão nuclear de BAP1 em melanomas da mucosa oral, posteriormente confirmada a presença da mutação por meio do sequenciamento de Sanger; assim como em Wiesner *et al.* (2012) ao demonstrarem que a avaliação de BAP1 por IHQ foi uma ferramenta útil para também prever a ocorrência de mutação em neoplasias melanocíticas. Portanto, pode-se concluir que nos tumores já avaliados, a avaliação de BAP1 por IHQ se mostrou um método de prognóstico útil, seguro, uma análise rápida e de baixo custo.

Por outro lado, por ser este um estudo pioneiro na investigação da proteína BAP1 em ameloblastoma, não é possível ainda avaliar quais os possíveis efeitos biológicos da perda de expressão nuclear encontrada no comportamento ou prognóstico desses tumores. Além disso, é importante que novos estudos sejam feitos no sentido de se investigar a ocorrência ou não de mutação no gene *BAP1* em função da perda de expressão proteica encontrada nas nossas amostras.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, detectou-se perda da expressão nuclear de BAP1 em uma alta proporção de ameloblastomas. A perda de expressão nuclear não foi associada aos parâmetros clínico-patológicos investigados. No entanto, estudos adicionais são necessários para melhor caracterizar se o BAP1 desempenha um papel na tumorigênese dos ameloblastomas.

REFERÊNCIAS

ABDI, I.; TAHERI TALESH, K., YAZDANI, J. *et al.* The effect of ameloblastoma and keratocystic odontogenic tumor on the displacement pattern of inferior alveolar canal in CBCT examinations. **J Dent Res Dent Clin Dent Prospects**, v. 10, n. 3, p. 155–161, 2016.

ARAMANADKA, C; KAMATH, A.T.; KUDVA, A. Recurrent Ameloblastoma: A Surgical Challenge. **Case Reports in Dentistry**, v. 2018, p. 1-6, 2018.

BARTELS, S.; ADISA, A.; ALADELUSI, T. *et al.* Molecular defects in BRAF wild-type ameloblastomas and craniopharyngiomas-differences in mutation profiles in epithelial-derived oropharyngeal neoplasms. **Virchows Arch**, v. 472, n. 6, p. 1055-1059, 2018.

BILODEAU, E.A; PRASAD, J. L.; ALAWI, F. *et al.* Molecular and Genetic Aspects of Odontogenic Lesions. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 4, p. 400-410, 2014.

BORRELLO, R.; BETTIO, E.; BACCI, C. *et al.* A Conservative Approach to a Peripheral Ameloblastoma. **Case Reports in Dentistry**, v. 2016, p. 1-5, 2016.

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

BRUNNER, P. BIHL, M.; JUNDT, G. *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, out. 2015.

BUSAM, K.J.; SUNG, J.; WIESNER, T. *et al.* Combined BRAF (V600E)-positive melanocytic lesions with large epithelioid cells lacking BAP1 expression and conventional nevomelanocytes. **American Journal Surgery Pathology**, v. 37, n. 2, p. 193-199, 2013.

CANTO, A.M.; DA SILVA MARCELINO, B.M.R.; SCHUSSEL, J.L. *et al.* Immunohistochemical analysis of BRAF V600E mutation in ameloblastomas. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 2, p. 779-784, 2018

CHEN, X.X.; YIN, Y.; CHENG, J.W. *et al.* BAP1 acts as a tumor suppressor in intrahepatic cholangiocarcinoma by modulating the ERK1/2 and JNK/c-Jun pathways. **Cell Death Dis**, v. 9, n. 10, p.1036, 2018

CHOUINARD, A.F; PEACOCK, Z.S.; FAQUIN, W.C. *et al.* Unicystic Ameloblastoma Revisited: Comparison of Massachusetts General Hospital Outcomes With Original Robinson and Martinez Report. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 75, n. 11, p. 2369-2378, nov. 2017.

DAMSKY, W.E. AND BOSENBERG, M. Melanocytic nevi and melanoma: unraveling a complex relationship. **Oncogene**, v. 36, n. 42, p. 5771–5792. 2017

DINIZ, M.G.; GUIMARÃES, B.V.A.; PEREIRA, N.B. *et al.* DNA damage response activation and cell cycle dysregulation in infiltrative ameloblastomas: A proposed model for ameloblastoma tumor evolution. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 102, n. 3, p. 391-395, 2017.

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

FARQUHAR, N.; THORNTON, S.; COUPLAND, S.E. *et al.* Patterns of BAP1 protein expression provide insights into prognostic significance and the biology of uveal melanoma. **J Pathol Clin Res**, v. 4, n. 1, p. 26-38, 2017

FERNANDES, G.S.; GIRARDI, D.M.; BERNARDES, J.P.G. *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, 2018.

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

GAMMON, B.; TRACZYK, T.N.; GERAMI, P. Clumped perinuclear BAP1 expression is a frequent finding in sporadic epithelioid Spitz tumors. **J Cutan Pathol**, v. 40, p. 538–542, 2013.

GARCIA, N.G.; OLIVEIRA, D.T.; RODRIGUES, M.T.V. Unicystic Ameloblastoma with Mural Proliferation Managed by Conservative Treatment. **Case Reports in Pathology**, v. 2016, p. 1-4, 2016.

GIRADDI, G.B.; ARORA, K.; SAIFI, A.M. Ameloblastoma: A retrospective analysis of 31 cases. **Journal of Oral Biology and Craniofacial Research**, v. 7, n. 3, p. 206-211, 2017.

GOMES, C.C.; DE SOUSA, S.F.; GOMEZ, R.S. Craniopharyngiomas and odontogenic tumors mimic normal odontogenesis and share genetic mutations, histopathologic features,

and molecular pathways activation. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 127, n. 3, p. 231-236, 2018.

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.; ELENIOUS K. Novel Targets for the Treatment of Ameloblastoma. **Journal of Dental Research, SAGE Publications**, v. 94, n. 2, p. 237-240, 2015.

HENDRA, F.N.; VAN CANN E.M.; HELDER, M.N. *et al.* Global incidence and profile of ameloblastoma: A systematic review and meta-analysis. **Oral Diseases**, v. 00, p. 1-10, 2019.

HERTOG, D.; BLOEMENA, E.; AARTMAN, I.H. *et al.* Histopathology of ameloblastoma of the jaws; some critical observations based on a 40 years single institution experience. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 17, n. 1, p. 76-82, 2012.

HSU, M.-H.; CHIANG, M.-L.; CHEN J.-K. Unicystic ameloblastoma. **Journal of Dental Sciences**, v. 9, n. 4, p. 407-411, 2014.

IWASE, M.; FUKUOKA, A.; TANAKA, Y. *et al.* Hybrid Desmoplastic/Follicular Ameloblastoma of the Mandible: A Case Report and Review of the Literature. **Case Reports in Pathology**, v. 2017, p. 1-6, 2017.

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

KALIRAI, H.; DODSON, A.; FAQIR, S. *et al.* Lack of BAP1 protein expression in uveal melanoma is associated with increased metastatic risk and has utility in routine prognostic testing. **Br J Cance**, v. 111, n.7, p. 1373–1380, 2014.

KAYE, F.J.; IVEY, A.M.; DRANE, W.E. *et al.* Clinical and Radiographic Response With Combined BRAFTargeted Therapy in Stage 4 Ameloblastoma. **JNCI Journal of the National Cancer Institute, Oxford University Press (OUP)**, v. 107, n. 1, p. 378, dez. 2014.

KREPPEL, M.; ZÖLLER, J. Ameloblastoma— Clinical, radiological, and therapeutic findings. **Oral Diseases**, v. 24, p. 63–66, 2018.

KUMMAR, V. *et al.* **Patologia: Bases Patológicas das Doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

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

LEE, E.Y.H.P.; MULLER, W.J. Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 2, n. 10, p. 32-36, 2010.

LEE, Y.; KIM, Y.J.; KIM, M.H. *et al.* MAPK Cascades in Guard Cell Signal Transduction. **Frontiers in Plant Science**, v. 7, 2016.

MAIA, E.C.; SANDRINI, F.A.L. Management techniques of ameloblastoma: a literature review. **RGO, Rev. Gaúch. Odontol**, v. 65, n. 1, p. 62-69, 2017.

MARTINELLI, E.; MORGILLO, F.; TROIANI, T. *et al.* Cancer resistance to therapies against the EGFR-RAS-RAF pathway: The role of MEK. **Cancer Treat Ver**, v. 53, p. 61-69, 2017.

MILMAN, T.; YING, G.S.; PAN, W. *et al.* Ameloblastoma: 25 year experience at a single institution. **Head and Neck Pathol**, v. 10, n. 4, p. 513-520, 2016.

MORE, C.; TAILOR, M.; PATEL, H.J. *et al.* Radiographic analysis of ameloblastoma: A retrospective study. **Indian J Dent**, v. 23, n. 5, p. 698, 2012.

MORGAN, P.R. Odontogenic tumors: a review. **Periodontol 2000**, v. 57, n. 1, p. 160-176, 2011.

MOCHEL, M.C.; PIRIS, A.; NOSE, V.; HOANG, M.P. Loss of BAP1 Expression in Basal Cell Carcinomas in Patients With Germline BAP1 Mutations. **Am J of Clin Pathol**, v. 143, n. 6, p. 901-4, 2015

MURALI, R.; WIESNER, T.; SCOLYER, R.A. Tumours associated with BAP1 mutations. **Pathology**, v. 45, n. 2, p. 116-126, 2013.

NEVILLE B.W.; DAMM, D.D.; ALLEN, C.M.; BOUQUOT, J.E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009, 972p.

PATSA, S.; JADAV, R.B.; HALDER, G.C. *et al.* Demographic and histopathological variation of ameloblastoma: A hospital-based study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 20, n. 2, p. 230–233, 2016.

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

PIRIS, A.; MIHM, M.C.; HOANG, M.P. BAP1 and BRAFV600E expression in benign and malignant melanocytic proliferations. **Human Pathology**, v. 46, n. 2, p. 239-245, 2015.

SATHYANARAYANA, V.K.; SRIGIRI, H.; CHEEMALAVAGUPALLI, M. *et al.* A Rare Case of Adenomatoid Odontogenic Tumour with Unicystic Ameloblastoma. **J Clin Diagn Res**, v. 11, n. 2, p. ZJ05–ZJ06, 2017.

SCHEUERMANN, J.C.; DE AYALA ALONSO, A.G.; OKTAB, K. *et al.* Histone H2A deubiquitinase activity of the Polycomb repressive complex PR-DUB. **Nature**, v. 465, n. 7295, p. 243–247, 2010.

SHAH, A.A.; BOURNE, T.D.; MURALI, R. BAP1 protein loss by immunohistochemistry: a potentially useful tool for prognostic prediction in patients with uveal melanoma. **Pathology**, v. 45, n. 7, p. 651-666, 2013.

SHIRSAT, P.M.; BANSAL, S.; PRASAD, P. *et al.* Low frequency of BRAF V600E immunoexpression in mandibular ameloblastomas: An institutional study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 22, n. 3, p. 353–359, 2018.

SOLTANI, M.; TABATABAIEFAR, M.A.; MOHSENIFAR, Z. *et al.* Genetic study of the BRAF gene reveals new variants and high frequency of the V600E mutation among Iranian ameloblastoma patients. **Journal of Oral Pathology & Medicine, Wiley**, v. 47, n. 1, p. 86-90, 2018.

SOLUK-TEKKEŞIN, M.; WRIGHT, J.M. The World Health Organization Classification of Odontogenic Lesions: A Summary of the Changes of the 2017 (4th) Edition. **Türk Patoloji Derg**, v. 34, n. 1, 2017.

SONG, A.; HU, Y.; DING, L. *et al.* Comprehensive analysis of mitogen-activated protein kinase cascades in chrysanthemum. **PeerJ**, v. 6, e5037, 2018.

SONG, H.; WANG, L.; LYU, J. *et al.* Loss of nuclear BAP1 expression is associated with poor prognosis in oral mucosal melanoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 17, p. 29080-29090, 2017.

SPEIGHT, P.M.; TAKATA, T. New tumour entities in the 4th edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck tumours: odontogenic and maxillofacial bone tumours. **Virchows Arch**, v. 472, n. 3, p. 331–339, 2018.

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

TAN, S.; POLLACK, J.R.; KAPLAN, M.J. *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, jul. 2016.

UGRAPPA, S.; JAIN, A.; FULORIA, N.K. *et al.* Acanthomatous ameloblastoma in anterior mandibular region of a young patient: A rare case report. **Ann Afr Med**, v. 16, p. 85-9, 2017.

WEBSTER, J.D.; PHAM, T.H.; WU, X.; *et al.* The tumor suppressor BAP1 cooperates with BRAFV600E to promote tumor formation in cutaneous melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v. 00, p. 1–11, 2018.

WIESNER, T.; MURALI, R.; FRIED, I.; *et al.* A distinct subset of atypical Spitz tumors is characterized by BRAF mutation and loss of BAP1 expression. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 36, n. 6, p. 818-830, 2012.

WIESNER, T.; OBENAU, A.C.; MURALI, R. *et al.* Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. **Nat Genet**, v. 43, n. 10, p. 1018-1021, 2011.

WRIGHT, J.M.; ODELL, E.W.; SPEIGHT, P.M. *et al.* Odontogenic tumors, WHO 2005: where do we go from here? **Head Neck Pathol**, v. 8, n. 4, p. 373–382, 2014.

WRIGHT, J.M.; TEKKESIN, S.M. Odontogenic tumors: where are we in 2017? **Journal of Istanbul University Faculty of Dentistry**, v. 51, n. 3 Suppl 1, p. S10-S30, 2017.

WRIGHT, J.M.; VERED, M. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: Odontogenic and Maxillofacial Bone Tumors. **Head and Neck Pathology**, v. 11, n. 1, p. 68-77, 2017.

YU, H.; PAK, H.; HAMMOND-MARTEL, I. *et al.* Tumor suppressor and deubiquitinase BAP1 promotes DNA double-strand break repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 7, n. 111, p. 285-90, 2014.

YUKIMORI, A.; OIKAWA, Y.; MORITA, K.I. *et al.* Genetic basis of calcifying cystic odontogenic tumors. **Plos One**, v. 12, n. 6, p. e0180224, 2017.

ZHAO, Y.; ADJEI, A.A. The clinical development of MEK inhibitors. **Nat. Rev. Clin. Oncol**, v. 11, p. 385-400, 2014.

ANEXOS

ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFS

UFS - UNIVERSIDADE
FEDERAL DE SERGIPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de BAP1 em cistos e tumores de boca

Pesquisador: SILVIA FERREIRA DE SOUSA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 82118018.1.0000.5546

Instituição Proponente: Universidade Federal de Sergipe

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.517.569

Apresentação do Projeto:

O Projeto pretende estudar O gene BAP1 (BRCA1-Associated Protein 1), que codifica uma enzima removedora de ubiquitina de outras proteínas envolvidas na modificação da cromatina e em processos transcricionais. Atua assim, na regulação de eventos-chave na carcinogênese, como o ciclo celular, diferenciação celular, transcrição do DNA, remodelamento da cromatina, morte celular e resposta ao dano do DNA.

Objetivo da Pesquisa:

Investigar se há alterações moleculares no gene supressor de tumor BAP1 em cistos e tumores de boca.

Objetivo Secundário:

•Avaliar a imunolocalização da BAP1 e de BRAFV600E em diferentes cistos e tumores de boca. •Avaliar o status mutacional de BAP1 nos cistos e tumores de boca que evidenciem perda de imunexpressão nuclear. •Correlacionar a expressão de tumores de boca positivos para a proteína BRAF V600E com a imunexpressão de BAP1. •Correlacionar a presença ou ausência da imunolocalização proteica com características clinicopatológicas da lesão. •Correlacionar o status mutacional de BAP1 com características clinicopatológicas da lesão. •Correlacionar a imunolocalização nuclear com o status mutacional.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Devidamente apresentados.

Endereço: Rua Cláudio Batista s/nº

Bairro: Sanatório

UF: SE

Telefone: (79)3194-7208

Município: ARACAJU

CEP: 49.060-110

E-mail: cephu@ufs.br

ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA****Título da Pesquisa:** ANÁLISE MOLECULAR DO GENE BAP1 EM CISTOS E TUMORES DE BOCA**Pesquisador:** SILVIA FERREIRA DE SOUSA**Área Temática:****Versão:** 2**CAAE:** 13195119.0.0000.5149**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio**DADOS DO PARECER****Número do Parecer:** 3.442.360**Apresentação do Projeto:**

BAP1 (BRCA1-Associated Protein 1) é um gene supressor de tumor que codifica uma enzima removedora de ubiquitina de histonas, atuando na regulação de eventos-chave na carcinogênese, como o remodelamento da cromatina, resposta ao dano do DNA e morte celular, de maneira que sua ação influencia no prognóstico de diferentes neoplasias. A via das MAPK (Mitogen activated protein kinases) regula o crescimento celular, sobrevivência e migração através da transdução nuclear de sinais proliferativos, de modo que alterações em componentes dessa via são descritos em tumores benignos e malignos. Estudos com lesões melanocíticas cutâneas e uveais sugerem uma combinação de mutação em gene da via MAPK, a BRAF V600E, e a perda de expressão nuclear em BAP1. A regulação de componentes da via MAPK por BAP1 é ainda suportada por achados de hiperatividade de proteínas dessa via, como ERK1/2, na ausência de BAP1. Vários cistos e neoplasias de boca mostram mutações BRAF V600E recorrentes, além de alterações em ERK1/2, sem que se saiba se há a ocorrência de alterações em BAP1. Até o momento, somente em melanoma de mucosa oral, que exibe mutação em BRAF, observou-se perda de expressão e mutação em BAP1. Há assim, uma escassez de estudos sobre a participação desse gene em patologias de boca. O presente trabalho se propõe a investigar alterações moleculares de BAP1 em diferentes cistos e tumores de boca, independente do status mutacional em BRAF. Trata-se de um estudo observacional, analítico, transversal com seres humanos em que será utilizada uma amostra de conveniência. Primeiramente, será feito um levantamento dos arquivos do Laboratório

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

ANEXO C – ARTIGO SUBMETIDO AO PERIÓDICO *HISTOPATHOLOGY*

Histopathology



**Ameloblastoma shows loss of nuclear BAP1 expression,
independently of the BRAFV600E status**

Journal:	<i>Histopathology</i>
Manuscript ID	Draft
Wiley - Manuscript type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	SANTANA, LUCAS; Federal University of Sergipe SANTANA, ELLEN; Federal University of Sergipe PEREIRA, NUBIA; Universidade Federal de Minas Gerais Albuquerque Júnior, Ricardo Luiz; Tiradentes University, Laboratory of Morphology and Structural Biology Gomez, Ricardo; Universidade Federal de Minas Gerais, Pathology Gomes, Carolina; UFMG, Pathology DE SOUSA, SILVIA; Oral Surgery and Pathology
Keywords:	ameloblastoma, odontogenic tumours, BRAFV600E, BAP1, immunohistochemistry

SCHOLARONE™
Manuscripts