

Maicon Fernando Zanon da Silva

**Determinação da expressão gênica, de microRNAs e proteínas
envolvidos em vias carcinogênicas do carcinoma adenoide cístico de
cabeça e pescoço**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos
para obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Cristovam Scapulatempo-Neto

Co-orientadora: Adriane Feijó Evangelista

Barretos, SP

2020

Maicon Fernando Zanon da Silva

**Determinação da expressão gênica, de microRNAs e proteínas
envolvidos em vias carcinogênicas do carcinoma adenoide cístico de
cabeça e pescoço**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação da
Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos
para obtenção do título de Doutor em Ciências da
Saúde.

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Cristovam Scapulatempo-Neto

Co-orientadora: Adriane Feijó Evangelista

Barretos, SP

2020

S586d Silva, Maicon Fernando Zanon da.

Determinação da expressão gênica, de microRNAs e proteínas envolvidos em vias carcinogênicas do carcinoma adenoide cístico de cabeça e pescoço. / Maicon Fernando Zanon da Silva. - Barretos, SP 2020.

106 f. : il.

Orientador: Cristovam Scapulatempo-Neto.

Coorientadora: Adriane Feijó Evangelista.

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, 2020.

1. Carcinoma adenoide cístico. 2. NanoString. 3. Expressão de microRNAs. 4. Expressão gênica. 5. Proteínas fosforiladas. I. Autor. II. Scapulatempo-Neto, Cristovam. III. Evangelista, Adriane Feijó. IV. Título.

CDD 616.994 316

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada por Martins Fideles dos Santos Neto CRB 8/9570
Biblioteca da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos

FOLHA DE APROVAÇÃO

Maicon Fernando Zanon da Silva

Determinação da expressão gênica, de microRNAs e proteínas envolvidos em vias carcinogênicas do carcinoma adenoide cístico de cabeça e pescoço.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Fundação PIO XII – Hospital de Câncer de Barretos para obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde - Área de Concentração: Oncologia

Data da aprovação: 22/07/2020

Banca Examinadora:

Dr. André Lopes Carvalho

Instituição: International Agency for Research on Cancer, IARC, França.

Dr. Felipe D Almeida Costa

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Dr. Ricardo Ribeiro Gama

Instituição: Hospital de Amor

Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

Orientador

Dra. Adriane Feijó Evangelista Lazarini

Coorientadora

Dra. Márcia M. C. Marques Silveira

Presidente da Banca

Esta dissertação foi elaborada e está apresentada de acordo com as normas da Pós-Graduação do Hospital de Câncer de Barretos - Fundação Pio XII, baseando-se no Regimento do Programa de Pós Graduação em Oncologia e no Manual de Apresentações de Dissertações e Teses do Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram ainda que este trabalho foi realizado em concordância com o Código de Boas Práticas Científicas (FAPESP), não havendo nada em seu conteúdo que possa ser considerado como plágio, fabricação ou falsificação de dados. As opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade dos autores e não necessariamente refletem a visão da Fundação Pio XII - Hospital de Câncer de Barretos. Os pesquisadores declaram não ter qualquer conflito de interesse relacionado a este estudo.

*Dedico aos meus pais, irmãos e todos que
me apoiaram durante o desenvolvimento deste
trabalho.*

AGRADECIMENTOS

Pelo receio de não ser grato o suficiente a todos que foram importantes durante esses quatros anos de pós graduação, sempre achei difícil escrever os agradecimentos. No entanto, ao concluir a tese é impossível não recordar de cada pessoa que durante anos de convivência, fizeram parte de todo processo de desenvolvimento de uma tese de doutorado.

À Deus, agradeço a presença contínua e força, que sempre me confortou ao acreditar que tudo aconteceria da melhor forma, agradeço a paz e serenidade nos momentos mais difíceis.

Agradeço ao meu professor e orientador Cristovam Scapulatempo Neto, pelo reconhecimento, ensinamentos, conselhos e estímulo a minha qualificação profissional, obrigado por sempre ter acreditado em mim.

Agradeço a minha professora e orientadora Adriane Feijó Evangelista que sempre encontrou tempo mesmo durante a maternidade, para com toda paciência, otimismo, companheirismo e bom humor, orientar o desenvolvimento deste trabalho. Você me ajudou do começo ao fim. Adriane, esse trabalho também é seu, obrigado.

Ao Dr Rui Manuel Vieira Reis, agradeço a disponibilidade para discussões, orientações e apoio financeiro para realização de algumas etapas do presente projeto.

Aos assessores Dra Marcia Maria Chiquitelli Marques Silveira e Dr Ricardo Gama, pela disponibilidade e boa vontade em contribuir cientificamente, de forma clínica e molecular para o desenvolvimento e direcionamento do projeto durante todas as bancas de acompanhamento.

Aos professores da Pós graduação pelos conhecimentos compartilhados e por ensinarem tanto durante as aulas.

Aos queridos Letícia Yamane e Caio Sampaio, agradeço pela amizade, questiona-

mentos e interesse sobre este projeto, pelo reconhecimento da minha trajetória profissional e pela leveza com que sempre nos distraímos falando sobre a vida.

Ao amigo Renato José da Silva Oliveira pela amizade, boas conversas e apoio durante a execução de protocolos de bancada.

À amiga Adriana Cruvinel Carloni pela presença constante, pelas palavras cheias de afeto, fé e apoio durante a execução do projeto.

Agradeço as funcionárias da Patologia, Centro de Pesquisa em Oncologia Molecular e Biobanco, Patricia Marconi, Fabiana Oliveira, Ana Carolina Laus, Letícia Ferro Leal e Ana Caroline Neuber pela amizade e disponibilidade sempre que solicitei apoio técnico para execução do projeto.

À secretaria de Pós graduação e EPIT pelas orientações e disponibilidade para esclarecimentos.

Ao NEB, em especial ao Marco Antônio, pelas orientações e esclarecimentos durante as análises estatísticas.

Aos funcionários do SAME e Registro Hospitalar pela disponibilidade e agilidade no levantamento de prontuários médicos.

Agradeço a Eliane Barroso Marçon pelo exemplo de dedicação e comprometimento profissional em todas as suas atribuições.

Estendo os agradecimentos aos meus amigos queridos pelas palavras de incentivo e interesse em saber sobre minha vida de pós graduando, Talitha Menghini Cezaretti, Flávia Coltri Eguchi, Ligia Prado, Deise Reis Mendes, Natalia Campacci, Marina Schmidt Carrijo, Mariana Schmidt Carrijo, Camila Martinelli, Fernanda Cury, Sâmia Frahia, Leticia Braga, Augusto Marino, Murilo Bonatelli.

Por fim as pessoas mais importantes da minha vida...

À Tamires, minha irmã com seu jeito simples e bonito de viver a vida. Ao Dú, meu irmão sonhador e quieto que sempre demonstraram orgulho pelas minhas lutas e vibraram a cada conquista.

À minha mãe Marta e ao meu pai Carlos, que sem entender justificativa, objetivos e metodologia deste projeto, me fortaleceram e motivaram a sua finalização. A vida me deu a oportunidade de ter pais honestos, trabalhadores e que sempre apoiaram a educação como maior instrumento para a mudança de vida. Tenho os melhores pais do mundo. Os exemplos e a conduta pessoal de vocês, sempre foram minha maior inspiração para seguir adiante. Muito obrigado por eu ser a pessoa que sou.

SUMÁRIO

Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Lista de Abreviaturas e Siglas	
Lista de Símbolos	
Resumo	
Abstract	
1 Introdução	1
1.1 Características Gerais do Carcinoma Adenóide Cístico	1
1.1.1 Epidemiologia do Carcinoma Adenóide Cístico	1
1.1.2 Comportamento Clínico e Histopatologia do Carcinoma Adenóide Cístico	3
1.1.3 Tratamento do Carcinoma Adenóide Cístico	5
1.2 Características Moleculares do Carcinoma Adenóide Cístico	6
1.2.1 Dados Moleculares obtidos por Imunohistoquímica em Carcinoma Adenóide Cístico	6
1.2.2 Dados Moleculares obtidos por Análises Citogenéticas e de Expressão Gênica em Carcinoma Adenóide Cístico	8
1.2.3 Dados Moleculares sobre o Perfil de microRNAs em Carcinoma Adenóide Cístico	10
2 Hipótese	12
3 Justificativa	13
4 Objetivos	14

4.1	Objetivo Geral	14
4.2	Objetivos Específicos	14
5	Delineamento Experimental	15
6	Material e Métodos	16
6.1	Aspecto Ético	16
6.2	Critérios de inclusão	16
6.3	Critério de exclusão	17
6.4	Delineamento do estudo	17
6.5	Casuística estudada	17
6.6	Extração de RNA total das amostras parafinadas	19
6.7	Avaliação da qualidade do RNA total extraído	20
6.8	Avaliação das vias de carcinogênese e de microRNAs pela plataforma NanoString	21
6.8.1	Princípio da tecnologia de NanoString	21
6.9	Análise de Expressão Gênica em material parafinado por meio da técnica NanoString	24
6.10	Análise de Expressão de miRNA por meio da técnica NanoString	24
6.11	Protocolo <i>nCounter Vantage 3D RNA-Protein Solid Tumor Assay for Lysates</i>	27
6.11.1	Lise das Amostras	27
6.11.2	Preparação do lisado (amostra de RNA e Proteínas)	27
6.11.3	Hibridização de RNAs e Proteínas	29
6.12	Análise Bioinformática	29
6.13	Análise Estatística	31
6.14	Informações Adicionais do kit RNA-proteínas em lisado de tecido tumoral	32

7	Resultados	35
7.1	Atualização de status de seguimento dos pacientes	51
7.2	Painel customizado mRNA-proteína	56
8	Discussão	58
8.1	Visão Geral do Papel das Translocações Gênicas avaliadas em Carcinoma Adenóide Cístico	58
8.2	Estudos do Exoma	61
8.3	Mecanismos Moleculares de Expressão Gênica e sua Aplicação Clínica	62
8.4	Avaliação da Expressão de microRNAs em Carcinoma Adenóide Cístico	66
8.5	Limitações do Estudo e Perspectivas Futuras	67
9	Conclusão	69
	Referências	70

LISTA DE FIGURAS

1	Localização anatômica das glândulas salivares maiores. Modificado de Panaccione ¹⁰ .	2
2	Aspecto histopatológico dos padrões de crescimento do carcinoma adenoide cístico com coloração hematoxilina-eosina: (A) Tubular; (B) Cribriforme; (C) Sólido.	5
3	Representação esquemática da translocação entre os cromossomos 6q22-23 e 9p23-24 na fusão oncogênica <i>MYB/NFIB</i> . Modificado de Persson ¹	9
4	Esquema ilustrativo da técnica NanoString.	22
5	<i>Heatmap</i> dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes do sexo masculino e feminino com nível de significância de $p \leq 0.05$ e <i>Fold-change</i> ≥ 2.0	37
6	<i>Heatmap</i> dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes do sexo masculino e feminino com nível de significância de $p \leq 0.05$ e <i>Fold-change</i> ≥ 2.0	37
7	Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes do sexo masculino e feminino.	38
8	<i>Heatmap</i> dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com acometimento de glândulas salivares maiores e menores com nível de significância de $p \leq 0.05$ e <i>Fold-change</i> ≥ 2.0	39
9	<i>Heatmap</i> dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com acometimento de glândulas salivares maiores e menores com nível de significância de $p \leq 0.05$ e <i>Fold-change</i> ≥ 2.0	40

10	Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com acometimento de glândulas salivares maiores e menores.	41
11	<i>Heatmap</i> dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com tumores de padrão sólido (mais agressivo) comparado com os demais (tubular e cribriforme) com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$. . .	42
12	<i>Heatmap</i> dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com tumores de padrão sólido (mais agressivo) comparado com os demais (tubular e cribriforme) com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$. .	43
13	Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com tumores de padrão sólido (mais agressivo) comparado com os demais (tubular e cribriforme).	44
14	<i>Heatmap</i> dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão perineural em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$	45
15	<i>Heatmap</i> dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão perineural em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$	46
16	Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão perineural em relação aos que não possuem.	47
17	<i>Heatmap</i> dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão angiolinfática em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$	48

18	<i>Heatmap</i> dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão angiolinfática em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e <i>Fold-change</i> ≥ 2.0	49
19	Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão angiolinfática em relação aos que não possuem.	50
20	Sobrevida global da casuística completa dos pacientes com carcinoma adenóide cístico.	52
21	Sobrevida global de pacientes que apresentam tumores em glândulas salivares maiores comparado ao grupo que possuem tumores em glândulas salivares menores.	53
22	Sobrevida global de pacientes que apresentam tumores com padrão de crescimento sólido comparado ao grupo que possui padrão de crescimento cribriforme/tubular.	54
23	Sobrevida global de pacientes que apresentam invasão perineural comparado com os que não apresentam.	55
24	Sobrevida global de pacientes que apresentam invasão angiolinfática comparado com os que não apresentam.	55
25	<i>Heatmap</i> dos dados normalizados de todos os mRNAs e proteínas que compõem o painel customizado	57

LISTA DE TABELAS

1	Protocolo de anelamento (etapa de avaliação da expressão de microRNAs)	25
2	Protocolo de ligação (etapa de avaliação da expressão de microRNAs) . . .	25
3	Protocolo de purificação para avaliação da expressão de microRNAs	26
4	Componentes do tampão de bloqueio (etapa da avaliação da expressão de proteínas)	28
5	Painel descritivo das 28 proteínas alvos avaliadas	33
6	Painel descritivo dos 32 mRNAs que serão avaliados concomitantemente com as proteínas	34
7	Dados clinico-patológicos dos pacientes avaliados	36

LISTA DE ABREVIATURAS

CAC	Carcinoma adenoide cístico
CV	Coefficiente de variação
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>)
FFPE	Fixado em formalina e embebido em parafina (do inglês <i>Formalin-fixed paraffin-embedded</i>)
HCB	Hospital de câncer de Barretos
HE	Hematoxilina-eosina
miRNA	MicroRNA
OMS	Organização mundial da saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase (do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>)
PEG	Polietilenoglicol
RNA	Ácido ribonucleico (do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>)
UTR	Região não traduzida (do inglês <i>Untranslated Region</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
H	Horas
M	Minutos
mm	Milímetros
ng	Nanograma
RPM	Rotações por minuto
μL	Microlitro
μM	Micromolar

RESUMO

Determinação da expressão gênica, de microRNAs e proteínas envolvidos em vias carcinogênicas do carcinoma adenoide cístico de cabeça e pescoço

O carcinoma adenoide cístico de cabeça e pescoço é uma neoplasia relativamente rara e a segunda neoplasia maligna mais comum em glândulas salivares. Até o presente momento são desconhecidos estudos que conseguiram traçar uma avaliação que contemple expressão gênica, de microRNAs e de proteínas nos carcinomas adenoides císticos. Neste estudo foi avaliado o perfil de expressão de mRNAs e microRNAs a partir de amostras parafinadas de carcinomas adenoide císticos de cabeça e pescoço e a avaliação da expressão de proteínas fosforiladas a partir de lisado de tecido tumoral congelado das amostras disponíveis dos mesmos pacientes. As análises estatísticas e bioinformáticas contemplaram uma avaliação integrada entre as vias de carcinogênese e o perfil de expressão dos mRNAs e miRNAs, bem como a associação de critérios clínico patológicos (topografia, padrão histológico, invasão perineural, invasão angiolinfática, extravasamento capsular e *status* da margem cirúrgica) e sobrevida global. Utilizando a plataforma NanoString que permitiu uma maior acurácia na detecção de biomarcadores mesmo na utilização de amostras de RNA altamente degradadas, o presente trabalho permitiu a identificação de mRNA e microRNAs utilizando um painel de genes sabidamente relacionados ao câncer e esses achados foram associados especificamente as vias de carcinogênese e expressão de proteínas em carcinoma adenoide cístico. Entre os 19 pacientes avaliados, os principais achados mostraram a expressão aumentada de *MYB* em 7 pacientes e *NFIB* em 4, evidenciando a possível co-expressão de ambos em alguns casos. No subtipo histológico sólido, três principais genes da via de reparo de DNA

(*RAD51*, *FANCA* e *H2AFX*) encontraram-se induzidos. Ao avaliar a sobrevida global a partir do agrupamento de padrão de crescimento cribriforme juntamente com o tubular apresentou uma sobrevida mediana de 215 meses. Em contraste, o padrão de crescimento sólido, sendo o subtipo mais agressivo, apresentou mediana de 67 meses. Juntos, esses achados permitiram uma caracterização completa e aprofundada do carcinoma adenoide cístico de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: 1. Carcinoma adenoide cístico 2. NanoString 3. Expressão de microRNAs 4. Expressão gênica 5. Proteínas fosforiladas

ABSTRACT

Determination of genic, microRNAs and protein expression of carcinogenic pathways of adenoid cystic carcinomas of Head and Neck

Adenoid Cystic Carcinoma of the head and neck is the second most common tumor of salivary glands. To date, there is no studies that have been able to perform an evaluation that contemplates gene expression, microRNAs and proteins in cystic adenoid carcinomas. In this study, we evaluated the expression profile of mRNAs and microRNAs from Formalin-Fixed Paraffin-Embedded (FFPE) samples of head and neck Adenoid Cystic Carcinoma and the evaluation of phosphorylated protein expression from frozen tumor tissue lysate of samples available from the same patients. Statistical and bioinformatic analyses included an integrated evaluation between carcinogenesis pathways and mRNAs and miRNAs expression profile, as well as the association of clinical-pathological criteria (topography, histological pattern, perineural invasion, angiolymphatic invasion, capsular leakage and surgical margin status and overall survival). Using the NanoString platform that allowed greater accuracy in detecting biomarkers even when using highly degraded RNA samples, the present study allowed the identification of mRNA and microRNAs using a panel of genes known to be cancer-related and these findings were specifically associated with the pathways of carcinogenesis and protein expression in adenoid cystic carcinoma. Among the 19 patients evaluated, the main findings showed increased expression of *MYB* in 7 patients and *NFIB* in 4, showing the possible co-expression of both in some cases. In the solid histological subtype, three main genes in the DNA repair pathway (*RAD51*, *FANCA* and *H2AFX*) were

found to be induced. The overall survival from the cribriform growth pattern together with the tubular showed median survival of 215 months. In contrast, the solid growth pattern, the most aggressive subtype, had a median of 67 months. Together, these findings allowed a complete and in-depth characterization of adenoid cystic carcinoma of the head and neck.

Keywords: 1. Cystic adenoid carcinoma 2. NanoString 3. MicroRNAs expression
4. Gene expression 5. Phosphorylated Protein

1 INTRODUÇÃO

1.1 Características Gerais do Carcinoma Adenóide Cístico

1.1.1 Epidemiologia do Carcinoma Adenóide Cístico

As neoplasias de cabeça e pescoço acometem aproximadamente 900.000 pessoas por ano, sendo considerada a sexta causa mais comum de morte por câncer¹, podendo comprometer diversos sítios anatômicos, por exemplo, cavidade oral, lábios, glândulas salivares, seios da face, cavidade nasal, faringe, laringe².

De forma geral, os agentes associados com maior frequência à iniciação e progressão de alguns tipos clássicos de tumores de cabeça e pescoço são a exposição aos agentes presentes no cigarro e a ingestão frequente de álcool. Estima-se que aproximadamente 75% das neoplasias de cabeça e pescoço podem estar relacionadas com a combinação de ambos fatores³.

Assim, o total de 1% de todos os tumores malignos de cabeça e pescoço são representados pelo carcinoma adenoide cístico, seguido por 10% dos tumores malignos de glândulas salivares, o que apresenta um perfil de doença. Sua incidência representa 0,4-2,0/100.000/ano. Nos EUA representa 6,0% dos diagnósticos de câncer de cabeça e pescoço, sendo apenas 0,3% de neoplasias de glândulas salivares, enquanto na Dinamarca a incidência é de 1,1/100.000/ano⁴.

Em relação à etiologia, devido à histologia complexa das neoplasias de glândulas salivares, a Organização Mundial da Saúde (OMS) as classificam em 20 tipos histológicos de tumores malignos. Características como localização anatômica, idade e gênero variam entre elas^{5; 6; 7; 8}.

Além disso, a incidência dessa neoplasia varia conforme o tipo de glândula sali-

var. As glândulas salivares podem ser estratificadas em dois grupos: glândulas salivares maiores e glândulas salivares menores⁹. As glândulas salivares maiores possuem localização característica, já as glândulas salivares menores estão espalhadas pela cavidade oral, lábios, seios da face, cavidade nasal, faringe e laringe, contabilizando 600 a 1.000 unidades².

A figura 1 ilustra a subdivisão anatômica das glândulas salivares maiores.

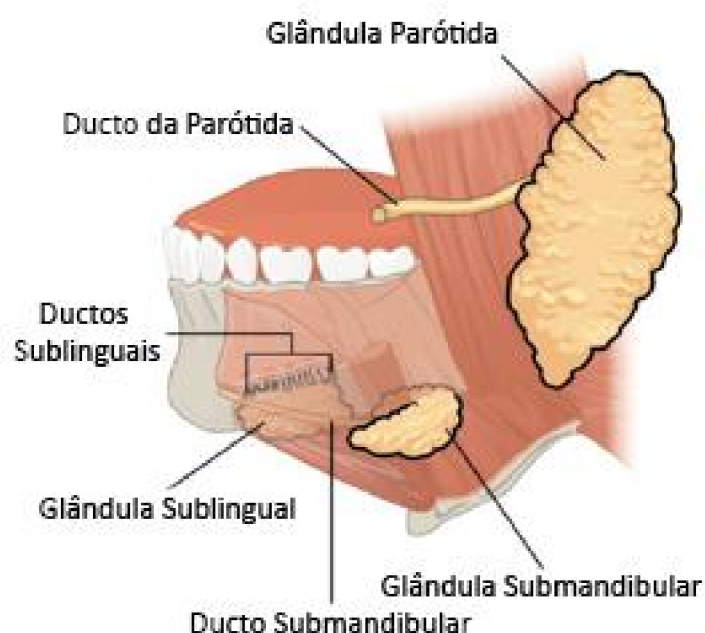


Figura 1. Localização anatômica das glândulas salivares maiores. Modificado de Panaccione¹⁰.

Dentre os tumores malignos, o carcinoma adenóide cístico (CAC) é uma neoplasia relativamente rara, sendo a segunda neoplasia maligna mais comum das glândulas salivares, com acometimento preferencial das glândulas salivares menores (60%). Entre as glândulas salivares maiores, a glândula submandibular é o sítio mais frequente dessa neoplasia^{5; 10; 11; 12}.

No contexto geral, o CAC apresenta uma incidência de 3 a 4.5 casos por milhão

de pessoas, abrangendo entre 10%-15% de todas as neoplasias de glândulas salivares e correspondendo a 1% de todos os tumores de cabeça e pescoço^{13; 14; 15}. É comumente diagnosticado em pacientes entre a 5^a e 7^a década de vida com predileção pelo sexo feminino, com razão F:M de 3:2^{14; 16; 17; 18}.

É importante considerar que o CAC não se restringe apenas aos sítios topográficos de cabeça e pescoço, sendo incidente também ainda que com menor frequência em glândulas exócrinas como mama, vulva, pele, próstata, vias aéreas e órgãos reprodutivos^{12; 14; 15; 16}. O presente estudo concentra-se nos estudos moleculares de CACs de glândulas salivares.

1.1.2 Comportamento Clínico e Histopatologia do Carcinoma Adenóide Cístico

Em termos históricos, foram Foote e Frazell (1953) que descreveram em glândulas salivares maiores e menores o CAC¹⁹. Com o passar dos anos e o maior conhecimento sobre esse tumor, a história natural do CAC ficou bem estabelecida e caracterizada por crescimento lento, curso indolente, alta capacidade de invasão perineural e metástases à distância tardias^{7; 20}.

Em relação à metástases, os sítios mais frequentes são os pulmões, seguido pelos rins, ossos e cérebro^{21; 22}. Uma vez identificadas lesões metastáticas, a sobrevida média é de 20 a 32 meses, dependendo do local da metástase¹¹. A taxa de sobrevida livre de recorrência em 3 anos após o diagnóstico varia de 41% a 46%^{15; 21; 23}. Dados recentes da literatura mostram que a sobrevida livre de doença em 5 anos ocorre em 65-70% dos pacientes, porcentagem essa reduzida para 30-40% quando essa sobrevida é avaliada em 15 anos, caracterizando dessa forma o alto perfil de morbimortalidade apresentado pela doença, a qual é a causa de óbito de 80%-90% dos pacientes nos 15 anos após o diagnóstico

inicial^{23; 24}.

Além da importância prognóstica dos sítios primário e metastático da neoplasia, outros fatores contribuem para um prognóstico desfavorável: tipo histológico, infiltração perineural em nervos de maior diâmetro, margens comprometidas à ressecção cirúrgica e a presença de estádios avançados. Além disso, a pior taxa de sobrevida é conferida pela presença de metástase óssea²⁰.

Em relação aos tipos histológicos, o CAC é constituído por uma dupla população celular, formada por células epiteliais e mioepiteliais. As células têm fenótipo basalóide, núcleos pequenos, angulados, com cromatina densa e exibem citoplasma muito exíguo, com capacidade de produzir matriz extracelular que pode variar de aspecto mixóide à material hialino²⁴.

Patey e Thackray (1958) estabeleceram a importância de se caracterizar o padrão de crescimento deste tipo de tumor uma vez que a agressividade está diretamente ligada ao padrão morfológico predominante^{6; 10}. Desta forma, conforme mostrado na Figura 2, são identificados três padrões de crescimento no CAC, a partir da extensão predominante, sendo estes: tubular (grau I), cribriforme (grau II) e sólido (grau III), nos casos que apresentam extensão de área sólida 30%^{6; 10}.

O padrão tubular é constituído por células arranjadas em ninhos circundadas por variável quantidade de material eosinofílico e frequentemente estroma hialinizado. Ocasionalmente pode haver aumento importante do estroma, levando a compressão dos blocos celulares que podem ficar com aspecto trabecular. Túbulos bem formados são facilmente reconhecidos, com uma camada interna epitelial e a externa mioepitelial. O subtipo cribriforme é o mais frequente, composto de ilhas de células basalóides circundando espaços

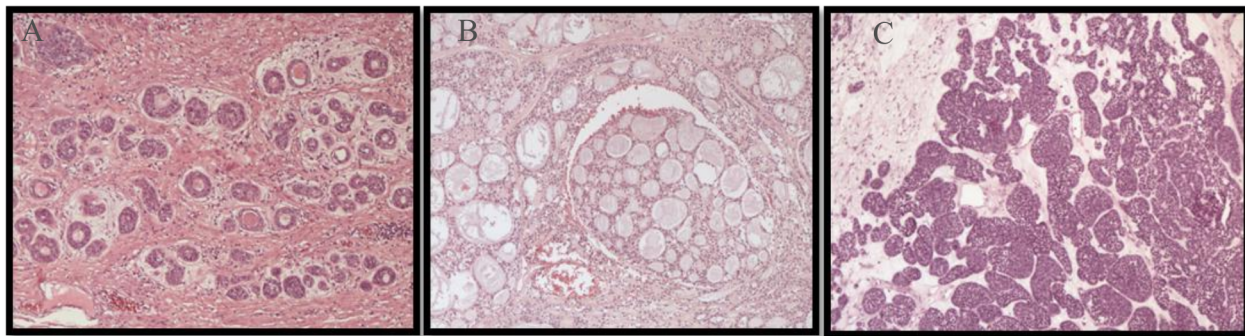


Figura 2. Aspecto histopatológico dos padrões de crescimento do carcinoma adenóide cístico com coloração hematoxilina-eosina: (A) Tubular; (B) Cribriforme; (C) Sólido.

císticos de tamanhos variados, dando um aspecto de queijo suíço. O padrão sólido contém agregados de células basalóides sem formação tubular ou cística. Nesse padrão as células podem ser maiores e pode haver maior pleomorfismo nuclear e necrose^{24; 25}.

É importante ressaltar que, segundo classificação atual da Organização Mundial da Saúde (OMS), o padrão de crescimento deve ser relatado ao invés de se estabelecer uma categorização numérica para sua classificação, pois acredita-se apresentar relações com processos moleculares⁸.

1.1.3 Tratamento do Carcinoma Adenóide Cístico

Conforme já descrito, o CAC é uma neoplasia com curso clínico indolente e com comportamento clínico bastante agressivo. Dessa forma, como conduta terapêutica, a ressecção cirúrgica constitui a principal modalidade de tratamento. Entretanto, a extensa infiltração local e a disseminação através da invasão perineural característica nesta neoplasia frequentemente causam dificuldades para a obtenção de um controle efetivo oncológico com a cirurgia isolada^{26; 27}.

De forma complementar à ressecção, o tratamento radioterápico adjuvante pode

beneficiar o paciente, uma vez que este tumor é radio sensível. Entretanto, como modalidade única de tratamento a radioterapia não propicia a cura da doença, mas sim é efetivo na maioria dos casos para redução do volume tumoral e, concomitante à cirurgia, tem papel importante no controle local da doença²⁸. Logo, a radioterapia como opção isolada de tratamento não se mostra como uma conduta terapêutica elegível para fins de cura, mas poder ser considerada isoladamente como tratamento paliativo^{18; 29}.

Com papel menos importante na adjuvância que o apresentado pela radioterapia, a quimioterapia vem sendo utilizada associada à radioterapia como método terapêutico¹⁴. As drogas mais comumente utilizadas são a carboplatina e o paclitaxel, que exibem resposta terapêutica não muito efetiva¹⁴. As drogas terapia alvo dirigidas como inibidor de c-KIT (Imatinib) e inibidor de EGFR (Gefitinib, Cetuximab), inibidor de proteossoma (Bortezomib) e inibidor de HER-2 e EGFR (Lapatinib), já foram testadas em CACs, e todas elas mostraram-se promissoras na estabilização da doença. Devido à expressão imunohistoquímica de c-KIT no CAC, foi tentado o tratamento com Imatinib, com resultados muito variados (30). No entanto, os trabalhos relatam a ausência de uma resposta objetiva frente a terapias alvo dirigidas e também relatam observar a progressão tumoral durante o tratamento³¹.

1.2 Características Moleculares do Carcinoma Adenóide Cístico

1.2.1 Dados Moleculares obtidos por Imunohistoquímica em Carcinoma Adenóide Cístico

A principal característica do CAC é sua constituição por uma dupla população celular, no qual as células mioepiteliais apresentam expressão de queratinas, actina de

músculo liso, calponina, p63, proteína S100 e proteína ácida gliofibrilar (GFAP), enquanto, as células epiteliais também expressam queratinas, porém, não expressam marcadores mioepiteliais³².

Em paralelo, aproximadamente 78% a 100% dos CAC expressam c-KIT, cuja marcação não está associada à presença de amplificação ou mutações do gene c-KIT, uma vez que a frequência de mutações do c-KIT é muito rara ou praticamente ausente^{12; 29} e, quando presente, mostrou-se não funcional em culturas celulares²⁸. Somente um trabalho mostrou uma alta frequência (88%) de mutações no gene c-KIT³¹, mas o estudo foi severamente criticado pela falta de qualidade metodológica³³.

Até o momento, alguns marcadores moleculares expressos pelo CAC e avaliados por método imunohistoquímico descritos na literatura incluem EGFR, HER-2, p53, c-KIT, COX-2 e BCL2³⁸. Usando essa mesma metodologia, dados obtidos pelo nosso grupo incluem resultados acerca da imunexpressão de FGFR1 total em 97.2% (35/36 casos), PI3K total em 75.7% (25/33 casos), PI3K fosforilado em 47.2%(17/36 casos), AKT total em 100% (35/35 dos casos), AKT fosforilado 79.5% (35/37 casos) e PTEN em 71.8% (23/32 casos).

Em relação às proteínas FGFR1 e PI3K a literatura é escassa, e a frequência de expressão dos mesmos até o presente não foi estabelecida. No entanto, sabe-se que a proteína PI3K pode controlar múltiplas vias de sinalização celular, estando diretamente relacionado com a carcinogênese e pode ser ativada pelos RTKs³⁴. Já a presença de fosforilação de AKT foi reportada por De Lima *et al.*³⁵ nos 22 CACs estudados (100%) e por Volker *et al.*³⁶ em 18 dos 29 casos de CAC estudados (62%). Finalmente, o PTEN é tido como o principal inibidor de PI3K/AKT. Desta forma, a ausência de expressão de PTEN pode acarretar em um aumento da síntese de PI3K e consequente fosforilação da

mesma, apesar dessa co-expressão entre PTEN e PI3K fosforilado não ter sido encontrada no estudo preliminar do nosso grupo.

A complexidade das vias de sinalização e a ausência de estudos publicados sobre esse assunto em CACs evidencia que esta é uma grande lacuna que precisa ser preenchida para entendermos quais vias estão ativas nesses tumores e como elas podem estar sendo reguladas.

1.2.2 Dados Moleculares obtidos por Análises Citogenéticas e de Expressão Gênica em Carcinoma Adenóide Cístico

O primeiro estudo avaliando alterações citogenéticas foi realizado por Sandros et al. (1990)³⁷ utilizando bandeamento-G. Mesmo com as restrições inerentes da técnica, foi possível identificar a deleção do braço longo do cromossomo 6 (6q) em 50% de 189 casos de CAC de glândulas salivares. O que chamou a atenção foi que nessa região encontram-se localizados os oncogenes, *c-ROS*, *c-SYN* e *c-MYB*.

Com o desenvolvimento da técnica *Fluorescence in situ Hybridization* (FISH), a perda de 6q pôde ser reavaliada com maior resolução, demonstrando que se tratava de translocações entre o braço longo do cromossomo 6 e o braço curto do cromossomo 9 (t(6;9)(q21-24;p13-23)), com alteração ainda mais frequente do que previamente relatado³⁸.

Trabalhos recentes, mostram alterações envolvendo a translocação (6;9) (q22-23; p23-24), gerando a fusão oncogênica entre o oncogene *MYB*, que está relacionado a processos básicos do ciclo celular, proliferação, diferenciação e apoptose e o gene *NFIB*, um fator relacionado a transcrição gênica^{12; 23}. Assim, a fusão oncogênica *MYB/NFIB* (Figura 2) passa a ser analisada como uma assinatura genética do CAC, presente em até 79% dos casos. Esta fusão pode ser considerada até determinado ponto um biomarcador efetivo e

auxiliar na detecção e confirmação desta neoplasia, uma vez que não foi documentada em outras neoplasias de glândulas salivares^{12; 23; 39; 40}.

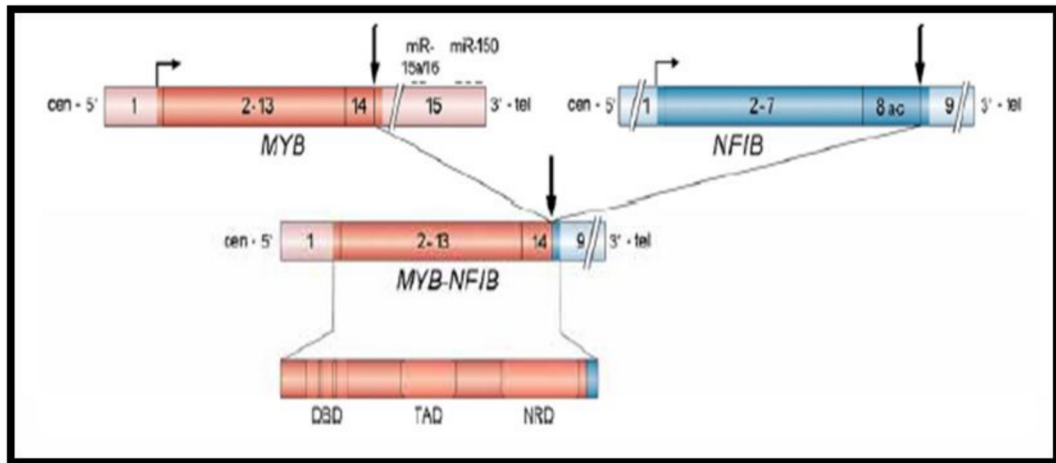


Figura 3. Representação esquemática da translocação entre os cromossomos 6q22-23 e 9p23-24 na fusão oncogênica *MYB/NFIB*. Modificado de Persson¹

Finalmente, a evolução da técnica de *Comparative Genomic Hybridization array* (aCGH) permitiu confirmar perdas na região 6q, dentre outros achados, como perdas cromossômicas em 12q12-q13 e 1p32-36, e ganho em 22q12-q13, 8, 16p, 17q e 18²². Dentre essas anormalidades, destaca-se o gene PDGF em 22q13 em aproximadamente 40% dos casos⁴¹. Além disso, dados recentes sugerem que alterações nessas regiões poderiam restaurar a expressão de genes associados ao desenvolvimento, tais como *SOX4*, *AP-2* e o cross-talk das vias Wnt/B-catenina⁴².

Recentemente, técnicas de análise de expressão gênica em larga escala têm identificado o perfil de expressão de transcritos em CAC, apontando alteração de dezenas de genes e vias carcinogênicas quando comparados com o tecido normal²². No entanto, não existe ainda um consenso entre os estudos, além de poucos genes em comum entre eles. Recentemente, Bell *et al.* (2016)⁴³ mostraram, por meio da técnica de sequenciamento de RNA (RNA-Seq), diferentes perfis de expressão entre amostras de CACs de acordo com

um dos dois tipos celulares dominantes: células epiteliais ou mioepiteliais, um achado importante nesse contexto.

1.2.3 Dados Moleculares sobre o Perfil de microRNAs em Carcinoma Adenóide Cístico

MicroRNAs (miRNAs) são pequenos RNAs (19 a 22 nucleotídeos) altamente conservados, não codificadores de proteínas e que modulam negativamente a expressão gênica em nível pós-transcricional⁴⁴. Assim, os estudos mais recentes tem demonstrado a associação dos miRNAs em vários processos biológicos normais, tais como desenvolvimento, diferenciação, proliferação, apoptose, motilidade e regulação de vias de sinalização celular^{16; 45; 46}. Dessa maneira suas funções regulatórias estão associadas a diversos tipos de câncer e sua expressão induzida ou reprimida, podendo atuar como oncogenes ou supressores tumorais⁴⁷, além de sugerir uma nova classe de biomarcadores a serem estudados na tentativa de caracterização molecular dos CACs.

Além disso, genes codificadores de miRNAs podem gerar a um único transcrito primário, sendo conhecidos como clusters policistrônicos. A ocorrência desses clusters, altamente conservados ao longo da evolução, aumentam o potencial das funções dos miRNAs⁴⁸. Um dos clusters policistrônicos mais bem estudados no câncer é o cluster miR-17-92⁴⁸. Esse cluster já foi associado com o pior prognóstico de CACs⁴⁶.

Além disso, dentre os miRNAs atualmente descritos para os CACs, destacam-se miR15a/16 e miR-150, conhecidos por regular a expressão de *MYB*. Esse gene apresenta vários sítios de ligação de ambos miRNAs na região 3'-UTR, que é a mesma região onde ocorre a translocação *MYB-NFIB* maioria dos casos de CACs, conforme previamente descrito⁴⁶.

Um estudo recente por Mitani *et al.*⁴⁶ com miRNAs em CAC em 30 amostras de tecido tumoral fresco comparados com 4 amostras de glândulas salivares normais, evidenciaram vários miRNAs diferencialmente expressos, os quais puderam ser associados com comportamento agressivo do tumor e pior prognóstico. Além disso, alguns miRNAs desregulados foram associados com a biologia de outros tipos de tumores de cabeça e pescoço. No entanto, os autores sugerem que futuras pesquisas devem ser realizadas para determinar diretamente o papel dos miRNAs diferencialmente expressos no contexto biológico do CAC.

Chen *et al.*⁴⁹ avaliaram a expressão de miRNAs em linhagens celulares de CAC não-metastáticas e metastáticas, os achados evidenciaram um perfil de expressão em ambas linhagens de 38 dos 1,884 miRNAs humanos dos quais, 20 foram induzidos e 18 reprimidos quando comparados com a linhagem controle de CAC. Ao executarem a predição de genes alvos, os miRNAs estavam relacionados com funções biológicas como apoptose, proliferação, ciclo celular, reparo e dano do DNA e vias de sinalização celular. Assim, os achados experimentais demonstraram que alterações no perfil de expressão de miRNAs específicos, podem ser associadas com a progressão metastática.

Considerando o exposto, o presente trabalho visa a identificação de transcritos e microRNAs utilizando um painel de genes sabidamente relacionados ao câncer, utilizando a tecnologia Nanostring que permite a utilização de amostras de RNA altamente degradadas. Além disso, devido à sua robustez já descrita, a plataforma Nanostring permite uma maior acurácia na detecção de biomarcadores, mesmo com baixo número de réplicas biológicas.

2 HIPÓTESE

O Carcinoma Adenóide Cístico pode ser caracterizado por avaliação da expressão gênica (RNA mensageiro e microRNA) e de proteína, cujos marcadores podem estar relacionados com mecanismos da carcinogênese e progressão tumoral.

3 JUSTIFICATIVA

O Carcinoma Adenoide Cístico é uma neoplasia rara que acomete predominantemente glândulas salivares. Este tipo tumoral tem perfil mutacional baixo, assim a compreensão mais aprofundada dos mecanismos moleculares poderá melhorar a rotina diagnóstica, ou mesmo a conduta terapêutica pela descoberta de novos biomarcadores e vias de carcinogênese envolvidas. O presente estudo parte de uma casuística bem representativa e consolidada, buscando abranger tanto transcritos (RNAm e microRNAs) quanto proteínas. Essa avaliação será realizada utilizando um painel de moléculas relacionadas ao câncer, utilizando a tecnologia Nanostring, mais sensível e acurada, que permite a utilização de amostras de RNA altamente degradadas (FFPE). Esses marcadores poderão indicar possíveis vias carcinogênicas com papel importante na patogênese do CAC.

4 OBJETIVOS

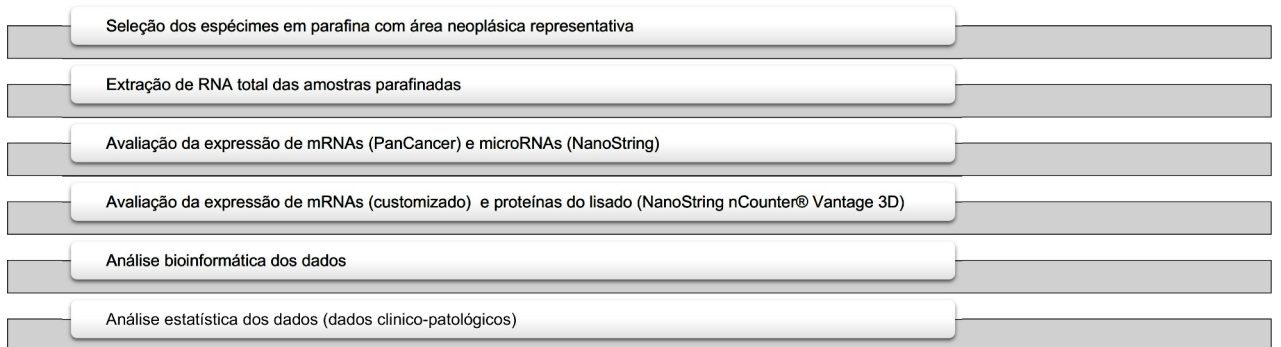
4.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de expressão de transcritos, microRNAs e proteínas nos CACs de cabeça e pescoço buscando associações com dados clínico-patológicos.

4.2 Objetivos Específicos

1. Caracterizar o perfil de expressão de mRNAs e microRNAs em amostras parafinadas de Carcinomas Adenóide Císticos.
2. Avaliar a expressão de proteínas fosforiladas a partir de lisado de tecido tumoral congelado.
3. Realizar uma análise integrada entre as vias de carcinogênese e o perfil de expressão gênica de mRNAs e microRNAs.
4. Associar os critérios clínico-patológicos (topografia, padrão histológico, invasão perineural, invasão angiolinfática, extensão extranodal e *status* da margem cirúrgica) com a expressão de mRNAs e microRNAs.
5. Avaliar um painel customizado de mRNAs e proteínas fosforiladas associados ao perfil celular e imunológico do Carcinoma Adenóide Cístico.

5 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL



6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Aspecto Ético

Este estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos e aprovado em 07/01/2016 sob o número 1.384.902/2016.

Por se tratar de um estudo retrospectivo de casos, não foi aplicado o termo de consentimento livre e esclarecido. Os dados clínicos foram obtidos exclusivamente por meio de revisão de prontuários arquivados no Serviço de Arquivo Médico Estatística (SAME). O estudo oferece risco mínimo aos participantes, sendo o principal deles relacionado à quebra accidental de sigilo. No entanto, a equipe do estudo se compromete em adotar medidas para evitar que tal fato ocorra. Além disso, o estudo não traz benefícios diretos aos seus participantes, mas gera conhecimentos que trarão benefícios futuros.

6.2 Critérios de inclusão

1. Pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma adenóide cístico de cabeça e pescoço.
2. Presença de pelo menos um bloco de parafina e de tecido criopreservado do tumor primário que não foi submetido a qualquer tratamento radioterápico ou quimioterápico prévio, e que esteja disponível no Biobanco do Hospital de Câncer de Barretos.

6.3 Critério de exclusão

1. Material parafinado e congelado insuficientes para extração de RNA para avaliação de expressão de microRNAs e de expressão gênica.

6.4 Delineamento do estudo

Trata-se de um estudo observacional transversal com coleta retrospectiva de dados.

6.5 Casuística estudada

A busca dos pacientes com diagnóstico de Carcinoma Adenoide Cístico foi realizada junto ao departamento de Registro Hospitalar de Câncer e nos arquivos do departamento de patologia do Hospital de Câncer de Barretos (HCB).

Foram selecionados retrospectivamente 119 pacientes com diagnóstico histológico de CAC atendidos no HCB até o ano de 2012. Para cada paciente, foi solicitado junto ao SAME o seu prontuário médico e utilizando o instrumento de pesquisa como guia, foram coletadas informações necessárias para obtermos dados sobre a avaliação clinicopatológica, informações sócio demográficas, estadiamento clínico, número de identificação de blocos referente à biópsia ou peça cirúrgica tumoral incluídas em parafina, tratamentos realizados e informações de seguimento.

Durante a avaliação do prontuário médico, as informações referentes a tabagismo e etilismo (sim atual/sim passado; não atual/não passado) foram consideradas apenas quando relatadas de maneira clara durante a anamnese do paciente, na ausência desta

informação no prontuário consideramos como informação ignorada.

Após, a revisão dos prontuários, todas as lâminas referentes à biópsia ou peça tumoral que estavam fixadas e coradas com hematoxilina-eosina (HE) foram revisadas quanto aos parâmetros histopatológicos de maior interesse nesta neoplasia, sendo: topografia, padrão histológico (tubular/cribriforme/sólido), invasão perineural (presente/ausente), invasão angiolinfática (presente/ausente), extravasamento capsular (presente/ausente) e o status das margens cirúrgicas (livres/comprometidas). Nos casos em que os pacientes possuíam apenas material de biópsia e/ou que houve dificuldade em avaliar presença ou ausência de invasão perineural e angiolinfática estes parâmetros não foram descritos como ausentes e sim classificados como não-avaliáveis. Nos casos em que não observamos a identificação dos blocos nos respectivos laudos anatomopatológicos, consideramos as margens cirúrgicas como não avaliáveis.

Posteriormente, todas as informações registradas no instrumento de pesquisa foram tabuladas em programa SPSS for Windows, versão 21.0, o que permitiu a confecção de banco de dados com informações para triagem completa de cada pacientes. Todos esses dados foram coletados para a dissertação de mestrado já concluída e aprovada pelo CEP do Hospital de Câncer de Barretos, sob o número 135.352 em 29/10/2012.

No presente estudo, foram avaliados, em nível transcriptômico e proteômico, 20 espécimes de tecidos tumorais embebidos em parafina (para utilização em painéis de mRNAs e microRNAs) e seus respectivos espécimes de tecido fresco (para utilização em avaliações proteicas) alinhados com informações importantes de seguimento disponíveis em banco de dados.

6.6 Extração de RNA total das amostras parafinadas

Os blocos de parafina representativos dos 19 pacientes avaliados, tiveram sua lâmina original HE avaliados pelo patologista Dr. Cristovam Scapulatempo Neto, que demarcou a área neoplásica mais representativa, evitando áreas de necrose e não tumoral. Dos blocos de peças cirúrgicas foram realizados 2 cortes com 10 μm de espessura e das biópsias 3 cortes com a mesma espessura, para extração de RNA. As áreas marcadas foram raspadas manualmente com agulha *BD Precision Glade* (1,20 x 40 mm) e transferidas para microtubos estéreis de 1.5 mL. De acordo com as recomendações do protocolo do kit *Recover All Total Nucleic Acid Isolation* (Ambion by Life Technologies, Austin, TX, USA), os cortes raspados anteriormente foram imersos em xilol para remoção da parafina e submetidos a incubação em termobloco (50°C/ 3 minutos), seguido de centrifugação (10.000 rpm/ 2 minutos) para obtenção do *pellet* de células. O xilol foi em seguida removido, tendo sido realizadas duas lavagens com 1 mL de etanol absoluto à temperatura ambiente para remoção do xilol residual, seguido de centrifugação (10.000 rpm/ 2 minutos). Posteriormente removeu-se o sobrenadante, reservando apenas o *pellet* de células que foi submetido a secagem a vácuo no *Speedvac Concentrator* (Thermo Scientific, Asheville, NC, USA) por 45°C durante 15 minutos em velocidade padrão.

Na sequência, ocorreu a etapa de lise celular, em que foram adicionados 4 μL de protease e 100 μL de tampão de digestão, tendo sido as amostras incubadas por 50°C/ 4 minutos). A etapa de inativação da protease realizou-se por aquecimento (80°C/ 15 minutos). Após a inativação da protease, iniciou-se a etapa de separação dos ácidos nucleicos e para isso, adicionou-se 275 μL de etanol absoluto e 120 μL de *isolation additive* (reagente fornecido pelo kit) a cada amostra.

O próximo passo foi a etapa de purificação das amostras em colunas de adsorção

para retenção do RNA total, no qual o material filtrado é descartado. Assim, duas etapas de lavagens foram realizadas: a) Adicionou-se a coluna 700 μL da solução Wash 1, seguido de centrifugação a temperatura ambiente (10.000 rpm/ 30 segundos). O material filtrado foi descartado e na mesma coluna adicionou-se 500 μL da solução Wash 2, seguido de centrifugação a temperatura ambiente (10.000 rpm/ 30 segundos). b) As colunas de purificação foram submetidas à nova centrifugação (10.000 rpm/ 30 segundos) à temperatura ambiente para remoção das soluções residuais das lavagens anteriores.

A próxima etapa consistiu no tratamento com DNase (4 μL de enzima DNase, 6 μL de 10X DNA buffer e 50 μL de água nuclease free). Cada amostra recebeu 60 μL do master mix de reação no centro da coluna que foram incubadas à temperatura ambiente durante 30 minutos. Em seguida foram realizados os processos de lavagem com as soluções Wash 1 e por duas vezes com Wash 2.

No final do procedimento, colunas foram transferidas para novos tubos coletores e dispensou-se no centro de cada filtro 30 μL de água livre de RNAs. Após 1 minuto da incubação à temperatura ambiente, submeteu-se as amostras à centrifugação (13.400 rpm/ 1 minuto) para obtenção do RNA total eluído, sendo armazenado em freezer -80°C até o momento do uso.

6.7 Avaliação da qualidade do RNA total extraído

As amostras de RNA total foram submetidas à quantificação em *NanoDrop* ND-200 espectrofotômetro (NanoDrop Products, Wilmington, DE, USA), para obtenção da concentração de RNA na escala de $\text{ng}/\mu\text{L}$ e as razões 280/260 e 280/230.

6.8 Avaliação das vias de carcinogênese e de microRNAs pela plataforma NanoString

6.8.1 Princípio da tecnologia de NanoString

A tecnologia NanoString é uma técnica de contagem digital que permite a detecção de centenas de moléculas em um único ensaio. É considerado atualmente o método de detecção em larga escala mais sensível, superando as técnicas de *microarrays* e sequenciamento de nova geração. Além disso, a principal vantagem desse sistema é que, por utilizar um método de contagem, não possui erros comuns de hibridação, amplificação de ácidos nucleicos e sequenciamento. Por essa razão, ensaios moleculares realizados por NanoString não necessitam de validação posterior por PCR ou sequenciamento capilar, apresentando maior sensibilidade e redução de custos, sendo de grande interesse na prática clínica.

O princípio da técnica NanoString inclui a utilização de barcodes moleculares e a geração de uma imagem microscópica de alta resolução, que juntos permitem a contagem de diversas moléculas únicas em uma única reação. Um esquema ilustrativo do método encontra-se descrito na Figura 4.

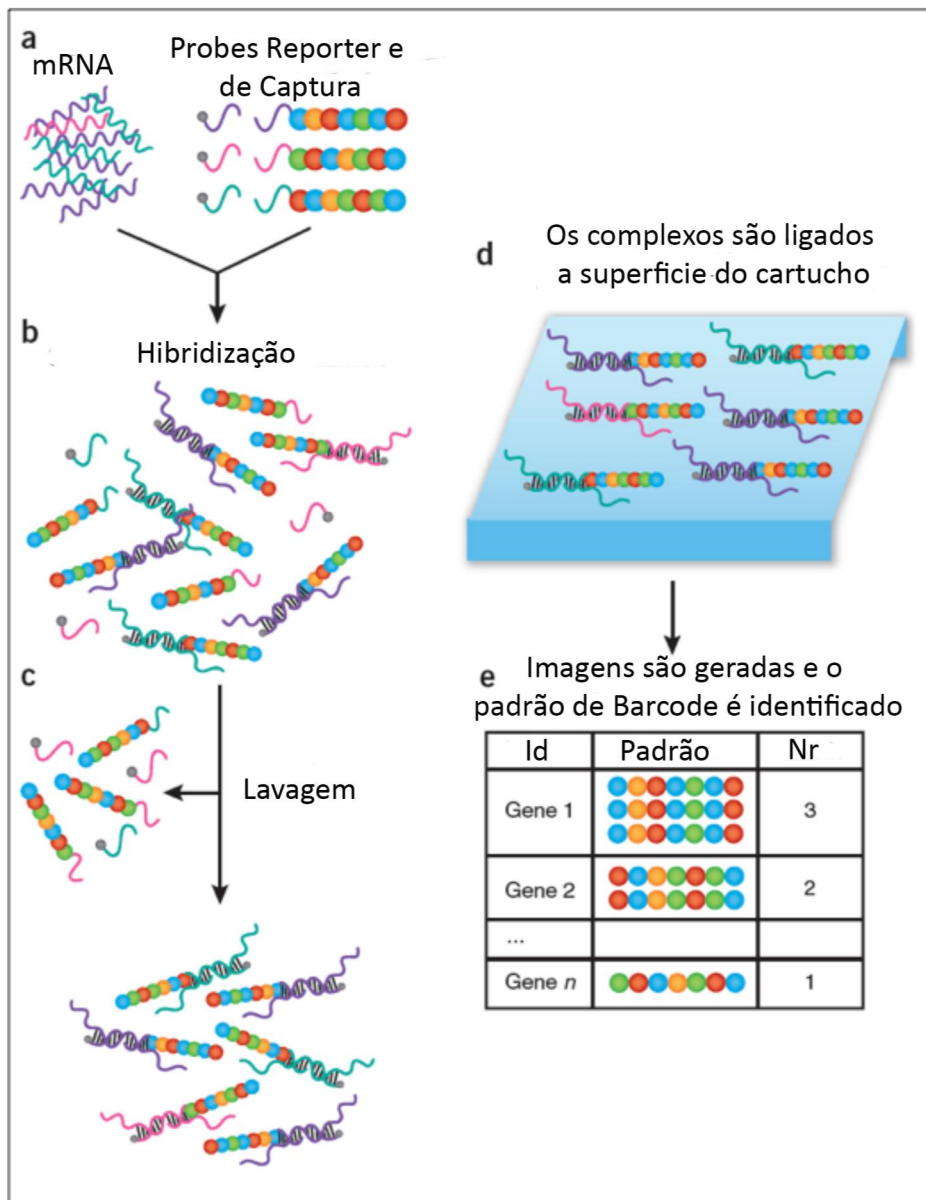


Figura 4. Esquema ilustrativo da técnica NanoString.

O processo inicia-se com a adição de uma *probe* específica que possui tanto uma sequência de pares de bases complementar para cada alvo de interesse (DNA, RNA ou mi-croRNA) como *barcodes* moleculares fluorescentes únicos. No primeiro passo, cada *probe* contendo um *barcode* único irá hibridizar com um alvo de interesse na solução (um trans-crito de fusão, por exemplo). Assim, várias *probes* com *barcodes* diferentes são adicionadas (de acordo com o número de alvos), permitindo que os mesmos sejam identificados (Figura 3a e b). Essas *probes* são conhecidas como *reporters*, pois carregam o sinal, enquanto uma segunda *probe* (*probe* de captura), que contém biotina, permite que o complexo probe/alvo seja imobilizado para a coleta de dados. A segunda etapa inclui a purificação (Figura 4c) e imobilização das moléculas (Figura 4d), na qual o excesso de *probes* é removido e os complexos *probes*/alvos são alinhados e imobilizados. A imobilização ocorre dentro de um cartucho revestido com estreptavidina, o *nCounter Cartridge*, que se liga à biotina das *probes* de captura, permitindo assim o processo de contagem digital (Figura 4e).

O fluxo de trabalho da técnica de NanoString passa por uma etapa inicial de preparação das amostras e incubação, as amostras são colocadas em uma estação de preparação automatizada (*PrepStation*), cuja função é realizar a etapa de purificação, removendo o excesso de sondas e a mobilização dentro dos cartuchos, sem contato ma-nual. A coleta de dados ocorre em um segundo aparelho no qual os cartuchos prontos são inseridos, o *nCounter*, que gera diversas imagens de alta resolução e conta as moléculas de acordo com o padrão de fluorescência determinado pelos *barcodes* na superfície dos cartuchos. Os dados de contagem são tabulados e exportados para análise posterior.

6.9 Análise de Expressão Gênica em material parafinado por meio da técnica NanoString

Seguindo o protocolo recomendado pelo kit *nCounter Gene Expression 12 Assays*, foi preparado um *master mix*: adicionou-se 130 μL do buffer de hibridização em um microtubo contendo a sonda *reporter* (fornecido pelo kit). Foi então adicionado 20 μL do *master mix* em cada um dos tubos. Posteriormente adicionou-se 5 μL (100 ng) de RNA total a cada um dos microtubos, seguido da adição de 5 μL da sonda *capture*. Imediatamente, foi realizada a etapa de hibridização a 65°C durante 21 horas.

Após a finalização da etapa de hibridização, as amostras foram transferidas para uma estação de preparação automatizada (*PrepStation*) para purificação e preparação dos cartuchos (*nCounter® Cartridge*) durante 3h e 30m. Finalmente, os cartuchos contendo os complexos imobilizados e alinhados foram transferidos para o *nCounter Digital Analyzer* (NanoString Technologies), utilizando alta resolução que fornece 600 imagens por amostra.

6.10 Análise de Expressão de miRNA por meio da técnica NanoString

Nesse procedimento, foi utilizado 100 ng de RNA total, de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. Foi utilizado o kit *miRNA Sample Preparation 12 Assays*, com a diluição prévia dos controles positivos da reação (fornecido pelo kit), por diluição 1:500 do *miRNA Assay Controls*: adicionou-se 499 μL de água ultra pura no tubo contendo 1 μL de miRNA controle, estocou-se em gelo. Esse controle é utilizado como padrão para avaliação da qualidade da reação.

A próxima etapa é o anelamento, sendo adicionados 13 μL de *buffer* de anelamento, 26 μL de reagente *Tag de nCounter miRNA* e 6,5 μL do controle de miRNA

diluído anteriormente. Em seguida acrescentou-se 3,5 μL do master mix de anelamento em cada um dos tubos juntamente com 3 μL (100 ng) de RNA e realizou-se o protocolo de anelamento no termociclador, conforme apresentado abaixo:

Tabela 1. Protocolo de anelamento (etapa de avaliação da expressão de microRNAs)

Temperatura	Tempo
94°C	1 minuto
65°C	2 minutos
45°C	10 minutos
48°C	<i>hold</i>
2.5 μL master mix de ligação	5 minutos
Tempo total	20 minutos

Em seguida foi preparado o *master mix* de ligação, por adição de 19,5 μL de PEG ao tubo contendo 13 μL de *buffer* de ligação, conforme apresentado abaixo:

Tabela 2. Protocolo de ligação (etapa de avaliação da expressão de microRNAs)

Temperatura	Tempo
48°C	3 minutos
47°C	3 minutos
46°C	3 minutos
45°C	5 minutos
65°C	10 minutos
4°C	<i>hold</i>
Tempo total	24 minutos

Após atingir a temperatura de 48°C no protocolo de anelamento, adicionou-se 2,5 μL do *master mix* de ligação em cada tubo (48°C/ 5minutos). Finalmente, adicionou-se 1 μL de enzima de ligação *clean-up* em cada tubo e iniciando assim o protocolo de purificação, conforme apresentado abaixo:

Tabela 3. Protocolo de purificação para avaliação da expressão de microRNAs

Temperatura	Tempo
37°C	1 hora
70°C	10 minutos
4°C	<i>hold</i>
Tempo total	1 hora e 10 minutos

Finalizada a etapa de purificação das amostras, adicionou-se 40 μL de água ultra pura em cada tubo, sendo imediatamente transferido para o gelo.

Logo após a preparação das amostras, foi utilizado o protocolo *miRNA Hybridization up 12 nCounter Assays*. Iniciou-se com a preparação do *master mix*, a saber: 130 μL de *buffer* de hibridização ao tubo contendo 130 μL da sonda *reporter*. Em seguida acrescentou-se 20 μL do *master mix* em cada um dos tubos juntamente com 5 μL de amostra de miRNA denaturado previamente (85°C/ 5minutos), na sequência foram acrescentados 5 μL da sonda *capture*. Imediatamente, seguido de incubação a 65°C durante 21 horas para realização da etapa de hibridização.

Finalizada a etapa de hibridização, as amostras processadas foram transferidas para uma estação de preparação automatizada (*PrepStation*) para purificação das amostras e transferência para o cartucho (*nCounter® Cartridge*) durante 3h e 30m. Finalmente, os cartuchos contendo os complexos imobilizados e alinhados foram transferidos para o *nCounter Digital Analyzer* (NanoString Technologies), utilizando alta resolução que fornece 600 imagens por amostra.

6.11 Protocolo *nCounter Vantage 3D RNA-Protein Solid Tumor Assay for Lysates*

6.11.1 Lise das Amostras

A partir de tecido congelado de amostras de carcinoma adenoide cístico, lisou-se as células utilizando o tampão de lise (SDS) diretamente em uma placa de célula de cultura. O procedimento assegurou uma quantidade entre 0.5-1.5 mg/mL de concentração de proteína. A partir das possíveis perdas durante as etapas, iniciou-se o procedimento com uma concentração de proteínas > 0.5 mg/mL.

6.11.2 Preparação do lisado (amostra de RNA e Proteínas)

A partir da concentração determinada pelo kit de determinação de proteínas a 660 nm, diluiu-se uma pequena alíquota de 0.25 mg/mL usando H₂O livre de DNase/RNase.

Diluiu-se o lisado em uma concentração de proteína de 5 ug/mL utilizando PBS pH 7.2 2 mM de azida (NaN₃), pipetou-se 50 µl do lisado diluído em um poço de uma placa com afinidade de proteína (MAXISORP) e selou-se com um parafilme. Incubou-se por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente adicionou-se 200 µl do tampão de bloqueio (*blocking buffer*) pré-aquecido à temperatura ambiente, diretamente nos poços da placa contendo o lisado. Incubou-se a placa por 1 hora a temperatura ambiente. Na sequência, descartou-se o sobrenadante invertendo a placa na pia, pressionou-se a placa para blotting o suficiente para remover o líquido residual. Lavou-se 3x adicionando 250 µl de TBST a temperatura ambiente por 1 minuto. Removeu-se e descartou-se o sobrenadante invertendo a placa na pia, pressionando sobre o papel para blotting o suficiente para remover o líquido residual.

Preparou-se uma solução de uso de anticorpos adicionando o mix de anticorpos

em tampão de bloqueio (*blocking buffer*), conforme tabela abaixo:

Tabela 4. Componentes do tampão de bloqueio (etapa da avaliação da expressão de proteínas)

Reagente	Volume
Mix de anticorpos	16 μ l
Tampão de bloqueio	625 μ l
TOTAL	641 μ l

Adicionou-se 50 μ l de solução de uso do mix de anticorpos em cada poço da placa contendo as amostras. Selou-se a placa com parafilme e incubou-se a temperatura ambiente entre 2 a 3 horas em um orbiter shaker a 350 a 400 rpm. Cuidadosamente retirou-se toda a solução de anticorpos com uma pipeta e descartou-se o sobrenadante.

Realizou-se um total de 6 lavagens, adicionando-se 250 μ l de TBST a temperatura ambiente, seguido de uma incubação por 5 minutos. Removeu-se o sobrenadante invertendo a placa na pia, pressionando sobre papel para blotting o suficiente para remover o líquido residual. Repetiu-se as etapas 1 e 2.

Na sequencia, adicionou-se 50 μ l de RLT (do kit de extração de RNA) em cada poço e selou a placa com parafilme. As placas foram colocadas em um orbiter shaker por 5 minutos a 350-400 rpm. Transferiu-se o lisado para uma strip de 12 poços. Na sequencia submeteu-se a denaturação a 95°C por 5 minutos em um termociclador com tampa aquecida a 100°C. Após o termino da reação, imediatamente transferiu-se a amostra para o gelo, seguido de vortex.

6.11.3 Hibridização de RNAs e Proteínas

Inicialmente preparou-se um master mix dentro do tubo de reporter *CodeSet*-RNA, adicionou-se 70 μL de Hybridization Buffer e 28 μL de *Protein Plus Reagent* (kit de proteína). Inverteu-se o tubo levemente para homogeneização e seguiu-se para centrifugação. Adicionou-se 10 μl do mix preparado ao tubo de sonda *Reporter* e distribuiu-se a cada um dos 12 tubos da strip. As amostras de proteínas foram denaturadas em termociclador a 95°C por 5 minutos e imediatamente transferiu-se para o gelo por 2 minutos.

Adiciou-se a cada um dos 12 tubos 4 μL do lisado de RNA juntamente com 1 μL do lisado de proteína. Homogenizou-se por inversão no tubo de *Capture ProbeSet* seguido de um *spin*. Adicionou-se 2 μL de *Capture ProbeSet* a cada um dos 12 tubos da strip imediatamente. Os tubos foram homogeneizados por inversão seguida de uma centrifugação rápida, e imediatamente transferiram-se as amostras para termociclador a 65°C. As reações foram incubadas por 24 horas. O tempo foi definido a partir da observação fornecida pelo manual de que as contagens podem acumular com o tempo estimado em 5% por hora entre 16 e 24h.

6.12 Análise Bioinformática

Tanto para os dados obtidos de mRNA (PanCancer) quanto para os microRNAs e proteínas, os valores brutos obtidos pelo NanoString foram submetidos a uma etapa de normalização dos dados, cujo objetivo é corrigir as variáveis experimentais entre as amostras, tais como diferenças na eficiência de hibridização, purificação ou de ligação. Esta normalização é feita pela multiplicação dos valores de contagem das moléculas por um fator de normalização, que é calculado pela média dos valores dos controles positivos

dividido pela soma de cada amostra. Os arquivos em formato RCC foram importados no ambiente matemático e estatístico R e convertidos em uma matriz de expressão de dados brutos. Avaliação do controle de qualidade foi realizada conforme descrito:

- Avaliação da dispersão dos dados pela relação Média versus desvio padrão de todas as *probes*, incluindo controles positivos e negativos;
- Cálculo do coeficiente de variação (CV) das amostras;
- Avaliação dos efeitos de *batch* entre as amostras, e entre cartuchos por meio de regressão linear;
- Relação entre a proporção de *probes* não detectadas pela média das amostras nos dados brutos;
- Estimativa de conteúdo de RNA pela relação entre genes *housekeepings* pelos genes de maior expressão nos dados brutos;
- Inspeção dos controles positivos e negativos por meio da relação entre as contagens observadas em log2 pela concentração esperada em log2 de fM;

A etapa de normalização foi realizada utilizando três métodos, em caráter comparativo:

- Seleção dos microRNAs com os menores CVs para serem utilizados como *housekeepings*.
- MicroRNAs com menores CVs identificados a partir de um valor de corte determinado pela média geométrica de todos os microRNAs avaliados (*housekeeping.geo.mean*),
- Média geométrica de 75% dos microRNAs de maior expressão (*top.geo.mean*),

A partir da definição dos *housekeepings*, foi calculado o *scaling fator* (sf) ou fator de normalização para cada *lane* do cartucho de NanoString, por meio da razão entre a média das médias geométricas de todas as *lanes* pela média geométrica de cada *lane*. A

partir deste valor de *sf* calculado, procede-se o processo de a normalização das amostras pela multiplicação de cada valor bruto de microRNA pelo *sf* da *lane* correspondente.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o método padrão de Teste *t* de Student, considerando-se o nível de significância de $P \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$, por meio do pacote *multtest* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/multtest.html>). Para construção dos *heatmaps* foi utilizado o pacote *ComplexHeatmaps* (<http://www.bioconductor.org/packages/release/bioc/html/ComplexHeatmap.html>).

Finalmente, os alvos de miRNAs foram identificados utilizando a ferramenta mirDIP (<http://mirdip.ophid.utoronto.ca/mirDIP/>), que integra diversos algoritmos de predição (*DIANA micro T*, *microrna org conserved*, *microrna org nonconserved*, *mirbase*, *MirTar2 v4.0*, *ver2 hg18 Mar2006 mammals*, *PITA ALL*, *PITA TOP*, *RNA22 v2*, *targetscan conserved*, *targetscan nonconserved*), calculando um *score* entre eles, que varia de 0 a 0.3. Foram selecionados alvos presentes em pelo menos 3 algoritmos e que apresentaram um *score* regular ($score \geq 0.05$), considerando que pelo menos um que esteja acima da faixa considerada boa ($score \geq 0.1$). Foram identificados dentre os alvos os transcritos que estavam diferencialmente expressos pelo NanoString e os achados foram organizados em forma de redes utilizando o software Cytoscape (<http://www.cytoscape.org>), assim como seus aplicativos de enriquecimento funcional.

6.13 Análise Estatística

A análise de sobrevida livre de doença foi analisada considerando o tempo, em meses, da data de cirurgia até o aparecimento da primeira recidiva local, regional, à distância ou última informação de seguimento. Somente os pacientes que sofreram tratamento com

intenção curativa e que não apresentam metástase ao diagnóstico tiveram calculada a sobrevida livre de doença. Para análise de sobrevida global, o tempo foi determinado em meses, decorrente entre a data de cirurgia e data de óbito ou última informação de seguimento.

6.14 Informações Adicionais do kit RNA-proteínas em lisado de tecido tumoral

A partir dos achados de vias de carcinogênese, e genes isolados identificados nos ensaios de PanCancer e painel de microRNA, foi realizado levantamento no Biobanco da instituição, sobre o número de pacientes incluídos na casuística do projeto, que apresentavam material tumoral criopreservado. Dos 44 pacientes selecionados pelos critérios de inclusão descritos anteriormente, apenas 12 pacientes apresentam material criopreservado, que foi submetidos ao ensaio de proteínas, para validação dos achados.

O kit utilizado para essa etapa foi o nCounter® Vantage 3D: RNA: Protein Solid Tumor Assay for Lysates. Esse ensaio, a partir da tecnologia de nanoString, permite realizar a análise da expressão de 28 fosfoproteínas por meio de anticorpos específicos, concomitantemente com probes de RNA, conforme descrito na Tabela 5. No presente trabalho foram incluídos alvos de RNA específicos de carcinoma adenoide cístico de destaque na literatura recente, tais como os transcritos de fusão *MYB*, *MYBL1* e *NFIB*, genes do sistema imune, marcadores de células epiteliais e mioepiteliais, dentre outros (Tabela 6).

Tabela 5. Painel descritivo das 28 proteínas alvos avaliadas

Alvos (proteína)	Nome oficial	Anticorpo	Identificação da proteína
4E-BP1	EIF4EBP1	Total	Q13541
EGF Receptor	EGFR	Total	P00533
GSK-3	GSK3B	Total	P49841
HER2/ErbB2	ERBB2	Total	P04626
Ki-67	MKI67	Total	P46013
Met	MET	Total	P08581
p44/42 MAPK (Erk1/2)	MAPK1 / MAPK3	Total	P27361
p53	TP53	Total	P04637
Pan-Keratin	KRT4/KRT5/KRT6/KRT8/KRT10/KRT13/KRT18	Total	P13645
Pan-Akt	AKT1 / AKT2 / AKT3	Total	P31749
Phospho-4E-BP1	EIF4EBP1	Thr37/46	Q13541
Phospho-Akt	AKT1 / AKT2 / AKT3	Ser473	P31749
Phospho-AMPK	PRKAA1 / PRKAA2	Thr172	Q13131
Phospho-Chk1	CHEK1	Ser345	O14757
Phospho-c-Raf	RAF1	Ser259	P04049
Phospho-EGF Receptor	EGFR	Tyr1068	P00533
Phospho-GSK-3	GSK3A / GSK3B	Ser9	P49841
Phospho-Histone H3	HIST1H3A	Ser10	P68431
Phospho-MEK1/2	MAP2K1 / MAP2K2	Ser217/221	Q02750
Phospho-p44/42 MAPK (Erk1/2)	MAPK1 / MAPK3	Thr202/Tyr204	P27361
Phospho-p70 S6 Kinase	S6K1	Thr389	P23443
Phospho-PDK1	PDPK1	Ser241	O15530
Phospho-PRAS40	AKT1S1	Thr246	Q96B36
Phospho-S6 Ribosomal Protein	RPS6	Ser235/236	P62753
Phospho-Tuberin/TSC2	TSC2	Thr1462	P49815
Progesterone Receptor	PGR	Total	P06401
S6 Ribosomal Protein	RPS6	Total	P62753
Tuberin/TSC2	TSC2	Total	P49815

Tabela 6. Painel descritivo dos 32 mRNAs que serão avaliados concomitantemente com as proteínas

Alvos (mRNAs)	Identificação	Posição da <i>probe</i>
CXCR7 (ACKR3)	NM_020311.1	376-475
ACTB	NM_001101.2	1011-1110
ACVRL1	NM_000020.1	1711-1810
AQP5	NM_001651.3	546-645
BID	NM_197966.1	2096-2195
PDL1 (CD274)	NM_014143.3	50-149
CDKN1B	NM_004064.3	803-902
CTLA4	NM_005214.3	406-505
CXCR4	NM_003467.2	1336-1435
DLX6	NM_005222.3	479-578
DUSP6	NM_001946.2	1536-1635
EN1	NM_001426.3	2361-2460
FOXO3	NM_001455.2	1861-1960
HOXC5	NM_018953.2	571-670
HPRT1	NM_000194.1	241-340
KRT16	NM_005557.3	1391-1490
LAT	NM_001014987.1	1291-1390
MAGEA1	NM_004988.4	477-576
MYB	NM_001130173.1	184-283
MYBL1	NM_001080416.3	1031-1130
NCAM1	NM_000615.5	1621-1720
NFIB	NM_005596.2	3831-3930
NOTCH1	NM_017617.3	8212-8311
NRP1	NM_003873.5	371-470
NTRK3	NM_001012338.2	1591-1690
PD2	NM_019088.2	576-675
PD1 (PDCD1)	NM_005018.2	311-410
SOX10	NM_006941.3	2160-2259
SOX11	NM_003108.3	5651-5750
SOX4	NM_003107.2	3041-3140
STATH	NM_001009181.1	221-320
TARP	NM_001003799.1	561-660

7 RESULTADOS

No presente trabalho, foram selecionados 20 pacientes que passaram nos critérios de inclusão previamente definidos. Destes, 1 paciente não passou nos critérios de qualidade do NanoString, mesmo após a repetição do ensaio. O sinal apresentou-se muito baixo, impossibilitando a realização de análises posteriores. Restaram, assim, 19 pacientes, cujos principais dados clínicos encontram-se representados na Tabela 7.

Tabela 7. Dados clinico-patológicos dos pacientes avaliados

Paciente	Sexo	Sítio Topográfico	Local do tumor	Tipo histológico	Invasão perineural	Estadio clínico	Tratamento Cirurgia	Radioterapia	QT	Recidiva
P01	F	Seios da face	Gl. salivares menores	Sólido	sim	IVA	sim	sim	não	não
P02	F	Assoalho da boca	Gl. salivares maiores	Cribriforme	sim	IVA	sim	sim	não	não
P03	F	Gl. submandibular	Gl. salivares maiores	Tubular	sim	II	sim	sim	não	não
P04	M	Seios da face	Gl. salivares menores	Tubular	sim	IVA	sim	sim	não	não
P05	F	Assoalho da boca	Gl. salivares maiores	Tubular	sim	II	sim	sim	não	não
P06	F	Orofaringe	Gl. salivares menores	Cribriforme	não	II	sim	sim	não	não
P07	M	Orofaringe	Gl. salivares menores	Sólido	sim	II	sim	sim	não	não
P08	F	Seios da face	Gl. salivares menores	Sólido	não	III	sim	sim	não	sim
P09	F	Parótida	Gl. salivares maiores	Cribriforme	não	IVA	sim	sim	não	não
P10	M	Assoalho da boca	Gl. salivares maiores	Tubular	sim	IVA	sim	sim	não	sim
P11	F	Parótida	Gl. salivares maiores	Tubular	sim	I	sim	sim	não	não
P12	M	Parótida	Gl. salivares maiores	Tubular	não	III	sim	sim	não	não
P13	F	Parótida	Gl. salivares maiores	Cribriforme	não	IVA	sim	sim	não	sim
P14	F	Parótida	Gl. salivares maiores	Cribriforme	sim	Ignorado	sim	sim	não	sim
P15	M	Parótida	Gl. salivares maiores	Cribriforme	não	II	sim	sim	não	não
P16	F	Base da Língua	Gl. salivares maiores	Ignorado	sim	IV	sim	sim	não	sim
P17	F	Seios da face	Gl. salivares menores	Sólido	não	Ignorado	sim	sim	não	não
P18	F	Gl. submandibular	Gl. salivares maiores	Cribriforme	sim	IV	sim	sim	não	sim
P19	M	Seios da face	Gl. salivares menores	Sólido	não	IV	sim	sim	sim	sim

Uma característica clínica em que têm sido relatadas diferenças entre os pacientes de CAC é sexo. A Figura 5 mostra os mRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes do sexo masculino e feminino.

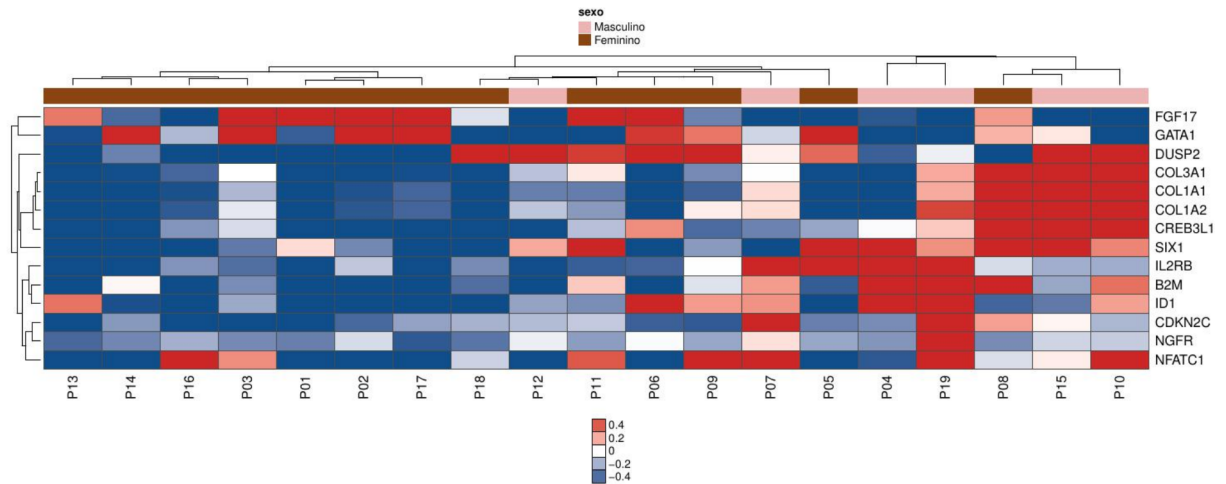


Figura 5. *Heatmap* dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes do sexo masculino e feminino com nível de significância de $p \leq 0.05$ e *Fold-change* ≥ 2.0 .

De forma similar, foram identificados 13 microRNAs diferencialmente expressos entre o sexo masculino e feminino, conforme mostrado no heatmap da Figura 6.

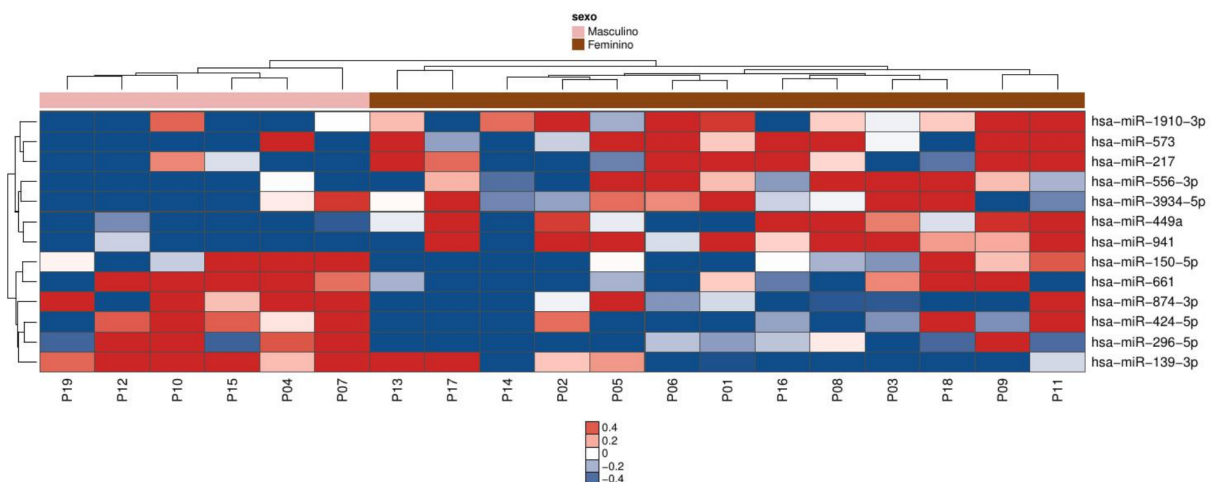


Figura 6. *Heatmap* dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes do sexo masculino e feminino com nível de significância de $p \leq 0.05$ e *Fold-change* ≥ 2.0 .

As possíveis interações entre os mRNAs e seus alvos, ou seja, as que apresentaram

maior score em pelo menos três bancos de predição, encontram-se esquematizadas na Figura 7, com destaque para os genes *COL1A3* e *COL1A1* que compartilham possíveis microRNAs de interesse.

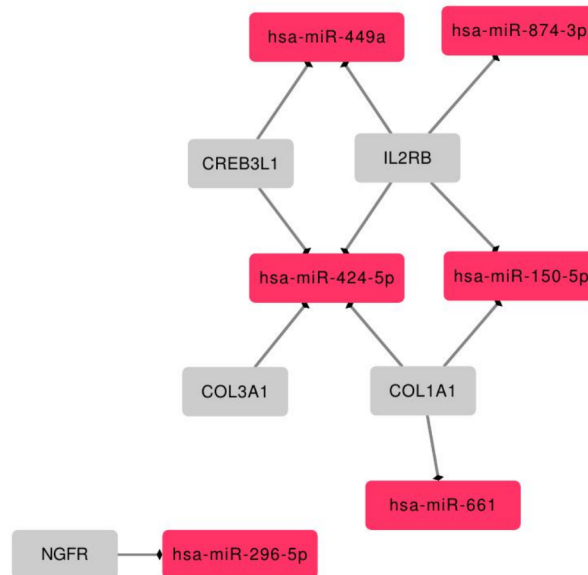


Figura 7. Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes do sexo masculino e feminino.

Outra característica clínica de relevância para o CAC é a topografia, representada por glândulas salivares menores e maiores. A Figura 8 mostra os mRNAs diferencialmente expressos entre os respectivos tipos de glândulas abordadas neste estudo.

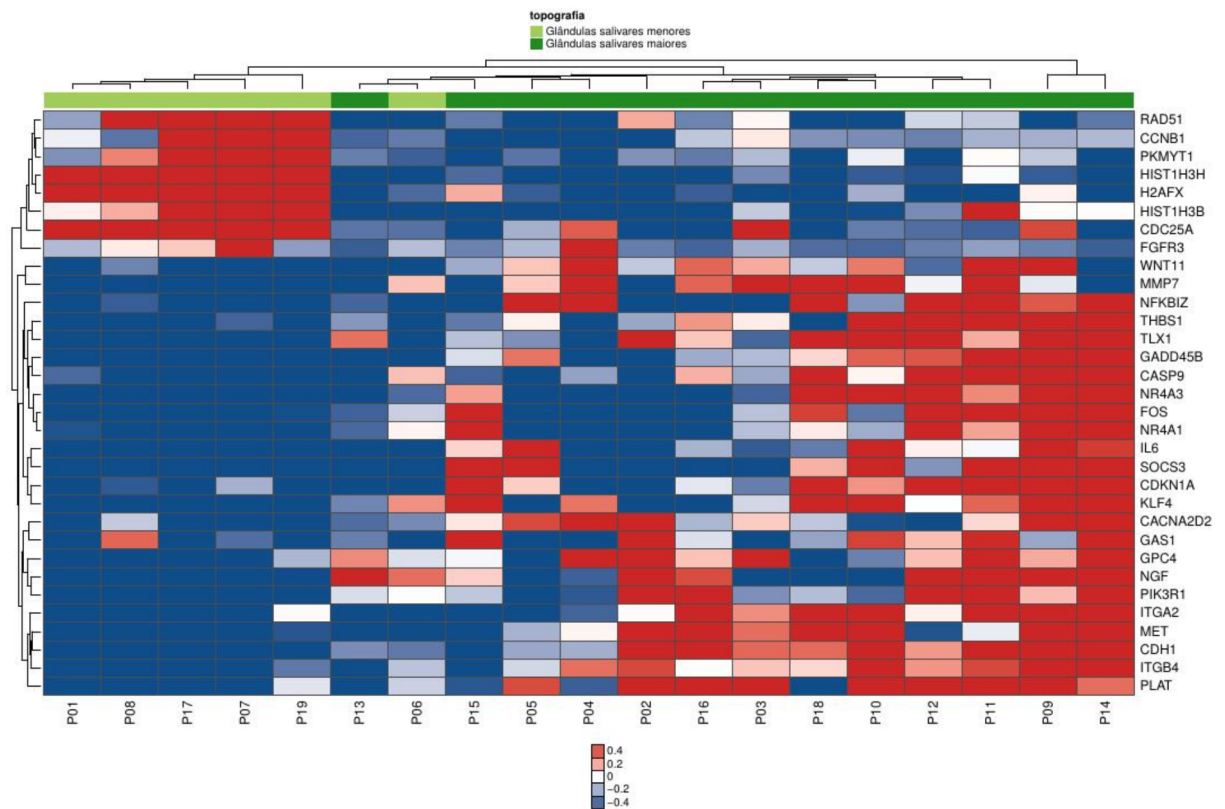


Figura 8. *Heatmap* dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com acometimento de glândulas salivares maiores e menores com nível de significância de $p \leq 0.05$ e *Fold-change* ≥ 2.0 .

A Figura 9 aborda os microRNAs diferencialmente expressos entre as glândulas salivares maiores e menores.

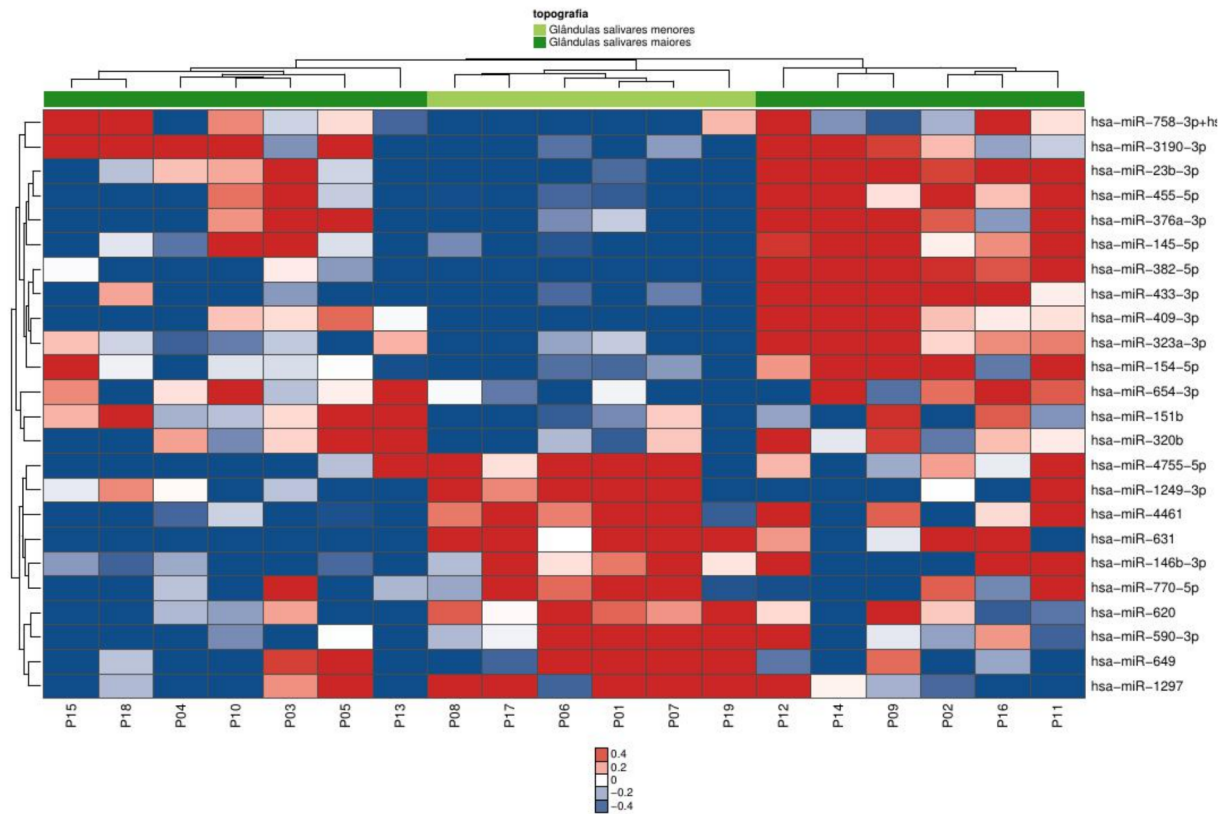


Figura 9. *Heatmap* dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com acometimento de glândulas salivares maiores e menores com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$.

Um grande número de interações pôde ser observada entre os mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre as glândulas salivares maiores e menores. O formato da rede, conhecido como orgânico coloca no centro os nós com maior número de interações. Destacam-se nessa rede os mRNAs *MET* e *NR4A3* e os microRNAs hsa-miR-23b-3p e hsa-miR-590-3p com muitas interações (Figura 10).

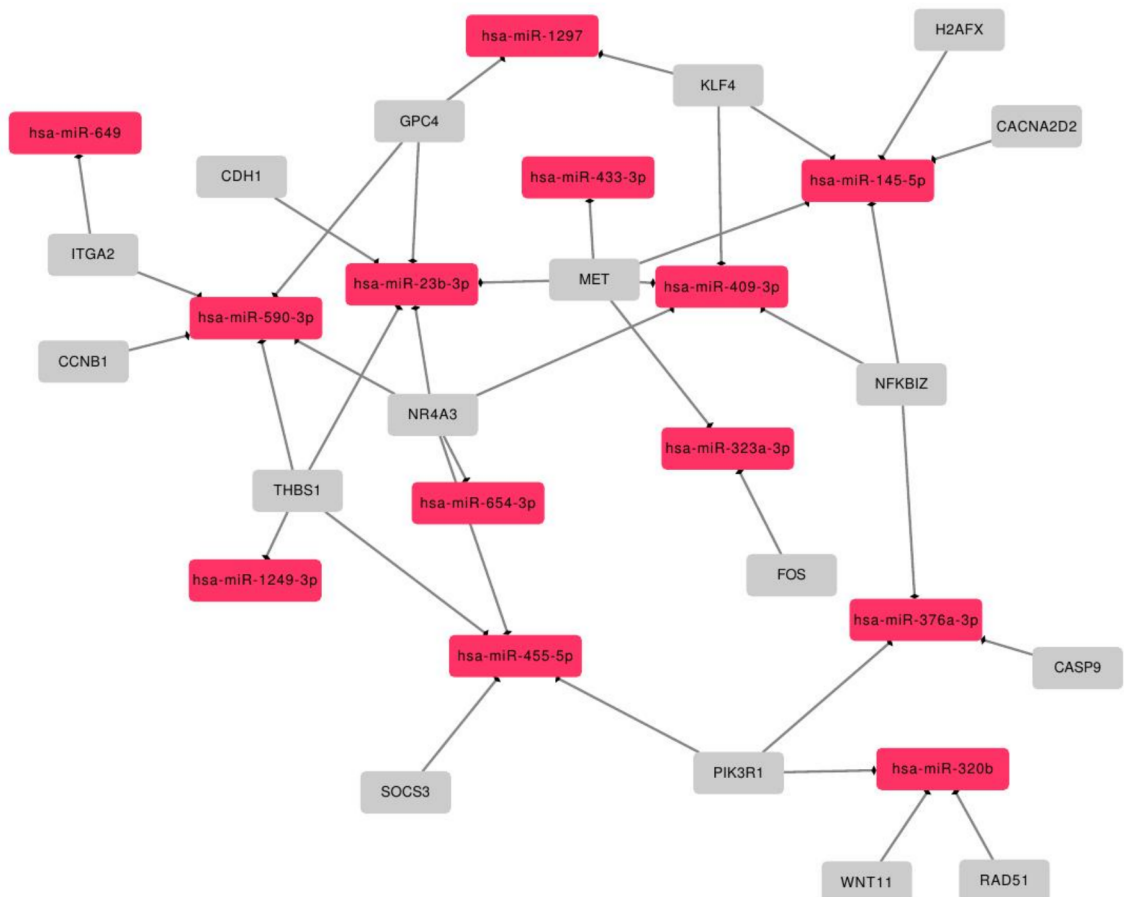


Figura 10. Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com acometimento de glândulas salivares maiores e menores.

Conforme relatado previamente, o padrão de crescimento dos tumores CACs são distintos, sendo o tipo sólido o descrito como mais agressivo. Dessa forma, foram realizadas comparações do padrão de crescimento, utilizando o padrão sólido como referência, conforme exemplificados nos heatmaps das Figuras 11 (mRNAs).

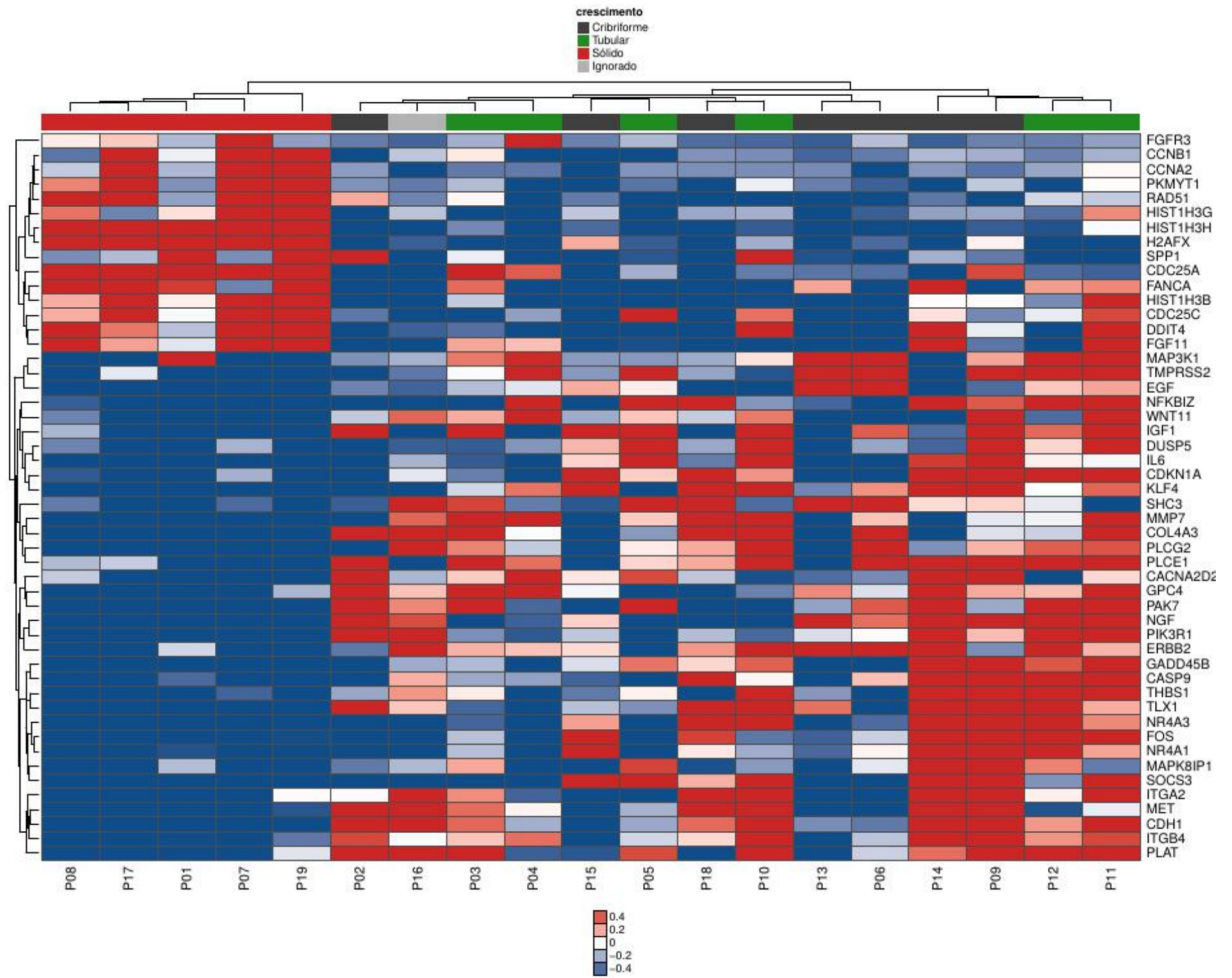


Figura 11. *Heatmap* dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com tumores de padrão sólido (mais agressivo) comparado com os demais (tubular e cribriforme) com nível de significância de $p \leq 0.05$ e *Fold-change* ≥ 2.0 .

De forma similar, foi avaliado o perfil de expressão diferencial dos miRNAs dos subtipos histológicos dos pacientes com CAC avaliados (Figura 12).

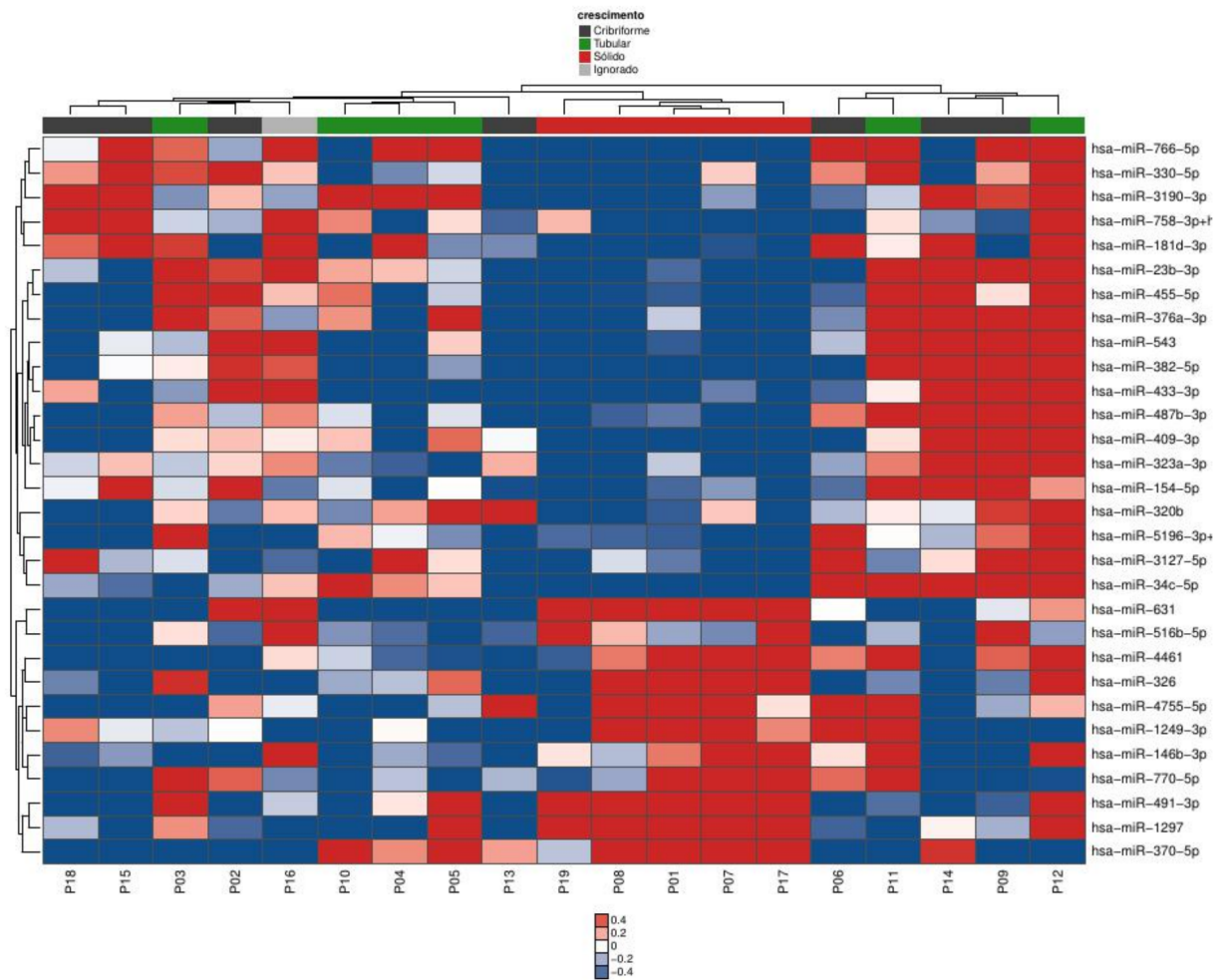


Figura 12. *Heatmap* dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes com tumores de padrão sólido (mais agressivo) comparado com os demais (tubular e cribriforme) com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$.

A rede de interações entre os mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos em tumores de padrão de crescimento sólido apresentaram-se extremamente conectadas, inclusive com nós similares aos observados na topografia, tais como *MET* e *NR4A3* e o microRNA hsa-miR-23b-3p (Figura 13).

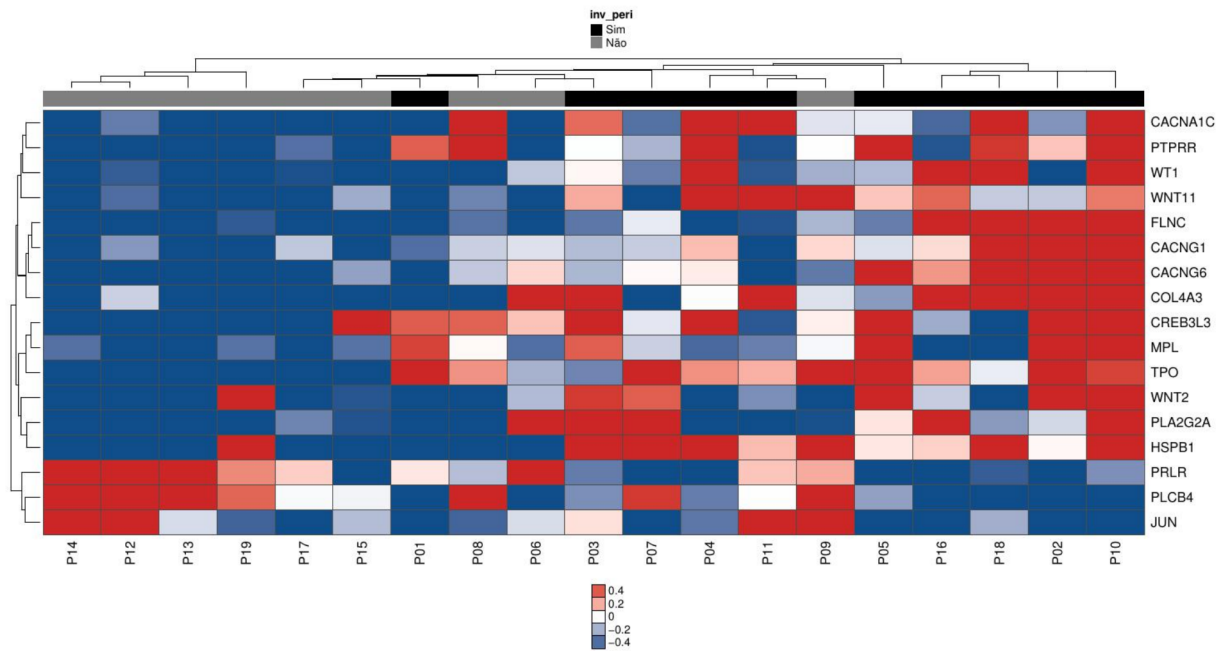


Figura 14. *Heatmap* dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão perineural em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e *Fold-change* ≥ 2.0 .

Foram identificados 17 mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que possuem invasão perineural, em relação aos que não apresentam (Figura 15).

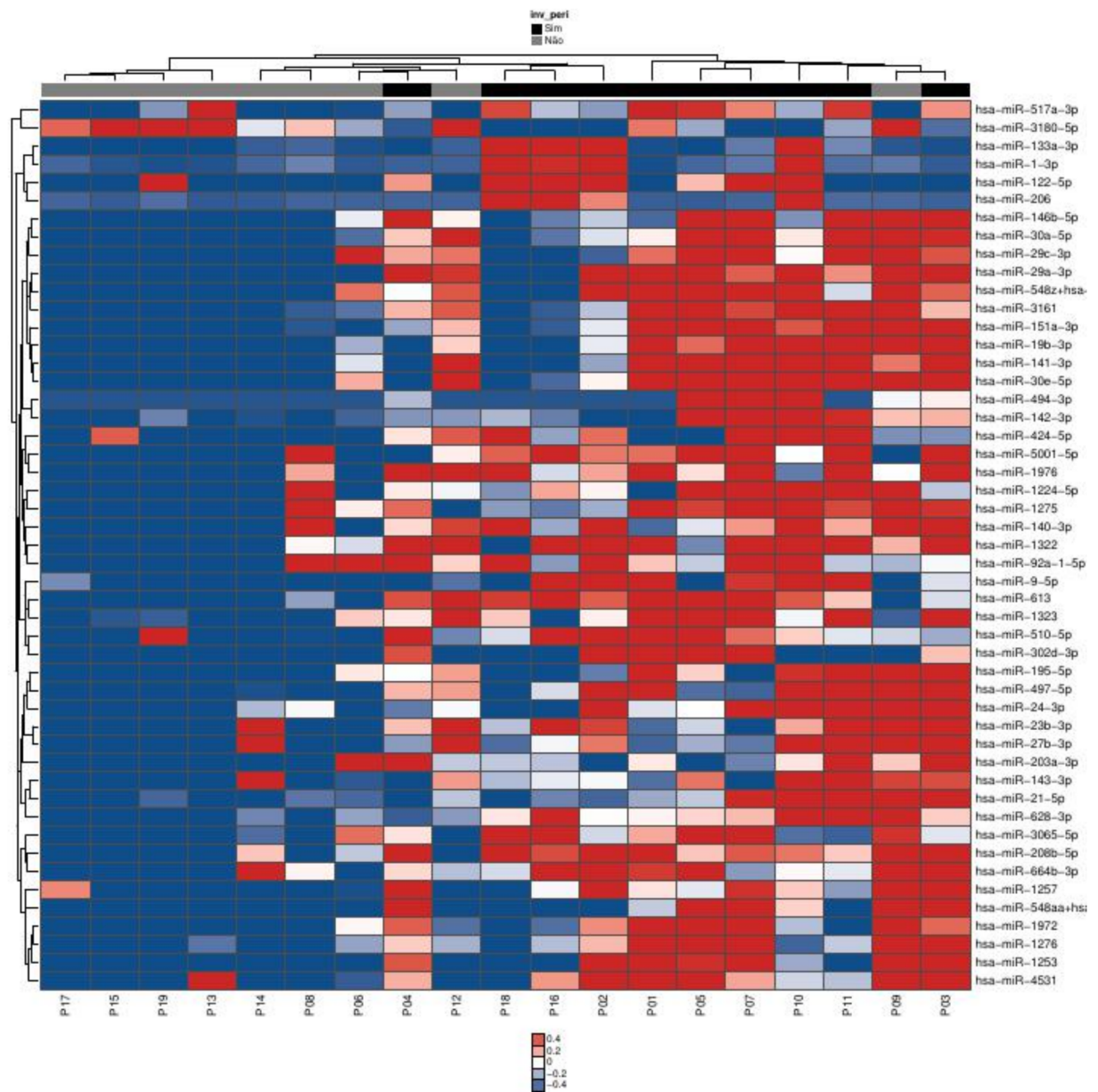


Figura 15. *Heatmap* dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão perineural em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e *Fold-change* ≥ 2.0 .

A rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos relativos à invasão perineural encontra-se representada na Figura 16. Destacam-se os genes *COL4A3*, *CACNA1C* e *PRLR* com o maior número de alvos.



Figura 16. Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão perineural em relação aos que não possuem.

Finalmente, a Figura 17 mostra os mRNAs significativos em relação à invasão angiolímfática.

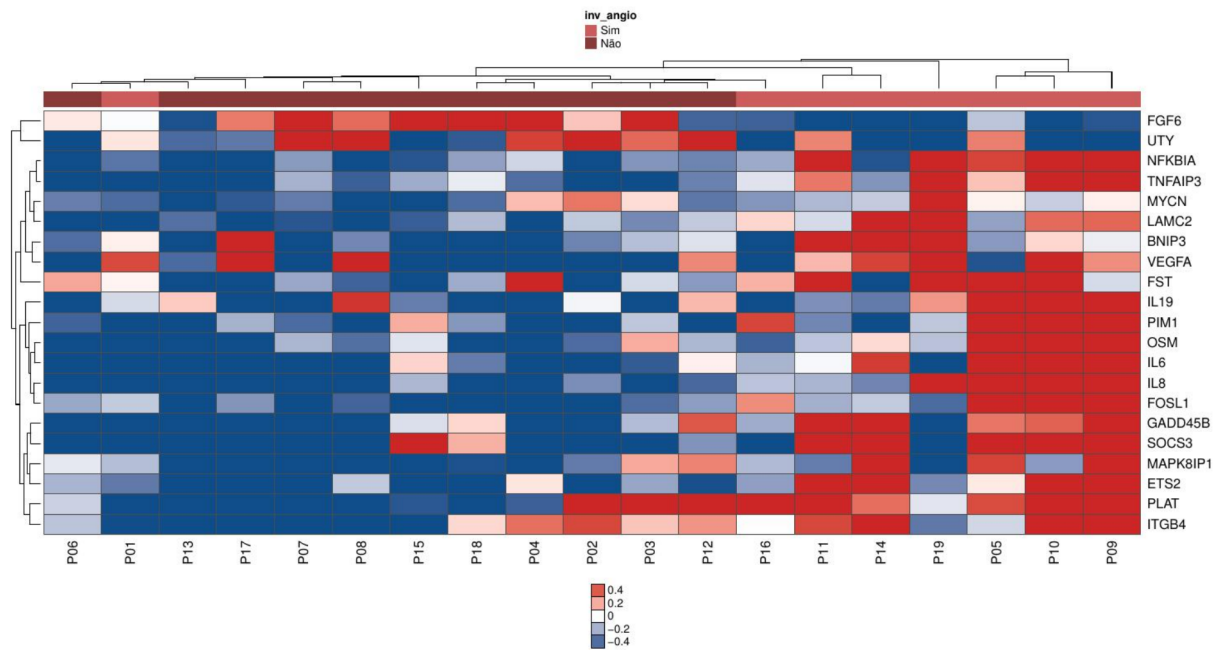


Figura 17. *Heatmap* dos mRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão angiolímfática em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$.

A Figura 18 representa os miRNAs significativos identificados nos pacientes que apresentaram invasão angiolímfática em relação aos que não apresentaram.

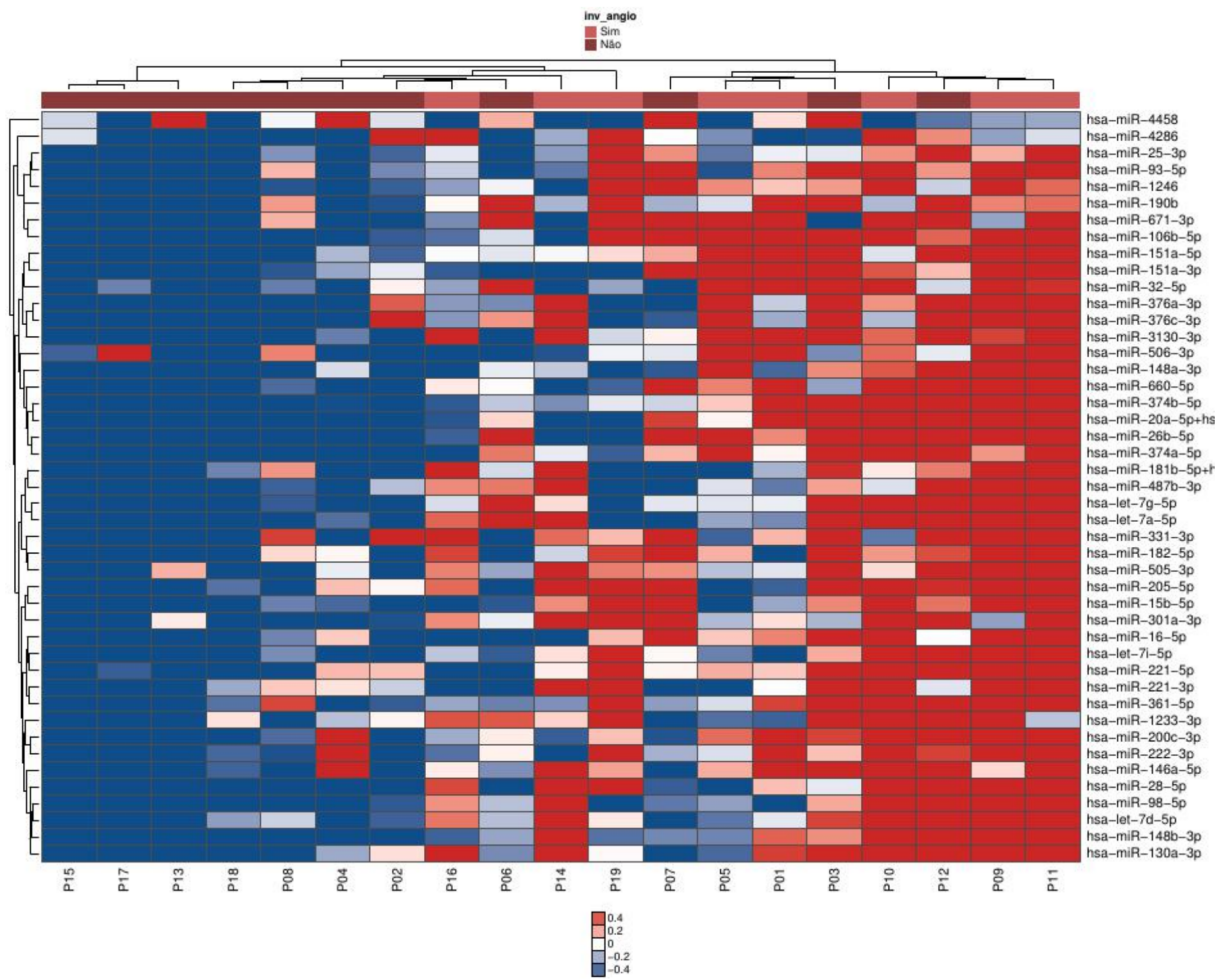


Figura 18. *Heatmap* dos microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão angiolinfática em relação aos que não possuem, com nível de significância de $p \leq 0.05$ e $Fold-change \geq 2.0$.

A rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos relativos à invasão angiolinfática encontra-se representada na Figura 19. Destacam-se os genes *ETS2*, *MYCN*, *VEGFA* e *TNFAIP3* com o maior número de alvos. Os microRNAs hsa-miR-200c-3p, hsa-miR-2015-5p e hsa-miR-106b-5p também apresentaram um grande número de interações.



Figura 19. Rede de interações entre mRNAs e microRNAs diferencialmente expressos entre pacientes que apresentam invasão angiolinfática em relação aos que não possuem.

Finalmente, foram avaliados os biomarcadores de acordo com a análise da curva ROC. Somente os dados acerca do sexo apresentaram biomarcadores de mRNA com AUC ≥ 0.9 . São estes os genes *KDM6A*, *FGF17*, *RPS6KA6*, e *KDM5C*.

7.1 Atualização de status de seguimento dos pacientes

As informações de status de seguimento dos pacientes foram avaliadas retrospectivamente em prontuários no ano de 2018. Os pacientes foram categorizados em óbito por câncer, óbito por outras causas, vivo com doença ou vivo sem doença, a partir da última data de registro em prontuário. Foi considerada a perda de seguimento os casos que apresentaram ausência duas vezes o tempo do retorno sem informação.

Durante análise estatística, evidenciou-se um tempo médio de seguimento de 82 meses, com uma frequência de 34% de perda de seguimento dos pacientes. A partir desta constatação, os pacientes foram listados e encaminhados para o departamento de Registro Hospitalar do Hospital de Câncer de Barretos, a fim de atualizar seu status atual.

De forma geral, a sobrevida global dos pacientes foi de aproximadamente 215 meses. Portanto, uma probabilidade de 77.6% de sobreviver por mais de 5 anos (60 meses), após o diagnóstico da doença. Em 10 anos de seguimento, a probabilidade de estar vivo é de 70.7%. Constatando a alta morbimortalidade em pacientes após o diagnóstico de carcinoma adenoide cístico, conforme mostrado na Figura 20.

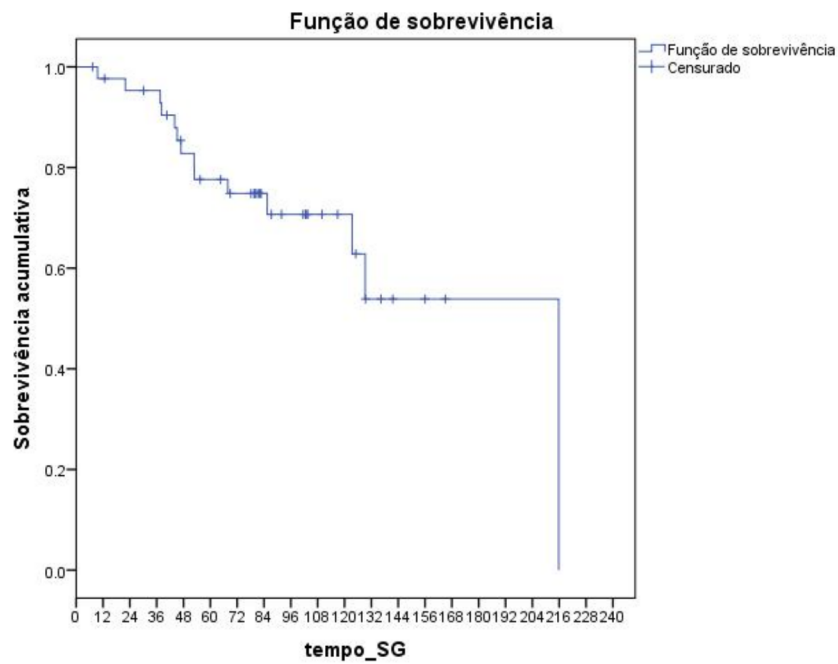


Figura 20. Sobrevida global da casuística completa dos pacientes com carcinoma adenoide cístico.

Considerando as comparações entre os grupos analisados dos mRNAs, foi observado um p valor de 0.298 quando se compara sobrevida global de pacientes que apresentam tumores em glândulas salivares maiores comparados ao grupo que possuem tumores em glândulas salivares menores (Figura 21).

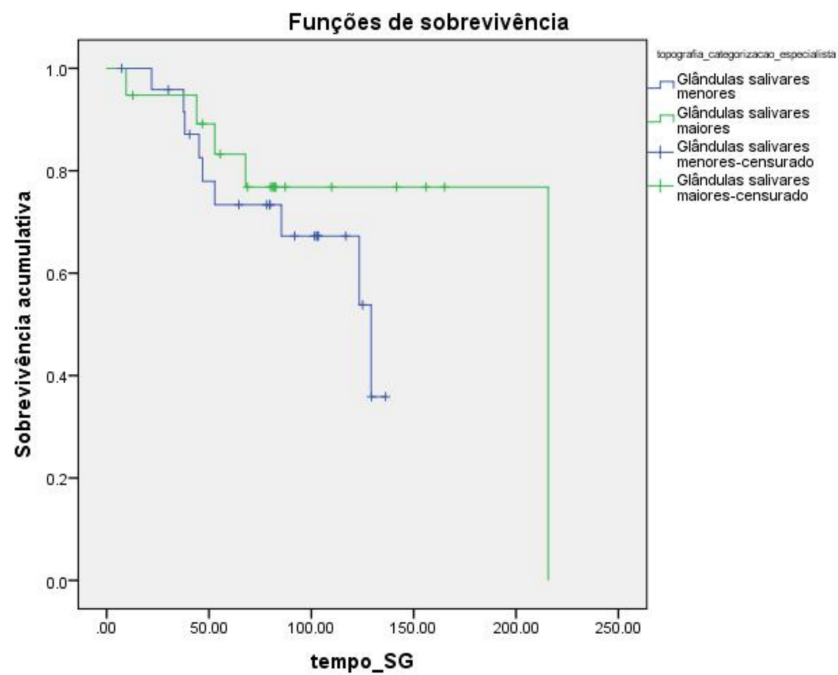


Figura 21. Sobrevida global de pacientes que apresentam tumores em glândulas salivares maiores comparado ao grupo que possuem tumores em glândulas salivares menores.

Ao avaliar a sobrevida global a partir do agrupamento de padrão de crescimento cribriforme juntamente com o tubular que tendem apresentar doença menos agressiva, comparado ao padrão de crescimento sólido sendo a variante mais agressiva, mostrando uma sobrevida mediana de 67 meses em pacientes com doença que apresenta padrão de crescimento sólido e sobrevida mediana de 215 meses em padrão de crescimento cribriforme/tubular, obteve-se p valor de 0.011, conforme figura 22.

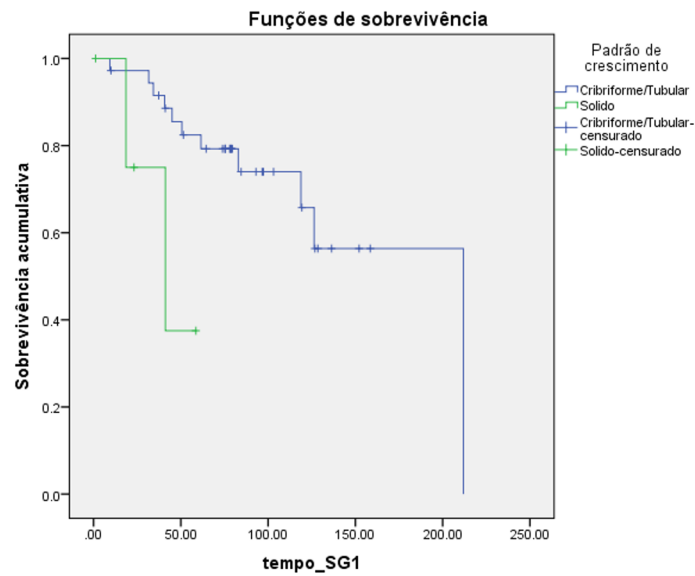


Figura 22. Sobrevida global de pacientes que apresentam tumores com padrão de crescimento sólido comparado ao grupo que possui padrão de crescimento cribriforme/tubular.

Eventos clínicos que apresentam grau de importância, e estão diretamente relacionados com a dor constante que o paciente apresenta a partir da invasão perineural, apresentou um valor de $p = 0.378$, assim como a presença de invasão angiolinfática (Figuras 23 e 24).

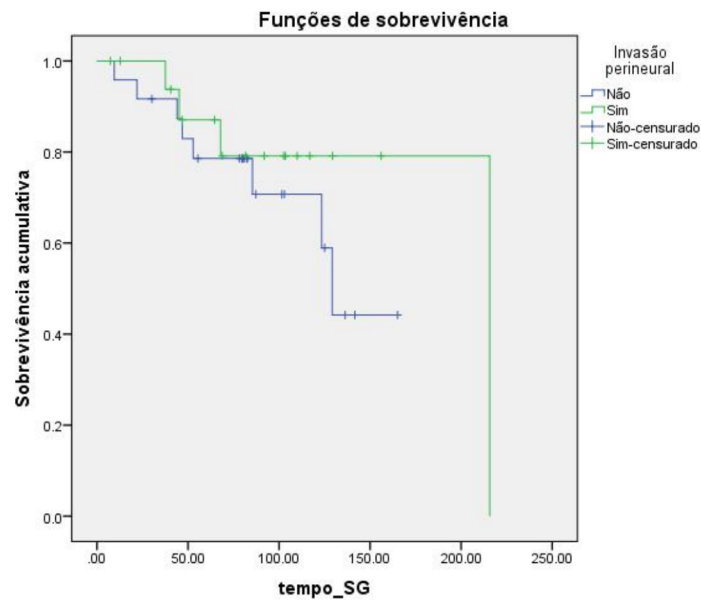


Figura 23. Sobrevida global de pacientes que apresentam invasão perineural comparado com os que não apresentam.

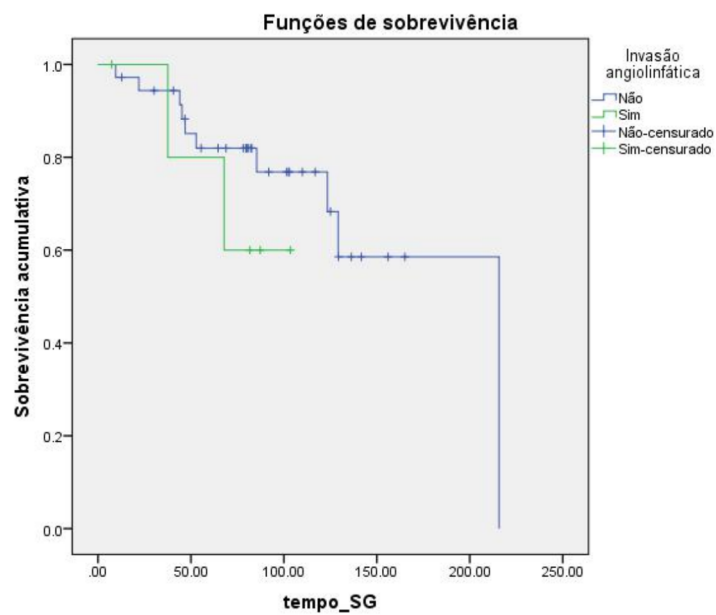


Figura 24. Sobrevida global de pacientes que apresentam invasão angiolinfática comparado com os que não apresentam.

7.2 Painel customizado mRNA-proteína

Foram avaliadas 32 mRNAs (5 housekeepings) restando 27 mRNAs associados a fusões gênicas (*MYB*, *NFIB* e *MYBL*) sistema imune e a subtipos celulares vinculados ao CAC. Também foram identificadas 28 proteínas fosforiladas. Os resultados são avaliados individualmente de acordo com a expressão dos mesmos, conforme identificado na Figura 25.



Figura 25. Heatmap dos dados normalizados de todos os mRNAs e proteínas que compõem o painel customizado

8 DISCUSSÃO

O carcinoma adenóide cístico (CACs) de glândulas salivares trata-se de uma neoplasia maligna rara e de crescimento lento. No entanto, é o segundo carcinoma mais frequente em glândulas salivares, com alta capacidade de invasão, com tendência a invasão perineural, metástase a distância e alto nível de morbimortalidade. Tais tumores também apresentam uma característica de diferenciação mioepitelial e epitelial que parece ser específica⁴³. Em decorrência da baixa frequência de casos, acaba por ser uma doença pouco estudada, principalmente em relação aos mecanismos moleculares envolvidos. No entanto, considerando-se o desfecho desfavorável desta neoplasia, a necessidade de melhor compreensão de tais processos faz-se necessária. O presente estudo teve como objetivo avaliar uma série de 19 pacientes com CACs, selecionados a partir de 119 pacientes que correspondem a todos os casos da doença até 2012 do Hospital de Câncer de Barretos. Por se tratar de uma doença heterogênea e com vários sítos anatômicos, o número de casos em glândulas salivares foi ainda menor. O foco do trabalho foi a avaliação do perfil de expressão de mRNAs das principais vias da carcinogênese, análise de microRNAs e proteínas, permitindo uma melhor compreensão do carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares.

8.1 Visão Geral do Papel das Translocações Gênicas avaliadas em Carcinoma Adenóide Cístico

Devido a alta frequência dos eventos estruturais de translocação gênica em CACs, principalmente as que acarretam na fusão *MYB/NFIB* que correspondem a aproximadamente 79% dos casos, o mesmo é considerado como marcador da doença em questão e deve ser considerado. Sabe-se que as alterações estruturais podem afetar a expressão de

outros genes, além de influenciar diferentes mecanismos no ambiente celular. Cada vez mais tem se identificado mecanismos mutuamente exclusivos, que permitem a avaliação de subgrupos moleculares que podem ser submetidos diferentes estratégias terapêuticas. Além da translocação clássica desse tipo tumoral, o gene *NFIB* também foi identificado como translocado com outros genes, tais como o *MYBL1*. Estudos mostram que ambos tipos de fusões apresentam a mesma assinatura de expressão, possivelmente atuando por meio de mecanismos moleculares similares. Os painéis comerciais disponíveis para avaliação de câncer como um todo (painéis pan-câncer), tal como o painel utilizado para avaliação de vias carcinogênicas no presente trabalho, não apresentam sondas para essas alterações específicas. Dessa forma, foram avaliados separadamente os transcritos *MYB*, *NFIB* e *MYBL1* em um painel customizado adicional.

O gene *MYB* é considerado oncogênico. Seu papel está relacionado com codificação um fator de transcrição que atua em diversos processos, incluindo a regulação de células tronco. Em contrapartida, o gene *NFIB* também codifica um fator de transcrição associado ao controle do ciclo celular, um *hallmark* chave do câncer. A fusão desses dois genes gera um transcrito com um domínio de ligação ao DNA e um domínio de transativação que parece ser responsável pela perda de sequência de elementos de regulação negativa que confere uma expressão aumentada do mesmo. Assim, tanto a fusão *MYB/NFIB* quanto *MYBL1/NFIB* modulam uma ampla gama de genes *downstream*, uma vez que correspondem a fatores de transcrição aumentados nas células. Os genes alvos estão associados a processos de controle de ciclo celular, apoptose, angiogênese e adesão celular.

Nesse cenário, dos 19 pacientes, somente 12 puderam ser avaliados quanto a translocação *MYB/NFIB* e *MYBL1/NFIB* pelo painel customizado, devido a disponibilidade limitada de tecido congelado com porcentagem tumoral suficiente para análise. Destes, 7

pacientes (58% dos casos) tiveram expressão aumentada de *MYB*, sendo 4 concomitantemente com *NFIB* e com número similar de contagens, sugerindo a possível co-expressão entre ambos, indicando a possível presença de tais eventos estruturais das amostras avaliadas. Estudos apontam também que tanto o gene *MYB* quanto *NFIB* podem apresentar translocações com outros genes. E dentre essas, a translocação de *NFIB* com *MYBL1* é de destaque devido a similaridade no perfil de expressão. Além disso, o gene *NFIB* apresentou expressão aumentada em 2 pacientes que também apresentaram contagens similares de *MYBL1*. Tal fato sugere a possibilidade de outras translocações nesse contexto. Assim, ao somar os 2 pacientes que apresentam expressão de *MYBL1/NFIB*, a frequência de translocação nesse subconjunto de amostras poderia atingir até 75% dos casos. É importante ressaltar as limitações dessas avaliações. As sondas avaliadas foram construídas de forma a serem compatíveis com o ensaio de proteínas, já que ambos são executados simultaneamente. Dessa forma, as sondas representam uma porção do gene e não os pontos de quebra. Por outro lado, uma avaliação por outras técnicas, tais como FISH além de apresentarem maiores custos possuem limitações por não avaliarem situações em que os genes parceiros são desconhecidos. Como é o caso dos 3 pacientes de *MYB* que não apresentam expressão de *NFIB*.

Considerando o papel das translocações gênicas em CACs, apesar de uma alteração com papel no desenvolvimento tumoral (tida como *driver*) apresentar uma frequência muito alta entre os pacientes, sabe-se que um único evento não corresponde à total complexidade dos mecanismos moleculares de um câncer. Estudos recentes abordam o conceito da temporalidade das alterações genéticas nos tumores, ou seja, pela frequência da variante é possível prever se esta ocorreu no início da carcinogênese ou foi adquirida em processos subsequentes. Tais processos que ocorrem a *posteriori* poderiam levar a um

aumento da agressividade da doença e variações na resposta à terapia, o que parece estar particularmente envolvidos em doenças como os CACs que apresentam um crescimento lento. Sabe-se que a doença pode levar até 15 anos para desenvolver um processo de metástase, o que sugere que um perfil agressivo da doença pode estar relacionado a outras alterações adquiridas ao longo do tempo. Além disso um tumor corresponde a um conjunto de células em diferentes níveis hierárquicos, o que também pode acarretar na presença de clones distintos com outros tipos de alterações genéticas. Tal complexidade tem sido avaliada recentemente por meio de estudos de análise de exoma por métodos de sequenciamento.

8.2 Estudos do Exoma

Estudos recentes por meio de análise de sequenciamento de nova geração (NGS) tanto do exoma (WES) quanto de genoma completo (WGS) de CACs mostraram se tratar de um tumor com baixa taxa de mutações somáticas. Stephens et al., reportou uma média de apenas 13 mutações por exoma de CAC, um número muito abaixo do identificado para a maioria dos carcinomas. A frequência de alterações em genes individuais também é baixa, com pouca similaridade entre os pacientes. Essa estabilidade rara no genoma tem sido atribuída ao fato de que a ativação de *MYB* ser um evento inicial como um evento *driver* primário da carcinogênese dos CACs e as alterações subsequentes por alguma razão tem sido selecionadas evolutivamente em um contexto em que a instabilidade genômica não ocorreu.

No entanto, apesar dessa falta de padrão entre os genes, as mutações parecem ocorrer nas mesmas vias. Dentre essas, observa-se a via de remodelamento de cromatina

(*CREBBP*, *EP300*, *MLL2/3*, *SMARCA2/C1* e *KDM6A*), via de *checkpoint* e dano de DNA (*TP53*, *ATM* e *UHRF1*), sinalização FGF-IGF-PI3K (*PIK3CA*, *FGFR2*, *INSRR*, *HRAS*) e a via NOTCH (*NOTCH1/2*, *SPEN*, *CTNNB1*, *FOXP2*).

É importante notar que as alterações na regulação da cromatina podem afetar até 50% dos casos. Acredita-se que o remodelamento da cromatina e a ativação de determinados complexos transcricionais são requeridos em situações de grandes alterações genômicas estruturais.

A via Notch também foi um dos pontos principais em diversos estudos de análise de exoma. O gene *SPEN*, um dos efetores *downstream* da via codifica uma proteína de ligação ao RNA que atua como um co-regulador de proteínas regulatórias. Acredita-se que ele pode reprimir genes mesmo na ausência de ativação da via Notch, sugerindo mecanismos alternativos. Esse gene também pode estar relacionado com a via FGF, o que sugere uma relação entre diversos mecanismos identificados em CACs.

Considerando os custos para o sequenciamento em relação ao baixo número de alterações, a avaliação indireta por análise de expressão, como a realizada no presente estudo torna-se uma alternativa com grande potencial de aplicação clínica. Além disso, estudos recentes têm discutido o papel da reprogramação transcricional e epigenética dessa doença.

8.3 Mecanismos Moleculares de Expressão Gênica e sua Aplicação Clínica

A análise de expressão gênica realizada abordou diferentes aspectos, tais como sexo, topografia, padrão de crescimento (tipo histológico), invasão perineural e invasão angiolinfática. Um foco maior foi dado nas análises do padrão de crescimento (especi-

almente no subtipo sólido, o mais agressivo) e na invasão perineural em decorrência da avaliação da agressividade. As demais análises foram avaliadas de forma comparativa. É importante observar que parte dos achados em glândulas salivares menores são similares aos identificados em CACs sólidos, uma vez que são basicamente os mesmos pacientes.

O painel PanCancer utilizado aqui aborda 13 vias principais. Para uma avaliação geral, faz-se necessário considerar a representatividade da via não somente em termos do número de genes induzidos ou reprimidos, mas também a proporção em relação ao tamanho da via e a presença de genes diferencialmente expressos com fold-change de relevância. Dessa forma, para a comparação do subtipo histológico sólido em relação aos demais (tubular e cribiforme), foram identificadas como induzidas as vias de reparo de DNA e ciclo celular/apoptose. E como reprimidas de forma representativa as vias MAPK e RAS.

No subtipo histológico sólido, três principais genes da via de reparo de DNA encontraram-se induzidos. Foram eles: *RAD51*, *FANCA* e *H2AFX*. Nesse contexto, um estudo mostra que o gene *MYB* pode ser ativado por ganho do número de cópias de DNA ou justaposição de elementos enhancers a partir de *NFIB*, *RAD51B* e *TGFBR3*⁵⁰. Nesse caso, ocorre uma expressão aumentada de *MYB* como um todo ao invés da expressão de uma proteína MYB truncada quando na presença de eventos de fusão gênica, com potencial envolvimento do gene *RAD51*⁵⁰. Além disso, um estudo de análise de exoma identificou alterações em domínios de helicases⁵¹. Sabe-se que essas alterações podem afetar os mecanismos de reparo de DNA via alteração de *RAD51*⁵². Essas evidências indicam um potencial papel desse gene em CACs, demandando mais estudos para a avaliação da real importância do mesmo nessa doença. Não existem estudos sobre o papel dos genes *FANCA* e *H2AFX* em CACs, sendo apontados como marcadores de danos de DNA em

outros tipos tumorais⁵³. Finalmente, a via de reparo em CACs já tem sido relatada como alvo terapêutico, uma vez que o gene *ATR* parece ser regulado por *MYB*, cujo inibitor VX-970 encontra-se em fase 2 de teste clínico⁵⁴. Além disso, inibidores de *checkpoint* e o tratamento com PARP são amplamente empregados de alterações em genes de reparo do DNA, tais como o LY2606368/Prexasertib⁵⁵.

A via de ciclo celular/apoptose induzida em CACs sólidos é representada pelos genes *CCNA2*, *CDC25A*, *CDC25C*, *PKMYT1*, *CCNB1*. Dentre esses, os genes *CDC25A* (regulador da fase G0 do ciclo celular) e *CDC25C* (regulador da fase G2/M do ciclo celular) foram descritos como fosforilados pelo *PIM1*, uma quinase oncogênica associada com a progressão em CACs⁵⁶. O gene *PKMYT1* possui poucos relatos tanto em CACs, mas tem sido associado a progressão e pior prognóstico em diversos tipos tumorais⁵⁷. Finalmente, o gene *CCNB1* é conhecido como um dos genes proliferativos que são alvos *downstream* do gene *MYB*⁵⁸. Considerando a alta frequência das alterações da expressão de *MYB* em CACs, terapias alvo-direcionadas para esta alteração conseguiriam abranger a maioria dos pacientes. Dentre os possíveis candidatos, um estudo em câncer de mama positivos para receptor de estrógeno (RE) submetidos a inibição de *MYB* por meio de inibidores de *CDK9* conferiu apoptose e bloqueio do ciclo celular em G2/M⁵⁹. Tal mecanismo ocorre em parte pelos alvos proliferativos de *MYB*, sendo um deles o *CCNB1* e esse tipo de estratégia terapêutica seria de grande aplicação em CACs e a compreensão do papel desses genes do ciclo celular em CACs faz-se necessária⁶⁰.

No subtipo sólido foram identificados diversos genes reprimidos, representativos da via MAPK (*NGF*, *CACNA2D2*, *MAP3K1*, *FOS*, *NR4A1*, *MAPK8IP1*, *DUSP5*, *GADD45B*, *EGF*). Apesar desse resultado parecer contraditório, uma vez que essa via é considerada como um regulador positivo da iniciação tumoral, progressão e manutenção

tumoral, um estudo mostra que a via MAPK encontra-se inibida em um conjunto de CACs de glândulas salivares⁶¹. O mesmo acontece com a via RAS, cujos genes *NGF*, *PLCE1*, *PIK3R1*, *MET*, *SHC3*, *IGF1*, *EGF*, *PAK7*, *PLCG2* encontram-se reprimidos em CACs sólidos. Sabe-se que um antagonista da via RAS, o *WIF1*, é altamente expresso em glândulas salivares normais, e a perda de expressão ou rearranjo do mesmo é observado em tumores de glândulas salivares⁶². É possível que em alguns pacientes, ou um subtipo em particular, esse processo não esteja relacionado com o mecanismo da tumorigênese ou tenha sido inibido por meio de um mecanismo alternativo.

Em contrapartida, diversos genes da via MAPK encontram-se induzidos em pacientes com invasão perineural. Foi a única via apontada como relevante nesse grupo de estudo (com pelo menos 3 genes significativos seguindo o mesmo padrão de modulação). Os genes induzidos identificados foram *HSPB1*, *FLNC*, *CACNG6*, *PTPRR*, *CACNA1C*, *CACNG1*. Dos 5 pacientes do subtipo histológico sólido, 2 apresentaram invasão perineural. Dessa forma, apesar de fazerem parte da mesma via, é natural que nem todos os genes de uma mesma via sejam induzidos. Destes, a superexpressão do gene *HSPB1*, também conhecido como *HSP27*, foi associado com a migração, invasão, transição epitélio-mesenquima em ensaios utilizando células de CACs⁶³.

Finalmente, é importante considerar que a via Notch poderia ser alvo de terapia por meio de inibidores, tais como o BMS-9060024. No entanto, no presente estudo não foi encontrada uma alta representatividade da via como um todo em um subgrupo específico (subtipo histológico sólido ou pacientes com invasão perineural). No entanto, o papel de *NOTCH1* vem sendo pesquisado com a finalidade de esclarecer seu status de oncogene ou supressor tumoral. Sabe-se que sua função está diretamente relacionada com mecanismos importantes de sobrevivência celular, crescimento, migração e invasão em diversos

tipos de câncer, inclusive em CACs. Em nossos achados, o NOTCH não foi identificado quando avaliamos a presença dos transcritos diferencialmente expressos, no entanto, ao avaliarmos o painel customizado, observou-se a expressão aumentada de *NOTCH1* em 4 pacientes individualmente.

8.4 Avaliação da Expressão de microRNAs em Carcinoma Adenóide Cístico

Apesar do baixo número de estudos com CACs em relação à análises do exoma e de expressão gênica, vários estudos sobre a modulação da expressão de miRNAs nessa doença têm sido realizados nos últimos anos. No entanto, a maioria dos trabalhos avalia a expressão diferencial de miRNAs por meio da comparação de CACs com outros tipos de tumores de cabeça e pescoço, de glândulas salivares ou entre amostras de indivíduos saudáveis, além de estudos em linhagens celulares^{64; 46; 45; 49; 65; 66; 67}. O presente estudo avaliou a expressão de miRNAs em amostras de tecido de CACs em diferentes subtipos histológicos quando comparados com o subtipo sólido, o mais agressivo. Também foram avaliados miRNAs expressos em pacientes de apresentaram invasão perineural em comparação com os que não apresentaram. Dessa forma, o foco do trabalho está relacionado com a agressividade do tipo tumoral em questão, sendo inédito na literatura até o momento.

Em relação ao subtipo histológico, três miRNAs (hsa-miR-181d, hsa-miR-23b e hsa-miR-455) reprimidos no subtipo histológico sólido em comparação aos subtipos tubular e cribiforme foram previamente relacionados com CACs em estudos prévios^{68; 67; 69}. Além disso, outros dois miRNAs, também reprimidos no subtipo sólido, foram previamente identificados em um estudo de neoplasma de glândulas salivares (hsa-miR-154-5p e hsa-miR-409)⁶⁹.

A análise correspondente aos miRNAs diferencialmente expressos em pacientes que apresentaram invasão perineural, em comparação com os que não apresentaram, mostraram em sua maioria miRNAs induzidos. Destes, o hsa-miR-143 e o hsa-miR-21 foram previamente associados com CACs em estudos prévios^{70; 69; 71; 72; 73; 74; 75; 76}. Este último também foi identificado como modulado em outras neoplasias de glândulas salivares e também em carcinoma adenóide cístico lacrimal. Além disso, outros miRNAs induzidos em CACs com invasão perineural também foram identificados em neoplasmas de glândulas salivares. São eles: hsa-miR-29c, hsa-miR-140, hsa-miR-195 e hsa-miR-24^{69; 77; 78; 79}.

Finalmente, as análises de associação em redes com genes diferencialmente expressos apontaram alguns desses miRNAs com nós interessantes a serem avaliados como candidatos para estudos futuros.

8.5 Limitações do Estudo e Perspectivas Futuras

A principal limitação do estudo está relacionada ao baixo número de amostras e o alto custo dos experimentos. No entanto, por se tratar de um tumor raro, a maioria dos estudos em CACs apresenta um número amostral menor que 30 casos. A limitação de amostras de tecido congelado com porcentagem tumoral suficiente para avaliação também foi um fator limitante.

Em contrapartida, a casuística foi selecionada a partir de um número maior de pacientes com critérios altamente restritivos. Isso permitiu a avaliação de uma série mais homogênea. Diversos estudos mostram que casuísticas maiores podem afetar os resultados em decorrência da heterogeneidade dos casos. Dessa forma, foi possível caracterizar em nível transcricional os pacientes com os painéis utilizados.

Uma possível aplicação futura seria a investigação em um maior número de casos visando avaliar se o padrão observado poderia se repetir mesmo em casos mais complexos e indiferenciados. Finalmente, buscar os achados em amostras de menor qualidade, eliminando a necessidade do uso de tecido congelado.

9 CONCLUSÃO

Diante dos resultados do presente trabalho, foi possível obter o perfil de expressão dos mRNAs, microRNAs e proteínas em CACs de glândulas salivares, com foco no perfil histológico sólido e na ocorrência de invasão perineural. As análises realizadas permitiram a avaliação tanto em amostras parafinadas (mRNA para painel PanCancer e microRNA) como amostras de tecido congelado (mRNA para painel customizado e proteínas). Além disso, foram identificadas interações entre mRNA-microRNA, possíveis fusões gênicas que caracterizam a doença e genes de interesse envolvidos em vias carcinogênicas que servem de candidatos para estudos futuros.

REFERÊNCIAS

- [1] Silveira, A., Gonçalves, J., Sequeira, T., Ribeiro, C., Lopes, C., Monteiro, E., and Pimentel, F. L. [Head and neck cancer: health related quality of life assessment considering clinical and epidemiological perspectives]. *Revista Brasileira De Epidemiologia = Brazilian Journal of Epidemiology* **15**(1), 38–48 March (2012).
- [2] Paccolini, C. and Santos, R. Princípios do Tratamento dos Tumores Malignos das Glândulas Salivares. In *Câncer de Cabeça e Pescoço: Diagnóstico e Tratamento*, 227–35. São Paulo (2008).
- [3] Hashibe, M., Brennan, P., Benhamou, S., Castellsague, X., Chen, C., Curado, M. P., Dal Maso, L., Daudt, A. W., Fabianova, E., Fernandez, L., Wunsch-Filho, V., Franceschi, S., Hayes, R. B., Herrero, R., Koifman, S., La Vecchia, C., Lazarus, P., Levi, F., Mates, D., Matos, E., Menezes, A., Muscat, J., Eluf-Neto, J., Olshan, A. F., Rudnai, P., Schwartz, S. M., Smith, E., Sturgis, E. M., Szeszenia-Dabrowska, N., Talamini, R., Wei, Q., Winn, D. M., Zaridze, D., Zatonski, W., Zhang, Z.-F., Berthiller, J., and Boffetta, P. Alcohol drinking in never users of tobacco, cigarette smoking in never drinkers, and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. *Journal of the National Cancer Institute* **99**(10), 777–789 May (2007).
- [4] Atallah, S., Casiraghi, O., Fakhry, N., Wassef, M., Uro-Coste, E., Espitalier, F., Sudaka, A., Kaminsky, M. C., Dakpe, S., Digue, L., Bouchain, O., Morinière, S., Hourseau, M., Bertolus, C., Jegoux, F., Thariat, J., Calugaru, V., Schultz, P., Philouze, P., Mauvais, O., Righini, C. A., Badoual, C., Saroul, N., Goujon, J. M., Marie, J. P., Taouachi, R., Brenet, E., Aupérin, A., and Baujat, B. A prospective multi-

- centre REFCOR study of 470 cases of head and neck Adenoid cystic carcinoma: epidemiology and prognostic factors. *European Journal of Cancer* **130**, 241–249 May (2020).
- [5] Shishegar, M., Ashraf, M. J., Azarpira, N., Khademi, B., Hashemi, B., and Ashrafi, A. Salivary gland tumors in maxillofacial region: a retrospective study of 130 cases in a southern Iranian population. *Pathology Research International* **2011**, 934350 (2011).
- [6] Seethala, R. R. An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head and Neck Pathology* **3**(1), 69–77 March (2009).
- [7] Jaber, M. A. Intraoral minor salivary gland tumors: a review of 75 cases in a Libyan population. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* **35**(2), 150–154 February (2006).
- [8] Board, W. C. o. T. E., Chan, J. K. C., Grandis, J. R., Takata, T., and Slootweg, P. J., editors. *WHO Classification of Head and Neck Tumours*. World Health Organization, Lyon, edição: 4th ed. edition, (2017).
- [9] Junqueira, L. C. and Carneiro, J. C. Glândulas Anexas do Tubo Digestivo. In *Histologia Básica*, 270–86. Koogan, Rio de Janeiro (1999).
- [10] Altemani, A., Costa, A. F., Montalli, V. A. M., Mosqueda-Taylor, A., Paes de Almeida, O., León, J. E., and Hermsen, M. Signet-ring cell change in adenoid cystic carcinoma: a clinicopathological and immunohistochemical study of four cases. *Histopathology* **62**(4), 531–542 March (2013).

- [11] Bradley, P. J. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Current Opinion in Otolaryngology & Head and Neck Surgery* **12**(2), 127–132 April (2004).
- [12] Brill, L. B., Kanner, W. A., Fehr, A., Andr en, Y., Moskaluk, C. A., L oning, T., Stenman, G., and Frierson, H. F. Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **24**(9), 1169–1176 September (2011).
- [13] Panaccione, A. C. *Identification and Characterization of Neural-like Cancer Stem Cells in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma*. PhD thesis, Vanderbilt University, Nashville, TN, (2016).
- [14] van Weert, S., Bloemena, E., van der Waal, I., de Bree, R., Rietveld, D. H. F., Kuik, J. D., and Leemans, C. R. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single-center analysis of 105 consecutive cases over a 30-year period. *Oral Oncology* **49**(8), 824–829 August (2013).
- [15] Dodd, R. L. and Slevin, N. J. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncology* **42**(8), 759–769 September (2006).
- [16] Chae, Y. K., Chung, S. Y., Davis, A. A., Carneiro, B. A., Chandra, S., Kaplan, J., Kalyan, A., and Giles, F. J. Adenoid cystic carcinoma: current therapy and potential therapeutic advances based on genomic profiling. *Oncotarget* **6**(35), 37117–37134 November (2015).
- [17] Agarwal, J. P., Jain, S., Gupta, T., Tiwari, M., Laskar, S. G., Dinshaw, K. A., Cha-

- turvedi, P., D’cruz, A. K., and Shrivastava, S. K. Intraoral adenoid cystic carcinoma: prognostic factors and outcome. *Oral Oncology* **44**(10), 986–993 October (2008).
- [18] Mithani, S. K., Shao, C., Tan, M., Smith, I. M., Califano, J. A., El-Naggar, A. K., and Ha, P. K. Mitochondrial mutations in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *PloS One* **4**(12), e8493 December (2009).
- [19] Foote, F. W. and Frazell, E. L. Tumors of the major salivary glands. *Cancer* **6**(6), 1065–1133 November (1953).
- [20] Papaspyrou, G., Hoch, S., Rinaldo, A., Rodrigo, J. P., Takes, R. P., van Herpen, C., Werner, J. A., and Ferlito, A. Chemotherapy and targeted therapy in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. *Head & Neck* **33**(6), 905–911 June (2011).
- [21] Caballero, M., E Sosa, A., Tagliapietra, A., and Grau, J. J. Metastatic adenoid cystic carcinoma of the salivary gland responding to cetuximab plus weekly paclitaxel after no response to weekly paclitaxel alone. *Head & Neck* **35**(2), E52–54 February (2013).
- [22] Liu, J., Shao, C., Tan, M. L., Mu, D., Ferris, R. L., and Ha, P. K. Molecular biology of adenoid cystic carcinoma. *Head & Neck* **34**(11), 1665–1677 November (2012).
- [23] Persson, M., Andrén, Y., Mark, J., Horlings, H. M., Persson, F., and Stenman, G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**(44), 18740–18744 November (2009).
- [24] Jaso, J. and Malhotra, R. Adenoid cystic carcinoma. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine* **135**(4), 511–515 April (2011).

- [25] Palmeiro, M. R., Figueiredo, M. A. Z. d., Cherubini, K., and Yurgel, L. S. Carcinoma adenóide cístico – relato de caso. *Revista Odonto Ciência* **20**(50), 388–392 January (2007).
- [26] Shen, C., Xu, T., Huang, C., Hu, C., and He, S. Treatment outcomes and prognostic features in adenoid cystic carcinoma originated from the head and neck. *Oral Oncology* **48**(5), 445–449 May (2012).
- [27] Marcinow, A., Ozer, E., Teknos, T., Wei, L., Hurtuk, A., Old, M., Agrawal, A., Carrau, R., and Iwenofu, O. H. Clinicopathologic predictors of recurrence and overall survival in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single institutional experience at a tertiary care center. *Head & Neck* **36**(12), 1705–1711 December (2014).
- [28] Vikram, B., Strong, E. W., Shah, J. P., and Spiro, R. H. Radiation therapy in adenoid-cystic carcinoma. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* **10**(2), 221–223 February (1984).
- [29] Ellington, C. L., Goodman, M., Kono, S. A., Grist, W., Wadsworth, T., Chen, A. Y., Owonikoko, T., Ramalingam, S., Shin, D. M., Khuri, F. R., Beitler, J. J., and Saba, N. F. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: Incidence and survival trends based on 1973-2007 Surveillance, Epidemiology, and End Results data. *Cancer* **118**(18), 4444–4451 September (2012).
- [30] Lin, C.-H., Yen, R.-F., Jeng, Y.-M., Tzen, C.-Y., Hsu, C., and Hong, R.-L. Unexpected rapid progression of metastatic adenoid cystic carcinoma during treatment with imatinib mesylate. *Head & Neck* **27**(12), 1022–1027 December (2005).

- [31] Vila, L., Liu, H., Al-Quran, S. Z., Coco, D. P., Dong, H.-J., and Liu, C. Identification of c-kit gene mutations in primary adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **22**(10), 1296–1302 October (2009).
- [32] Nagao, T., Sato, E., Inoue, R., Oshiro, H., H Takahashi, R., Nagai, T., Yoshida, M., Suzuki, F., Obikane, H., Yamashina, M., and Matsubayashi, J. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta Histochemica Et Cytochemica* **45**(5), 269–282 October (2012).
- [33] Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., El-Naggar, A. K., and Futreal, P. A. C-kit gene mutations in adenoid cystic carcinoma are rare. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **23**(6), 905–906; author reply 906–907 June (2010).
- [34] Yuan, T. L. and Cantley, L. C. PI3k pathway alterations in cancer: variations on a theme. *Oncogene* **27**(41), 5497–5510 September (2008).
- [35] de Lima, M. d. D. M., Marques, Y. M. F. S., Alves, S. d. M., Freitas, V. M., Soares, F. A., de Araújo, V. C., Pinto, D. d. S., and Mantesso, A. MDM2, P53, P21waf1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiology* **33**(2), 142–146 August (2009).
- [36] Völker, H.-U., Scheich, M., Berndt, A., Haubitz, I., Metzger, A., Müller-Hermelink, H.-K., Kämmerer, U., and Schmidt, M. Expression of p-AKT characterizes adenoid cystic carcinomas of head and neck with a higher risk for tumor relapses. *Diagnostic Pathology* **4**, 18 June (2009).

- [37] Sandros, J., Stenman, G., and Mark, J. Cytogenetic and molecular observations in human and experimental salivary gland tumors. *Cancer Genetics and Cytogenetics* **44**(2), 153–167 February (1990).
- [38] Nordkvist, A., Mark, J., Gustafsson, H., Bang, G., and Stenman, G. Non-random chromosome rearrangements in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Genes, Chromosomes & Cancer* **10**(2), 115–121 June (1994).
- [39] Mitani, Y., Li, J., Rao, P. H., Zhao, Y.-J., Bell, D., Lippman, S. M., Weber, R. S., Caulin, C., and El-Naggar, A. K. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: Incidence, variability, and clinicopathologic significance. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **16**(19), 4722–4731 October (2010).
- [40] Stephens, P. J., Davies, H. R., Mitani, Y., Van Loo, P., Shlien, A., Tarpey, P. S., Papaemmanuil, E., Cheverton, A., Bignell, G. R., Butler, A. P., Gamble, J., Gamble, S., Hardy, C., Hinton, J., Jia, M., Jayakumar, A., Jones, D., Latimer, C., McLaren, S., McBride, D. J., Menzies, A., Mudie, L., Maddison, M., Raine, K., Nik-Zainal, S., O’Meara, S., Teague, J. W., Varela, I., Wedge, D. C., Whitmore, I., Lippman, S. M., McDermott, U., Stratton, M. R., Campbell, P. J., El-Naggar, A. K., and Futreal, P. A. Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma. *The Journal of Clinical Investigation* **123**(7), 2965–2968 July (2013).
- [41] Vékony, H., Ylstra, B., Wilting, S. M., Meijer, G. A., van de Wiel, M. A., Leemans, C. R., van der Waal, I., and Bloemena, E. DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Clinical Cancer*

- Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **13**(11), 3133–3139 June (2007).
- [42] Frierson, H. F., El-Naggar, A. K., Welsh, J. B., Sapinoso, L. M., Su, A. I., Cheng, J., Saku, T., Moskaluk, C. A., and Hampton, G. M. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *The American Journal of Pathology* **161**(4), 1315–1323 October (2002).
- [43] Bell, D., Bell, A. H., Bondaruk, J., Hanna, E. Y., and Weber, R. S. In-depth characterization of the salivary adenoid cystic carcinoma transcriptome with emphasis on dominant cell type. *Cancer* **122**(10), 1513–1522 May (2016).
- [44] He, L. and Hannon, G. J. MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics* **5**(7), 522–531 July (2004).
- [45] He, Q., Zhou, X., Li, S., Jin, Y., Chen, Z., Chen, D., Cai, Y., Liu, Z., Zhao, T., and Wang, A. MicroRNA-181a suppresses salivary adenoid cystic carcinoma metastasis by targeting MAPK-Snai2 pathway. *Biochimica Et Biophysica Acta* **1830**(11), 5258–5266 November (2013).
- [46] Mitani, Y., Roberts, D. B., Fatani, H., Weber, R. S., Kies, M. S., Lippman, S. M., and El-Naggar, A. K. MicroRNA profiling of salivary adenoid cystic carcinoma: association of miR-17-92 upregulation with poor outcome. *PloS One* **8**(6), e66778 (2013).
- [47] Zhang, B., Pan, X., Cobb, G. P., and Anderson, T. A. microRNAs as oncogenes and tumor suppressors. *Developmental Biology* **302**(1), 1–12 February (2007).

- [48] Concepcion, C. P., Bonetti, C., and Ventura, A. The microRNA-17-92 family of microRNA clusters in development and disease. *Cancer Journal (Sudbury, Mass.)* **18**(3), 262–267 June (2012).
- [49] Chen, W., Zhao, X., Dong, Z., Cao, G., and Zhang, S. Identification of microRNA profiles in salivary adenoid cystic carcinoma cells during metastatic progression. *Oncology Letters* **7**(6), 2029–2034 June (2014).
- [50] Persson, M., Andrén, Y., Moskaluk, C. A., Frierson, H. F., Cooke, S. L., Futreal, P. A., Kling, T., Nelander, S., Nordkvist, A., Persson, F., and Stenman, G. Clinically significant copy number alterations and complex rearrangements of MYB and NFIB in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Genes, Chromosomes & Cancer* **51**(8), 805–817 August (2012).
- [51] Ho, A. S., Kannan, K., Roy, D. M., Morris, L. G. T., Ganly, I., Katabi, N., Ramaswami, D., Walsh, L. A., Eng, S., Huse, J. T., Zhang, J., Dolgalev, I., Huberman, K., Heguy, A., Viale, A., Drobnjak, M., Leversha, M. A., Rice, C. E., Singh, B., Iyer, N. G., Leemans, C. R., Bloemena, E., Ferris, R. L., Seethala, R. R., Gross, B. E., Liang, Y., Sinha, R., Peng, L., Raphael, B. J., Turcan, S., Gong, Y., Schultz, N., Kim, S., Chiosea, S., Shah, J. P., Sander, C., Lee, W., and Chan, T. A. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nature Genetics* **45**(7), 791–798 July (2013).
- [52] Hu, Y., Raynard, S., Sehorn, M. G., Lu, X., Bussen, W., Zheng, L., Stark, J. M., Barnes, E. L., Chi, P., Janscak, P., Jasin, M., Vogel, H., Sung, P., and Luo, G. RECQL5/Recql5 helicase regulates homologous recombination and suppresses tumor

- formation via disruption of Rad51 presynaptic filaments. *Genes & Development* **21**(23), 3073–3084 December (2007).
- [53] Podhorecka, M., Skladanowski, A., and Bozko, P. H2AX Phosphorylation: Its Role in DNA Damage Response and Cancer Therapy. *Journal of Nucleic Acids* **2010** August (2010).
- [54] Andersson, M. K., Mangiapane, G., Nevado, P. T., Tsakaneli, A., Carlsson, T., Corda, G., Nieddu, V., Abrahamian, C., Chayka, O., Rai, L., Wick, M., Kedaigle, A., Stenman, G., and Sala, A. ATR is a MYB regulated gene and potential therapeutic target in adenoid cystic carcinoma. *Oncogenesis* **9**(1), 5 January (2020).
- [55] Brill, E., Yokoyama, T., Nair, J., Yu, M., Ahn, Y.-R., and Lee, J.-M. Prexasertib, a cell cycle checkpoint kinases 1 and 2 inhibitor, increases in vitro toxicity of PARP inhibition by preventing Rad51 foci formation in BRCA wild type high-grade serous ovarian cancer. *Oncotarget* **8**(67), 111026–111040 December (2017).
- [56] Xu, J., Zhu, X., Li, Q., Chen, C., Guo, Z., Tan, Z., Zheng, C., and Ge, M. Loss of PIM1 correlates with progression and prognosis of salivary adenoid cystic carcinoma (SACC). *Cancer Cell International* **18**, 22 (2018).
- [57] Asquith, C. R. M., Laitinen, T., and East, M. P. PKMYT1: a forgotten member of the WEE1 family. *Nature Reviews Drug Discovery* **19**(3), 157–157 November (2019).
- [58] Ramsay, R. G. and Gonda, T. J. MYB function in normal and cancer cells. *Nature Reviews. Cancer* **8**(7), 523–534 July (2008).
- [59] Mitra, P., Yang, R.-M., Sutton, J., Ramsay, R. G., and Gonda, T. J. CDK9 inhibitors selectively target estrogen receptor-positive breast cancer cells through combined

- inhibition of MYB and MCL-1 expression. *Oncotarget* **7**(8), 9069–9083 February (2016).
- [60] Andersson, M. K., Afshari, M. K., Andrén, Y., Wick, M. J., and Stenman, G. Targeting the Oncogenic Transcriptional Regulator MYB in Adenoid Cystic Carcinoma by Inhibition of IGF1R/AKT Signaling. *Journal of the National Cancer Institute* **109**(9) (2017).
- [61] Tetsu, O., Phuchareon, J., Chou, A., Cox, D. P., Eisele, D. W., and Jordan, R. C. K. Mutations in the c-Kit gene disrupt mitogen-activated protein kinase signaling during tumor development in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Neoplasia (New York, N.Y.)* **12**(9), 708–717 September (2010).
- [62] Queimado, L., Lopes, C. S., and Reis, A. M. C. WIF1, an inhibitor of the Wnt pathway, is rearranged in salivary gland tumors. *Genes, Chromosomes & Cancer* **46**(3), 215–225 March (2007).
- [63] Chen, W., Ren, X., Wu, J., Gao, X., Cen, X., Wang, S., Sheng, S., Chen, Q., Tang, Y.-J., Liang, X.-H., and Tang, Y.-L. HSP27 associates with epithelial-mesenchymal transition, stemness and radioresistance of salivary adenoid cystic carcinoma. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* **22**(4), 2283–2298 (2018).
- [64] Liu, L., Hu, Y., Fu, J., Yang, X., and Zhang, Z. MicroRNA155 in the growth and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology* **42**(2), 140–147 February (2013).
- [65] Veit, J. A., Scheckenbach, K., Schuler, P. J., Laban, S., Wigggenhauser, P. S., Wigggenhauser, S. P., Thierauf, J., Klussmann, J. P., and Hoffmann, T. K. MicroRNA

- expression in differentially metastasizing tumors of the head and neck: adenoid cystic versus squamous cell carcinoma. *Anticancer Research* **35**(3), 1271–1277 March (2015).
- [66] Kiss, O., Tőkés, A.-M., Spisák, S., Szilágyi, A., Lippai, N., Székely, B., Szász, A. M., and Kulka, J. Breast- and salivary gland-derived adenoid cystic carcinomas: potential post-transcriptional divergencies. A pilot study based on miRNA expression profiling of four cases and review of the potential relevance of the findings. *Pathology oncology research: POR* **21**(1), 29–44 January (2015).
- [67] Kiss, O., Tőkés, A.-M., Vranic, S., Gatalica, Z., Vass, L., Udvarhelyi, N., Szász, A. M., and Kulka, J. Expression of miRNAs in adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* **467**(5), 551–562 November (2015).
- [68] Andreasen, S., Tan, Q., Agander, T. K., Steiner, P., Bjørndal, K., Høgdall, E., Larsen, S. R., Erentaite, D., Olsen, C. H., Ulhøi, B. P., von Holstein, S. L., Wessel, I., Heegaard, S., and Homøe, P. Adenoid cystic carcinomas of the salivary gland, lacrimal gland, and breast are morphologically and genetically similar but have distinct microRNA expression profiles. *Modern Pathology: An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* **31**(8), 1211–1225 (2018).
- [69] Zhang, X., Cairns, M., Rose, B., O'Brien, C., Shannon, K., Clark, J., Gamble, J., and Tran, N. Alterations in miRNA processing and expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland. *International Journal of Cancer* **124**(12), 2855–2863 June (2009).
- [70] Xie, S., Yu, X., Li, Y., Ma, H., Fan, S., Chen, W., Pan, G., Wang, W., Zhang, H., Li,

- J., and Lin, Z. Upregulation of lncRNA ADAMTS9-AS2 Promotes Salivary Adenoid Cystic Carcinoma Metastasis via PI3K/Akt and MEK/Erk Signaling. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* **26**(12), 2766–2778 (2018).
- [71] Wang, C., Li, T., Yan, F., Cai, W., Zheng, J., Jiang, X., and Sun, J. Effect of simvastatin and microRNA-21 inhibitor on metastasis and progression of human salivary adenoid cystic carcinoma. *Biomedicine & Pharmacotherapy = Biomedecine & Pharmacotherapie* **105**, 1054–1061 September (2018).
- [72] Yan, F., Wang, C., Li, T., Cai, W., and Sun, J. Role of miR-21 in the growth and metastasis of human salivary adenoid cystic carcinoma. *Molecular Medicine Reports* **17**(3), 4237–4244 March (2018).
- [73] Jiang, L.-H., Ge, M.-H., Hou, X.-X., Cao, J., Hu, S.-S., Lu, X.-X., Han, J., Wu, Y.-C., Liu, X., Zhu, X., Hong, L.-L., Li, P., and Ling, Z.-Q. miR-21 regulates tumor progression through the miR-21-PDCD4-Stat3 pathway in human salivary adenoid cystic carcinoma. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology* **95**(12), 1398–1408 December (2015).
- [74] Andreasen, S., Tan, Q., Agander, T. K., Hansen, T. V. O., Steiner, P., Bjørndal, K., Høgdall, E., Larsen, S. R., Erentaite, D., Olsen, C. H., Ulhøi, B. P., Heegaard, S., Wessel, I., and Homøe, P. MicroRNA dysregulation in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland in relation to prognosis and gene fusion status: a cohort study. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* **473**(3), 329–340 September (2018).

- [75] Flores, B. d. C. T. d. C. P., Lourenço, S. V., Damascena, A. S., Kowalski, L. P., Soares, F. A., and Coutinho-Camillo, C. M. Altered expression of apoptosis-regulating miRNAs in salivary gland tumors suggests their involvement in salivary gland tumorigenesis. *Virchows Archiv: An International Journal of Pathology* **470**(3), 291–299 March (2017).
- [76] Cinpolat, O., Unal, Z. N., Ismi, O., Gorur, A., and Unal, M. Comparison of microRNA profiles between benign and malignant salivary gland tumors in tissue, blood and saliva samples: a prospective, case-control study. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology* **83**(3), 276–284 June (2017).
- [77] Boštjančič, E., Hauptman, N., Grošelj, A., Glavač, D., and Volavšek, M. Expression, Mutation, and Amplification Status of EGFR and Its Correlation with Five miRNAs in Salivary Gland Tumours. *BioMed Research International* **2017**, 9150402 (2017).
- [78] Santos, P. R. B., Coutinho-Camillo, C. M., Soares, F. A., Freitas, V. S., Vilas-Bôas, D. S., Xavier, F. C. A., Rocha, C. A. G., de Araújo, I. B., and Dos Santos, J. N. MicroRNAs expression pattern related to mast cell activation and angiogenesis in paraffin-embedded salivary gland tumors. *Pathology, Research and Practice* **213**(12), 1470–1476 December (2017).
- [79] Zhang, M.-X., Zhang, J., Zhang, H., and Tang, H. miR-24-3p Suppresses Malignant Behavior of Lacrimal Adenoid Cystic Carcinoma by Targeting PRKCH to Regulate p53/p21 Pathway. *PloS One* **11**(6), e0158433 (2016).

Declaração de Conclusão

Declaro a pedido do interessado e para os devidos fins que Maicon Fernando Zanon da Silva concluiu a Tese de Doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde – área de Oncologia, da Fundação Pio XII – Hospital de Câncer de Barretos, sob a orientação do Prof. Dr. Cristovam Scapulatempo Neto

O aluno defendeu publicamente a tese intitulada: “Determinação da expressão gênica, de microRNAs e proteínas envolvidos em vias carcinogênicas do carcinoma adenoide cístico de cabeça e pescoço”, perante a Comissão Julgadora constituída pelos professores: Dr. André Lopes Carvalho, Dr. Felipe D'Almeida Costa e a Dra. Márcia Maria Chiquitelli Marques Silveira, no dia 22 de julho de 2020.

Após julgamento, o candidato foi considerado aprovado e a ata da Banca Julgadora será homologada pelo Conselho de Pós-Graduação.

Informo que o programa de Mestrado desta Instituição teve seu reconhecimento homologado pelo CNE (PORT. MEC 1364, DE 29/09/2011, DOU 30/09/2011, seç.1, p.40) e o programa de doutorado foi homologado pelo CNE (Port. MEC 1331, de 08/11/2012, DOU 09/11/2012, sec 1, p. 8).

Declaro ainda que o diploma do interessado encontra-se em expedição e registro na secretaria de Pós-Graduação do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital de Câncer de Barretos.

Barretos, 22de julho de2020.



Carolina Sgorlon Jorgetto
Supervisora Administrativo
Pós-Graduação em Oncologia