

AVALIAÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO- MESÊNQUIMA DURANTE A MORFOGÊNESE E TUMORIGÊNESE DAS GLÂNDULAS SALIVARES HUMANAS

ELEN ALVES DE SOUSA

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Doutor em
Ciências**

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

Co-Orientadora: Dra Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Sousa, Elen Alves de

Avaliação da transição epitélio-mesênquima durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas / Elen Alves de Sousa - São Paulo 2017.

59p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. Glândulas Salivares/Salivary Glands. 2. Transição Epitelial-Mesenquimal/Epithelial-Mesenchymal Transition. 3. Carcinogênese/Carcinogenesis. 4. Morfogênese/Morphogenesis

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família, que é a minha base na vida e as pessoas que me inspiram a ser a pessoa de caráter que eu sou.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que me deu saúde, uma família linda e pessoas maravilhosas ao meu redor.

Agradeço aos meus pais por tudo o que eles são e representam na minha vida, o quanto me ajudam e sei que irão me ajudar ainda.

Agradeço a Dra Cláudia por me orientar durante todo o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a Dra Silvia por colaborar com o desenvolvimento do trabalho.

Agradeço a minha Irmã Erika por ser do jeito que ela é, por ser a pessoa mais generosa que eu conheço.

Agradeço meu irmão Lucas e minha cunhada Bruna por serem um casal que amo e o Lucas por ser o maior e melhor irmão que eu podia ter.

Agradeço aos meus sobrinhos Eduardo e Pedro que tornam os meus dias mais coloridos.

Agradeço meus avôs que não estão mais aqui, e as minhas avós que sempre se preocupam e me colocam em todas as orações.

Agradeço a todos os meus tios e tias pela preocupação e pelo carinho e por me ligarem sempre para me incentivar a ir mais longe sempre.

Agradeço ao meu namorado, pelo companheirismo, pelo apoio, pelo carinho, amor, dedicação e por sempre me incentivar a ir sempre mais longe.

Agradeço também a família do meu namorado por me incentivarem.

Agradeço as minhas amigas Gabi, Rafinha, Carlinha por serem sempre fundamentais nos meus dias.

Agradeço o departamento de pós-graduação, pela gentileza e agilidade e pronto atendimento para tudo o que precisamos.

Agradeço a todo corpo docente da Fundação Antônio Prudente por passarem seus conhecimentos.

Agradeço o departamento de estatística pela enorme ajuda.

Agradeço a todos os funcionários do hospital pela prestação de serviços (comitê de ética, funcionários do CIPE).

Agradeço a todos os funcionários da biblioteca.

Agradeço o Serviço de Arquivo Médico e Estatístico-SAME por disponibilizarem os prontuários.

Agradeço o departamento de cabeça e pescoço pela participação no trabalho.

Agradeço os colaboradores do CIPE pela ajuda sempre bem-vinda.

Agradeço em especial os amigos que conquistei aqui e que faço questão de levar para toda a minha vida (Michelle, Renata, Juliana, Bianca, Beatriz, Mérin, Helen, Ágatha, Mayara, Irina, Malu e Flávia Lima).

Agradeço os funcionários da patologia, por serem tão gentis e por atender meus pedidos, em especial Carlinhos e Severino.

Agradeço a família Estilo por sempre se preocuparem comigo, por permitir que eu faça parte de uma equipe sensacional, e que se tornaram tão importantes que são considerados uma segunda família.

Agradeço a Capes pelo apoio financeiro.

RESUMO

Sousa EA. **Avaliação da transição epitélio-mesênquima durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado Fundação Antônio Prudente].

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Esses tumores são classificados em benignos e malignos e correspondem a cerca de 3% dos tumores de cabeça e pescoço. O carcinoma mucoepidermóide e o carcinoma adenoide cístico são os tumores malignos mais comuns das glândulas salivares. O adenoma pleomórfico é o tumor benigno mais comum das glândulas salivares. A transição epitélio mesênquima (EMT), acontece quando as células epiteliais perdem a adesão célula-célula e adquirem características mesênquimais, com habilidades migratórias importantes, sendo um processo crucial no desenvolvimento embrionário. A EMT é controlada primariamente por três famílias de fatores de transcrição: a família de fatores do tipo "zincfinger" Snail (Snail/Slug), ZEB (ZEB1/ZEB2) e a família dos fatores do tipo "helix-loop-helix" (Twist). O objetivo deste trabalho foi avaliar o processo de transição epitélio-mesênquima durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas, utilizando-se a expressão imunoistoquímica das proteínas E-caderina, Twist, ZEB-1 e c-kit. Foram selecionados 55 pacientes portadores de tumores de glândulas salivares humanas sendo 23 de adenoma pleomórfico 18 de carcinoma adenoide cístico e 14 de carcinoma mucoepidermóide. Foram também analisadas 14 amostras de glândulas salivares em desenvolvimento e 5 amostras de glândulas salivares sem evidência de neoplasia. Nossos resultados demonstram expressão da proteína E-caderina em todas as amostras. É possível observar que há diminuição da expressão de E-caderina nas células mioepiteliais tanto nos casos de adenoma quanto nos casos de carcinoma adenoide cístico e

positividade forte nas células epiteliais neoplásicas e nas áreas ductais e tubulares. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide foi observada uma expressão heterogênea: positividade maior nas células mucosas e uma perda focal em áreas escamosas e de frente de invasão. A proteína Twist foi amplamente expressa nas amostras selecionadas, sendo observada marcação nuclear em todas as amostras de adenoma pleomórfico e CAC. Positividade nuclear também foi observada na maioria dos casos de carcinoma mucoepidermóide. A proteína ZEB apresentou expressão perinuclear nas células tumorais e expressão nas células do estroma nas amostras de carcinoma adenoide cístico e carcinoma mucoepidermóide. Nos casos de adenoma pleomórfico, a expressão perinuclear de ZEB1 foi observada em raras células. A expressão de c-kit foi observada nas células epiteliais e nos ductos neoplásicos das amostras de adenoma pleomórfico e CAC. Nas células mioepiteliais não houve expressão da proteína. Já para os casos de carcinoma mucoepidermóide houve positividade em poucas células nos centros das ilhas tumorais em algumas células escamosas e em estruturas ductiformes a expressão foi positiva. De forma geral, observamos a expressão das proteínas E-caderina, Twist, ZEB1 e c-kit nos tumores de glândula salivar. Perda da expressão dessas proteínas foi observada pontualmente e outros estudos são necessários para melhor esclarecer o papel do processo de EMT na morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares.

SUMMARY

Sousa EA. **[Evaluation of epithelial-mesenchymal transition during the morphogenesis and tumorigenesis of human salivary glands]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente].

Salivary glands tumors comprised a heterogeneous group of lesions, presenting different histological characteristics and diverse clinical behavior. These tumors are classified as benign or malignant tumors and account for about 3% of the head and neck tumors. Mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma are the most common malignant tumors of the salivary glands. Pleomorphic adenoma is the most common benign tumor of the salivary glands. The epithelial-mesenchymal transition (EMT) occurs when epithelial cells lose cell-cell adhesion and acquire mesenchymal characteristics, with important migratory abilities, being a crucial process in embryonic development. EMT is primarily controlled by three families of transcription factors: zinc-finger family Snail (Snail / Slug), ZEB family (ZEB1 / ZEB2) and the helix-loop-helix family (Twist). The aim of this study was to evaluate the process of epithelial-mesenchymal transition during development and tumorigenesis of the human salivary glands, using the immunohistochemical expression of E-cadherin, Twist, ZEB-1 and c-kit proteins. Fifty-five patients with human salivary glands tumors were selected: 23 pleomorphic adenomas 18 adenoid cystic carcinomas and 14 mucoepidermoid carcinomas. We also analyzed 14 developing salivary glands samples and 5 histologically normal salivary glands samples. Our results demonstrate E-cadherin protein expression in all samples. It is possible to observe decreased of E-cadherin expression in myoepithelial cells in both pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma samples and strong positivity in neoplastic epithelial cells and in ductal and tubular areas. In mucoepidermoid carcinoma samples, a heterogeneous expression was observed: strong positivity in mucous cells and focal loss of expression in

squamous areas and at invasion front. Twist protein was widely expressed in the selected samples, presenting a nuclear staining in all pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma samples. Nuclear positivity was also observed in most cases of mucoepidermoid carcinoma. ZEB protein showed perinuclear expression in tumor cells and nuclear expression in stromal cells in adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma samples. In pleomorphic adenoma samples a perinuclear expression of ZEB1 was observed in rare cells. c-kit expression was observed in epithelial cells and neoplastic ducts of pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma samples. In myoepithelial cells there was no expression of the protein. For mucoepidermoid carcinoma samples positivity was observed in few cells at the central area of the tumor islands and rare squamous cells and in ductiform structures the expression was positive. In general, we observed expression of E-cadherin, Twist, ZEB1 and c-kit proteins in salivary gland tumors. Loss of protein expression was observed punctually and other studies are needed to better clarify the role of the EMT process in morphogenesis and tumorigenesis of the salivary glands.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos histológicos de glândulas salivares em desenvolvimento.....	2
Figura 2	Imagem ilustrativa da estrutura de uma glândula salivar.....	3
Figura 3	Processo da perda da expressão da expressão de marcadores epiteliais e o aumento da expressão de marcadores mesênquimais.....	9
Figura 4	O processo da EMT e a plasticidade epitelial.....	10
Figura 5	Regulação do processo de EMT.....	11
Figura 6	Aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico.....	22
Figura 7	Aspectos histopatológicos do carcinoma adenóide cístico.....	23
Figura 8	Aspectos histopatológicos do carcinoma mucoepidermóide...	24
Figura 9	Expressão da proteína E-caderina em tumores de glândula salivar.....	32
Figura 10	Expressão da proteína Twist em tumores de glândula salivar.....	36
Figura 11	Expressão da proteína ZEB1 em tumores de glândula salivar.....	38
Figura 12	Expressão da proteína c-Kit em tumores de glândula salivar.....	41

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Descrição das amostras de glândula salivar em desenvolvimento selecionadas com relação à idade gestacional e localização.....	18
Quadro 2	Anticorpos primários, clones, procedência, diluição, recuperação antigênica, controles positivos e padrão de marcação.....	19
Tabela 1	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico.....	26
Tabela 2	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma adenoide cístico.....	27
Tabela 3	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide.....	28
Tabela 4	Imunoexpressão das proteínas em amostras de adenoma pleomórfico, carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucoepidermóide e glândulas salivares em desenvolvimento.....	30

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AP	Adenoma Pleomórfico
CAC	Carcinoma adenoide cístico
DAB	Diaminobenzidina
EDTA/TRIS	Ácido acético diaminotetraetileno/ hidroximetil amino metano
EMT	Transição epitélio-mesênquima, do inglês <i>Epithelial-to-Mesechymal Transition</i>
HE	Hematoxilina e eosina
MEC	Carcinoma mucoepidermóide
°C	Graus Celsius
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
WNT	Via de sinalização, do inglês, <i>wingless integrated</i>
µm	Micrometro

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Desenvolvimento das Glândulas Salivares.....	1
1.2	Tumores das Glândulas salivares	3
1.3	Transição Epitélio Mesênquima.....	7
1.3.1	E-caderina	10
1.3.2	Twist	10
1.3.3	ZEB-1	12
1.3.4	c-KIT	13
1.3.5	Snail	13
1.4	Justificativa	14
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.1	Objetivos Específicos	15
3	CASUÍSTICA E MÉTODOS	16
3.1	Casuística.....	16
3.2	Imunoistoquímica	18
4	RESULTADOS.....	20
4.1	Seleção dos Pacientes	20
4.2	Dados Clínico Patológicos e Demográficos.....	24
4.3	Imunoistoquímica	28
4.3.1	E-Caderina	30
4.3.2	Twist	32
4.3.3	ZEB1	34
4.3.4	c-kit.....	36
5	DISCUSSÃO	38

6	CONCLUSÕES	48
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

ANEXO

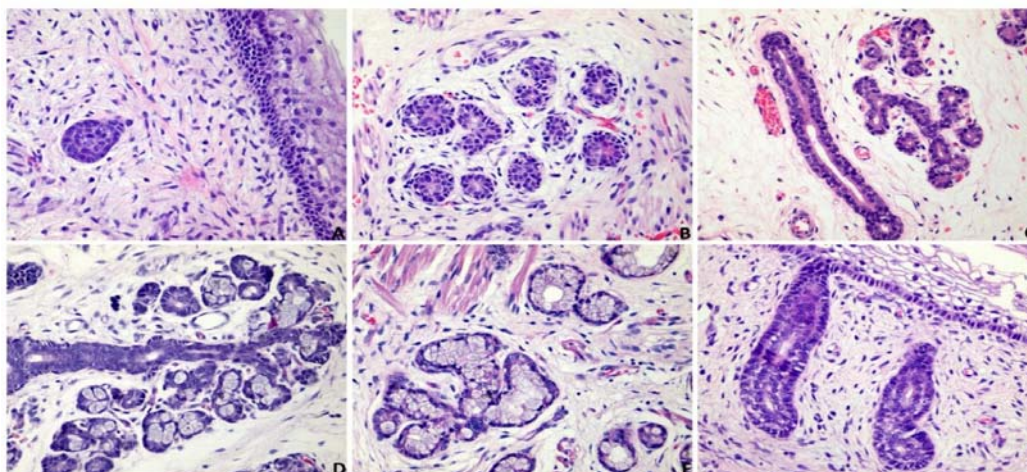
Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 O DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são estruturas complexas formadas por um sistema de ductos e ácinos. A estrutura do sistema ductal é composta por células luminais e não-luminais (células basais e células mioepiteliais). As unidades secretoras acinares e os ductos intercalares são envolvidos pelas células mioepiteliais enquanto que as outras porções do sistema ductal contam com a presença das células basais (RAUBENHEIMER et al. 1987; REDMAN 1994; DE PAULA et al. 2017).

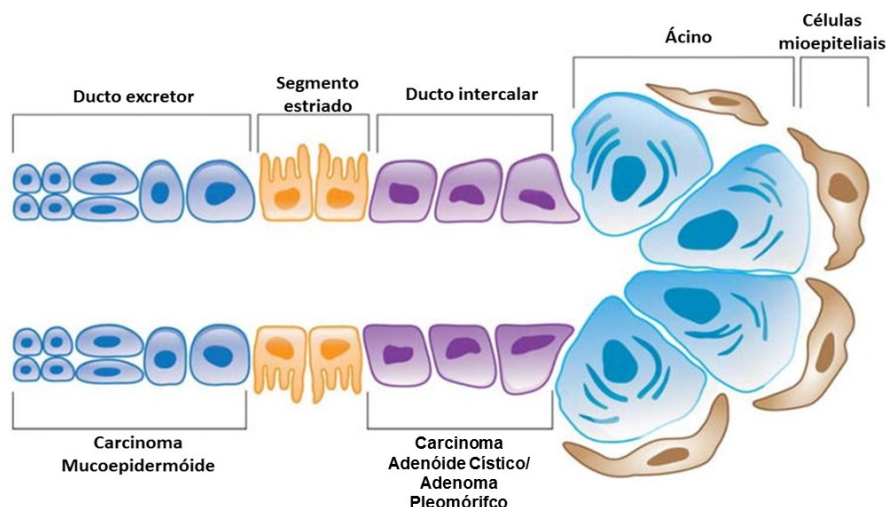
As glândulas salivares se desenvolvem, de forma geral, de maneira similar: sua formação se inicia com a proliferação de cordões sólidos de células epiteliais no mesênquima subjacente. Esse cordão celular prolifera-se e ramifica-se, formando uma estrutura pseudoglandular. A estrutura ramificada sofre então degeneração das células centrais e se canaliza, formando estruturas secretoras terminais. Estas sofrem um processo final de diferenciação que irá finalmente formar os ácinos maduros (Figura 1). A porção epitelial das glândulas salivares constitui o parênquima glandular e o ectomesênquima ao redor desse parênquima se diferencia no tecido conjuntivo de suporte da glândula salivar, o estroma (ELLIS e AUCLAIR 1996; DE PAULA et al. 2017).



Fonte: GOMES (2017)

Figura 1 - Aspectos histológicos de glândulas salivares em desenvolvimento. A e B, fase inicial do desenvolvimento: botões de células (aumento original X400); C, cordões epiteliais ramificados (aumento original X400); D, fase de transição canalicular/botão terminal (aumento original X400); E, fase de botão terminal com estruturas acinares desenvolvidas (aumento original X400); F, ducto excretor desembocando na mucosa (aumento original X400).

Como resultado do processo de desenvolvimento acima descrito as glândulas salivares tomam a forma de estrutura composta túbulo-acinar o que indica a presença de um sistema ductal ramificado e unidades secretórias com porção tubular e acinar. Na tentativa de explicar a histogênese dos tumores de glândulas salivares, uma teoria de origem bicelular tem sido apresentada. Argumenta-se que diferentes porções da glândula salivar dão origem às diferentes neoplasias e que as células mioepiteliais são responsáveis em parte para a grande variação histológica dessas neoplasias (REGEZI e BATSAKIS 1977; ADAMS et al. 2014) (Figura 2).



Fonte: Modificado de ADAMS et al. (2014)

Figura 2 - Imagem ilustrativa da estrutura de uma glândula salivar. Diagrama ilustrativo da estrutura de uma glândula salivar, com a localização de alguns dos tumores mais frequentes em glândula salivar, o carcinoma mucoepidermóide na porção dos ductos excretórios, e o carcinoma adenóide cístico e adenoma pleomórfico localizados nos ductos intercalares.

1.2 TUMORES DAS GLÂNDULAS SALIVARES

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Segundo a Organização Mundial da Saúde-OMS esses tumores são classificados em 13 subtipos benignos (adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais, tumor de Warthin, entre outros) e 24 subtipos malignos (adenocarcinoma de células basais, carcinoma de células acinares, carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide-cístico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial, entre outros)

(EVESON2005). Esses tumores correspondem a cerca de 3% dos tumores de cabeça e pescoço (LIMA et al. 2005; OGAWA et al. 2008).

O principal tratamento para as neoplasias de glândula salivar é a cirurgia. Radioterapia pós-operatória tem sido utilizada para melhorar o controle local da doença e aumentar as taxas de sobrevida para pacientes com tumores de alto grau, com margens cirúrgicas positivas ou com infiltração perineural. O papel da quimioterapia no manejo desses tumores ainda é controverso, sendo que alguns quimioterápicos apresentam respostas em torno de 15-50% e de curta duração (MILANO et al. 2007).

A baixa incidência dos tumores de glândula salivar, aliada à grande quantidade de lesões diferentes presentes neste grupo faz do diagnóstico destas lesões uma atividade desafiadora, especialmente quando existe pouco material para ser analisado como no caso das PAAF (punção aspirativa por agulha fina) e das biópsias incisionais. Por isso, a identificação de marcadores moleculares de diagnóstico e prognóstico é tão importante, especialmente para este grupo de neoplasias.

O adenoma pleomórfico é o tumor benigno mais comum. Apesar de apresentar uma lenta progressão, o adenoma pleomórfico sem tratamento pode causar significativa morbidade e até a morte (MENDENHALL et al. 2008). A taxa de recorrência desses tumores varia de 1 a 5% e também há o risco de transformação maligna, que pode ocorrer de 3% a 4% dos casos (LINGAM et al. 2011).

O carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares e representa cerca de 5 a 15% de todos os tumores de

glândula salivar. Esses tumores ocorrem tanto nas glândulas maiores quanto nas menores, sendo composto por células epidermóides, mucosas e intermediárias. Os tumores mucoepidermóides são classificados em graus, baixo, intermediário e alto, com base em diversas características, como por exemplo, a taxa mitótica, a frequência de células epidermóides, células produtoras de mucina, diferenciação celular, tamanho do tumor, formação de cistos, invasão perineural e metástase (GOODE et al. 1998; KAYE 2006; SEETHALA 2009; BAI et al. 2012; MCHUGH et al. 2012).

O carcinoma adenóide cístico (CAC) origina-se das células ductais e mioepiteliais provenientes dos ductos intercalares e forma três distintos padrões microscópicos: tubular, cribriforme e sólido. A forma cribriforme é a mais prevalente sendo composta por ilhas de pequenas células com núcleo basofílico, citoplasma claro e muitos espaços císticos. Na forma tubular observam-se estruturas semelhantes a ductos ou túbulos. Além disso, esses dois padrões são caracterizados pela participação das células mioepiteliais e epiteliais e são conhecidos pelo comportamento indolente. Já a forma sólida é caracterizada por mostrar discreta tendência de formar ductos ou espaços císticos o que a diferencia dos dois outros padrões, sendo também associado à perda parcial das células mioepiteliais (atribuídas como “supressoras de tumor”) e grande atividade mitótica o que lhes confere o comportamento biológico agressivo (ALVES et al. 2005; BELL e HANNA 2012; LIU et al. 2012). A natureza infiltrativa do CAC é responsável pela característica tumoral de disseminação local recorrente, a qual pode ocorrer anos após o tratamento cirúrgico e a radioterapia inicial (LAURIE e LICITRA

2006). O CAC representa aproximadamente 10% dos tumores de glândula salivar. É caracterizado por invasão em tecido adjacente e disseminação hematogênica em órgãos distantes principalmente pulmão, ossos e fígado (LIU et al. 2012). O CAC é caracterizado por progressão lenta, entretanto, a recidiva local e a metástase à distância resultam em uma baixa taxa de sobrevivência a longo prazo em que 80% a 90% dos pacientes morrem da doença em um período de 10 a 15 anos (EVESON2005).

Apesar dos avanços sólidos alcançados pelas pesquisas, biomarcadores que auxiliem no diagnóstico das neoplasias das glândulas salivares e que expliquem a sua evolução e progressão ainda são motivos de intensa investigação. As informações das recentes pesquisas sobre alterações moleculares nas neoplasias das glândulas salivares abrem uma importante via para a compreensão dos mecanismos de tumorigênese desse grupo de lesões. Esse conhecimento certamente servirá, no futuro, como base para o desenvolvimento de novas técnicas aplicáveis para o diagnóstico e para o desenvolvimento de novas incursões terapêuticas.

O entendimento de mecanismos de alterações celulares das neoplasias é de extrema importância para se alcançar inovações nos tratamentos. Vários estudos têm demonstrado que o processo de transição epitélio-mesênquima (EMT, do inglês *Epithelial-to-Mesenchymal Transition*) promove diferenciação em tecidos epiteliais, sugerindo um papel importante no processo metastático (THIERY et al. 2009; LAMOUILLE et al. 2013; NIETO et al. 2016).

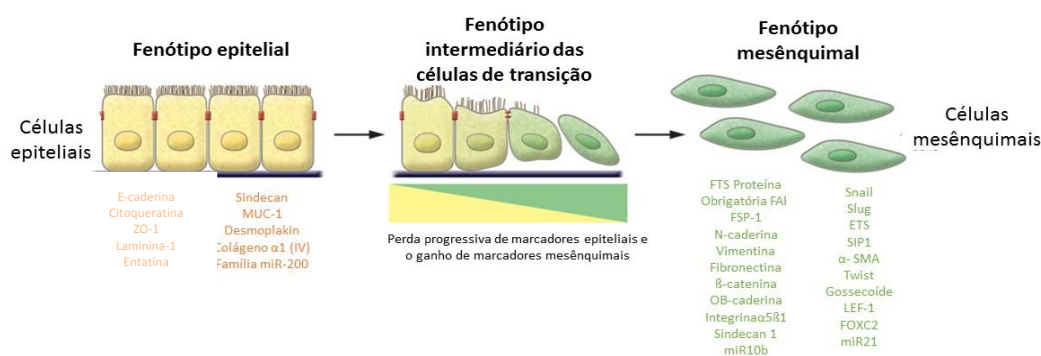
1.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESÊNQUIMA

A transição epitélio mesênquima (EMT), é um processo celular em que as células mudam seu fenótipo epitelial original e adquirem características de células mesênquimais, sendo um processo crucial no desenvolvimento embrionário (CÔME et al. 2004; THIERY et al. 2009; YEUNG e YANG 2017). Várias vias de sinalização tais como TGF- β , WNT, NOTCH têm sido implicadas na indução de EMT (YEUNG e YANG 2017). O início da EMT é acompanhado por mudanças na expressão dos fatores de transcrição, que regulam a expressão gênica e promovem a desregulação na síntese de proteínas correspondentes (MATYSIAK et al. 2017; YEUNG e YANG 2017).

A EMT é controlada primariamente por três famílias de fatores de transcrição: a família de fatores do tipo "zincfinger" Snail (Snail/Slug), ZEB (ZEB1/ZEB2) e a família dos fatores do tipo "helix-loop-helix" (Twist) (LAMOUILLE et al. 2013; YEUNG e YANG 2017).

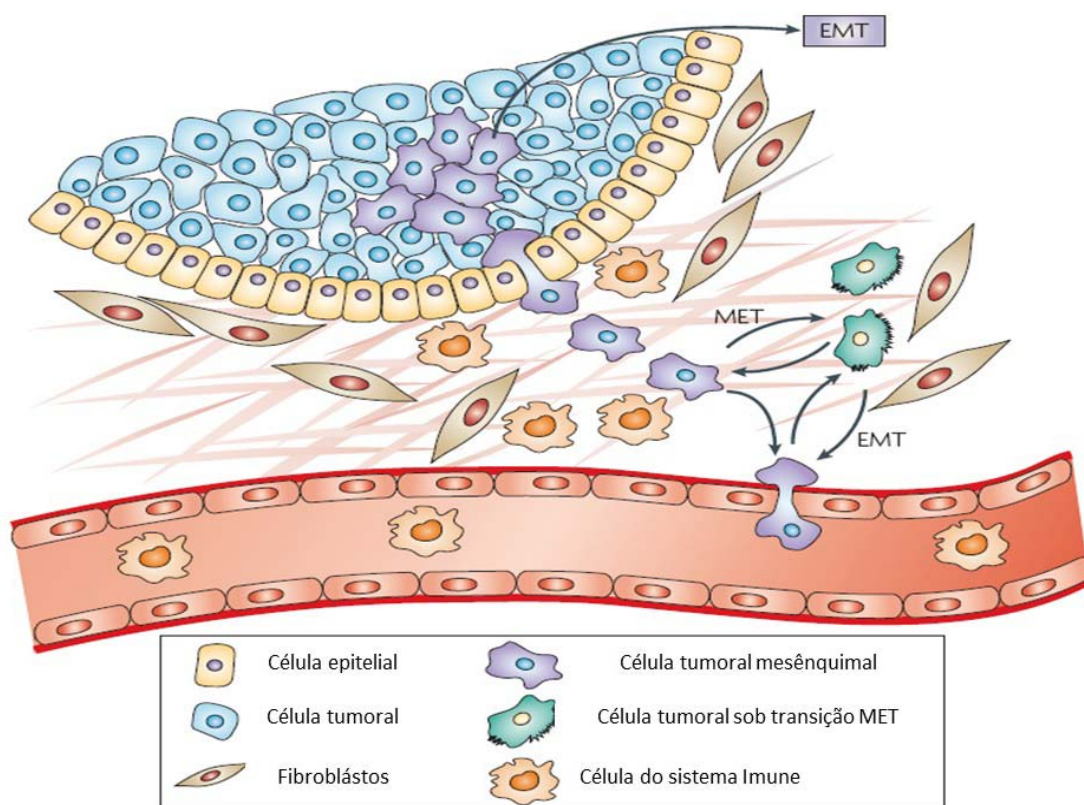
O fenômeno da EMT é composto por múltiplos passos e é iniciado pela perda de adesão celular associada à perda de marcadores epiteliais, tais como a E-caderina, já a β -catenina, N-caderina, vimentina e fibronectina, que são marcadores mesênquimais, tem um ganho na expressão (DIEPENBRUCK e CHRISTOFORI 2016; MATYSIAK et al. 2017) (Figura 3). Em seguida há uma perda de polarização basoapical, remodelagem do citoesqueleto, alteração da adesão na matriz e ativação de enzimas proteolíticas, tais como as metaloproteases de matriz (GUARINO et al. 2007;

VOULGARI e PINTZAS 2009; IWATSUKI et al. 2010; ZARAVINOS 2015). A EMT acontece normalmente durante a embriogênese e morfogênese e está envolvida em condições de fibrose após um ferimento no tecido (GUARINO et al. 2007; CHEN et al. 2012; ZARAVINOS 2015; DIEPENBRUCK e CHRISTOFORI 2016). Recentes estudos abordam a participação da EMT na progressão tumoral: células tumorais quando passam por EMT podem adquirir propriedades invasivas, resultando na criação de um microambiente favorável para o desenvolvimento/progressão tumoral (Figura 4).



Fonte:Modificado de KALLURI e WEINBERG (2009)

Figura 3 - Processo da perda da expressão de marcadores epiteliais e o aumento da expressão de marcadores mesênquimais. O diagrama apresenta as células epiteliais sofrendo uma perda progressiva de características epiteliais e adquirindo características mesênquimais, e com isso a perda da expressão de marcadores epiteliais e o ganho de expressão de marcadores mesênquimais.

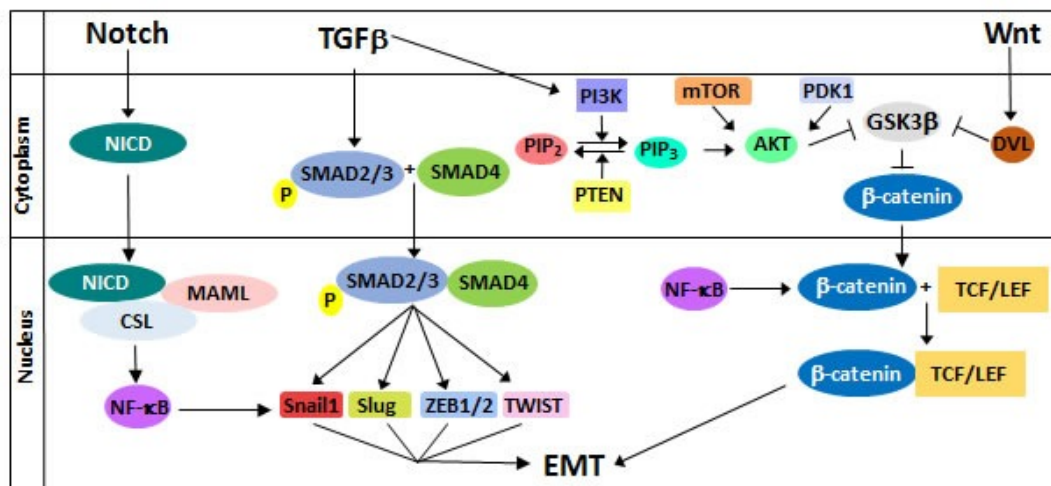


Fonte: Modificado de PEINADO et al. (2007)

Figura 4 - O processo da EMT e a plasticidade epitelial. Diagrama esquemático das principais propriedades das células durante o processo de transição epitélio-mesênquima (EMT). As células que sofreram a EMT durante a invasão tumoral são caracterizadas pela perda de adesão célula-célula e da polaridade acompanhado do rearranjo do citoesqueleto e aumento da motilidade celular. Podem ocorrer também células que anteriormente tenham sofrido a EMT e são capazes de readquirir um fenótipo epitelíode pela EMT reversa (MET) como resultado de novas interações com o microambiente do tumor.

A participação do processo de EMT tem sido demonstrada em diversos tumores por meio do uso de marcadores mesênquima-específicos, ou seja, vimentina e fibronectina, marcadores epiteliais específicos, isto é, E-caderina e citoqueratina, ou fatores de transcrição SNAIL/SLUG, ZEB, Twist (IWATSUKI et al. 2010). A presença desses marcadores tem sido descrita como um fator prognóstico em vários carcinomas humanos (PEINADO et al.

2004; IWATSUKI et al. 2010). Diversas vias de sinalização como TGF β , WNT, NOTCH, receptores de fatores de crescimento, HIF-1 α , IL-6/STAT têm sido implicadas na indução da EMT em condições fisiológicas (YEUNG e YANG 2017) (Figura 5).



Fonte: Modificado de STACY et al. (2017)

Figura 5 - Regulação do processo de EMT. A via de sinalização Notch leva à ativação de NF- κ B, que induz a EMT via aumento de expressão de SNAIL1 e estabilização de β -catenina. TGF β ativa as proteínas SMAD que promovem a transcrição dos fatores de transcrição SNAIL, SLUG, ZEB e TWIST. Além disso, a via TGF β interage com a via Wnt através da via PI3K/AKT. A sinalização de Wnt estabiliza a expressão de β -catenina, permitindo que ela forme um complexo transcricional com os fatores TCF/LEF estimulando a transcrição de reguladores da EMT como Snail, Slug e Vimentina.

1.3.1 E-caderina

A E-caderina é uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio expressa nos tecidos epiteliais, que constrói uma junção firme ligando as células adjacentes. A perda de E-caderina pode levar à progressão do tumor, metástase e pior prognóstico em carcinomas humanos. Durante o desenvolvimento, o comportamento das caderinas permite não somente o posicionamento as células, mas também leva à diferenciação e separação

de diferentes camadas de tecidos e migração celular (IWATSUKI et al. 2010; RAJWAR et al. 2015).

A perda da expressão de E-caderina é o principal evento no processo de EMT. Mecanismos que levam à perda da função de E-caderina incluem a hipermetilação das ilhas CpG na região promotora do gene, a modificação das histonas e a expressão dos fatores de transcrição ZEB1, ZEB2, Snail e Twist (CÔME et al. 2004; IWATSUKI et al. 2010; TELLEZ et al. 2011).

1.3.2 Twist

Twist é um fator de transcrição que apresenta em sua estrutura a presença de duas α -hélices conectadas por um *loop* (família de fatores *basic helix-loop-helix* (bHLH)) (MATYSIAK et al. 2017). Atua na regulação da gastrulação, controlando os movimentos celulares e reorganização dos tecidos durante o início da embriogênese (QIN et al. 2012).

A atuação de Twist promove indiretamente a diminuição da expressão de E-caderina, mas também envolve o aumento de expressão de marcadores mesênquimais. Além disso, Twist desempenha um papel importante em outros processos metastáticos como angiogênese, extravasamento, instabilidade cromossômica e proteção contra a apoptose (IMANI et al. 2016; MATYSIAK et al. 2017).

Recentes estudos têm demonstrado que aumento de expressão de Twist ocorre em diversos tumores malignos apresentando um papel crucial no processo metastático e promovendo a EMT. Alta expressão de Twist tem sido inversamente correlacionada à baixa expressão de E-caderina em carcinoma de endométrio, mama, tumores hematológicos (FU et al. 2012;

FENG et al. 2013; NOROZI et al. 2016). IMANI et al. (2016) realizando uma meta-análise identificaram que a expressão de Twist, Snail e Slug apresenta um potencial prognóstico em carcinoma de mama metastático, sendo o aumento da expressão associado à pior taxa de sobrevida.

1.3.3 ZEB1

A proteína ZEB1 (Zincfinger E-box-bindinghomeobox 1) faz parte da família de fatores de transcrição do tipo *zincfinger*. ZEB1 interage com regiões regulatórias dos genes alvo levando à repressão de genes relacionados ao desenvolvimento de células hematopoiéticas como também componentes da matriz extracelular. Ativação de genes relacionados à diferenciação mesenquimal também tem sido descrita (SCHMALHOFER et al. 2009).

Estudos têm demonstrado que o aumento da expressão de ZEB1 pode inibir a expressão de E-caderina, apresentando um importante papel no desenvolvimento, invasão e metástase em diversos tipos de tumores, tais como, pulmão, próstata e ovário, contribuindo para o processo de EMT (ROY et al. 2010; JIA et al. 2012; GUO et al. 2014). Tem sido proposto que Snail e ZEB1 iniciariam a repressão de E-caderina e, posteriormente, Slug e ZEB2 manteriam essa repressão de E-caderina(IWATSUKI et al. 2010).

Além do papel no processo de EMT as proteínas ZEB estão envolvidas em outros processos associados ao desenvolvimento tumoral como angiogênese. A expressão das proteínas ZEB pode ser regulada pelas

vias de sinalização TGF β , TNF α , NF κ B e Hedgehog (SCHMALHOFER et al. 2009).

1.3.4 c-KIT

O c-kit é um receptor de tirosina quinase desregulado em diversos tipos de tumores como carcinoma de pulmão pequenas células, melanomas malignos, câncer colorretal e mais de 80% dos casos de tumores gastrointestinais. Nesses tumores a mutação do gene c-kit é frequentemente observada (LENNARTSSON e RÖNNSTRAND 2012).

c-kit desempenha um papel fundamental na proliferação e diferenciação tumoral, desenvolvimento de recidivas, invasão e metástase. Recentes estudos têm demonstrado que c-kit pode atuar na indução do processo de EMT em carcinoma adenóide cístico (TANG et al. 2010, 2014).

1.3.5 Snail

A família de fatores de transcrição Snail é composta por 3 membros Snail, Slug e Twist (PEINADO et al, 2004; IWATSUKI, 2009). Snail tem sido implicado em várias funções durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta, incluindo diferenciação na mesoderme, controle da gastrulação, formação da crista neural, assimetria bilateral, desenvolvimento neural, apoptose e divisão celular. A expressão dos membros dessa família também pode estar envolvida no processo de tumorigênese, controlando o fenômeno da EMT (CÔME, 2004, THIERY, 2002). Snail é denominado como um repressor transcricional e indutor da EMT (PEINADO et al, 2007). A perda da

expressão da E-caderina pode indicar que Snail iniciou essa indução a EMT, mas essa perda da expressão de E-caderina pode ser incompleta, pois é frequentemente detectada em tumores metastáticos (THIERY,2002).

1.4 JUSTIFICATIVA

A avaliação da transição epitélio mesênquima (EMT), durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas, permite uma melhor compreensão dos mecanismos de tumorigênese nas glândulas salivares e um melhor entendimento dos componentes das neoplasias derivadas dessas glândulas. O processo da EMT acontece durante a invasão tumoral e está associada à ocorrência de metástase e pior prognóstico. Os tumores de glândula salivar compreendem um grupo heterogêneo com uma baixa incidência, o que torna essa variedade de lesões um desafio para o diagnóstico. Muitos estudos têm abordado a importância da EMT em vários tipos de lesões, mas para o grupo de tumores de glândula salivar este mecanismo ainda precisa ser elucidado.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação dos componentes do processo de transição epitélio-mesênquima durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

- ✓ Avaliar a imunexpressão das proteínas E-caderina, Twist, ZEB-1 e c-Kit em amostras de adenoma pleomórfico, carcinoma adenóide cístico, carcinoma mucoepidermóide e em amostras de glândulas salivares em desenvolvimento por imunoistoquímica

3 CASUÍSTICA E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionadas 23 amostras cirúrgicas de pacientes com adenoma pleomórfico 18 amostras cirúrgicas de pacientes com carcinoma adenóide cístico e 14 amostras cirúrgicas de pacientes com carcinoma mucoepidermóide, provenientes do arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Os pacientes foram submetidos à cirurgia no período de 1981 a 2011. Foram também utilizados 14 espécimes de glândulas salivares dissecadas de fetos humanos em diferentes estágios gestacionais, provenientes de abortos espontâneos (Quadro 1). Todos os fetos pesavam menos de 500 gramas, sendo consideradas peças cirúrgicas. As idades gestacionais dos fetos (4 a 25 semanas de vida-intrauterina) foram determinadas por meio da medida plantar segundo MCBRIDE et al. (1984) no momento da dissecação. Esse material pertence aos arquivos da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e foi cedido para a realização desse trabalho.

Cinco (5) espécimes de glândulas salivares histologicamente normais provenientes de cirurgias da cavidade oral também foram incluídos no estudo. Essas glândulas salivares compreendem glândulas mucosas (menores) de várias regiões da cavidade oral, e glândulas salivares maiores - parótida, submandibular e sublingual.

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina de cada caso foram analisadas por um patologista para checagem das estruturas e seleção do material utilizado na pesquisa. Foram incluídos no estudo materiais de peças cirúrgicas de pacientes que dispunham de material parafinado para a realização da imunoistoquímica e que não realizaram tratamento neoadjuvante.

Após a escolha do fragmento do tumor a ser utilizado na pesquisa, os blocos de parafina foram separados e cortes histológicos desse material, com 3µm de espessura foram utilizados para a realização da técnica de imunoistoquímica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (protocolo número: 1578/11D) (Anexo 1).

Quadro 1 - Descrição das amostras de glândula salivar em desenvolvimento selecionados com relação às idades gestacionais e localização

Idade gestacional (semanas)	Quantidade de amostras	Sítio de origem da amostra
4	1	Parótida
12	1	Palato
13	2	Parótida, lábio
15	1	Palato
18	1	Submandibular
19	4	Parótida, submandibular, lábio
20	1	Parótida
21	2	Parótida, submandibular
25	1	Língua, parótida, mandíbula, palato

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

As lâminas preparadas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi re-hidratado em concentrações decrescentes em etanol e as lâminas lavadas em água destilada.

A recuperação antigênica é um processo que aumenta a reatividade e foi realizada por tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0, utilizando-se panela de pressão ou banho maria 96°C, de acordo com a padronização de cada anticorpo (Quadro 2). Após a recuperação antigênica foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 minutos.

Quadro 2 - Anticorpos primários, clones, procedência, diluição, recuperação antigênica, controles positivos e padrão de marcação

Soro primário	Clone	Procedência	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
E-caderina	36	BD	1:2000	EDTA/Tris pH9,0; panela de pressão 15'	Mama	Membrana
Twist	10E4E6	LsBio	1:1500	Citrato pH6.0; panela de pressão 15'	Tumor de colon	Núcleo
ZEB1	2A8A6	LsBio	1:800	Citrato pH6.0, panela de pressão 15'	Tumor de mama	Núcleo/ Perinuclear
c-kit	Yr145	Cell Marque	1:500	EDTA/Tris pH9,0; banho 96°C 40'	Pele	Membrana

Em seguida foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *ProteinBlock* (Dako) por 20 minutos. As lâminas foram então incubadas por 16 horas a 4°C com o anticorpo específico.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção *Advance* (Dako). A revelação foi feita utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (*DAB*) e a contracoloração foi feita utilizando-se a hematoxilina. Todas as reações foram acompanhadas de um controle, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo utilizado. As reações foram analisadas em microscópio convencional e os dados estudados de forma descritiva e semiquantitativa. Na análise semiquantitativa foi considerado o seguinte escore, baseado no número de células e intensidade de marcação: 0, negativo (quando até 10% das células estão marcadas); 1, positivo (mais de 10% das células marcadas). Na análise descritiva foi avaliada a localização da marcação (núcleo, citoplasma, membrana) e a distribuição de marcação (difuso, focal). A análise foi feita por dois avaliadores que avaliaram consensualmente os padrões de marcação.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO DOS PACIENTES

Foram selecionadas 55 amostras cirúrgicas de pacientes com portadores de tumores de glândulas salivares humanas sendo 23 de adenoma pleomórfico 18 de carcinoma adenóide cístico e 14 de carcinoma mucoepidermóide. Foram também selecionadas 14 amostras de glândulas salivares em desenvolvimento e 5 amostras de glândulas salivares sem evidência de neoplasia. Imagens representativas de alguns casos selecionados podem ser observadas nas Figuras 5, 6 e 7.

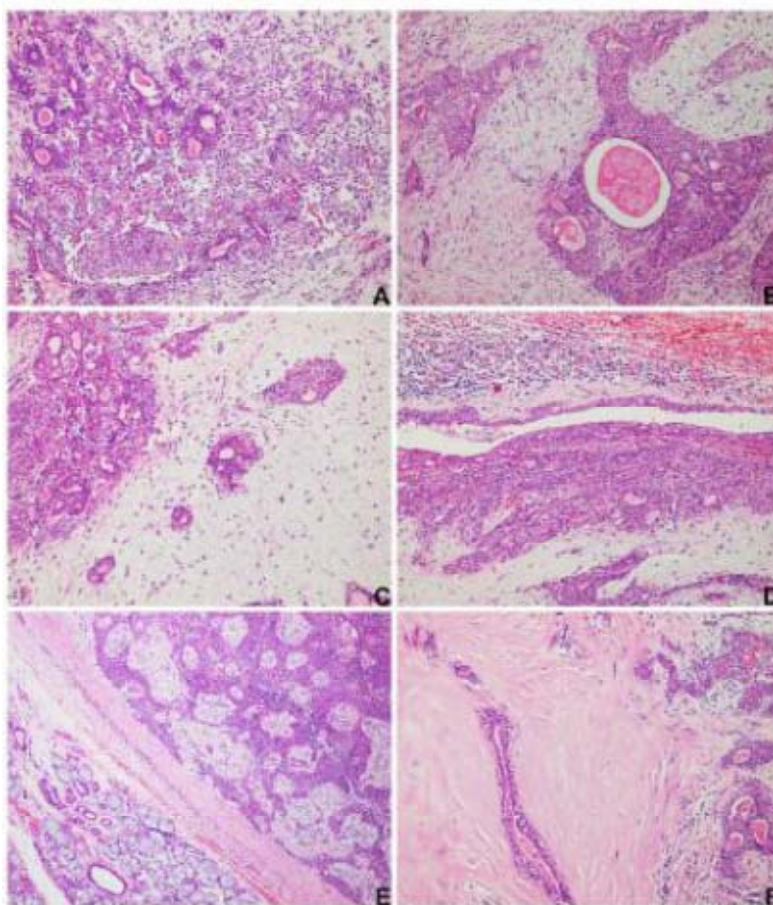


Figura 6 - Aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico. A e B, Células mioepiteliais e epiteliais arranjadas em lençol/ductos neoplásicos (aumento original X250); C, D e E, Células epiteliais e mioepiteliais em arranjos compactos e ductais e estroma mixóide. Observar em D e E a relação do tumor com a periferia (cápsula) (aumento original X250); F, Adenoma pleomórfico com estroma hialino (aumento original X250).

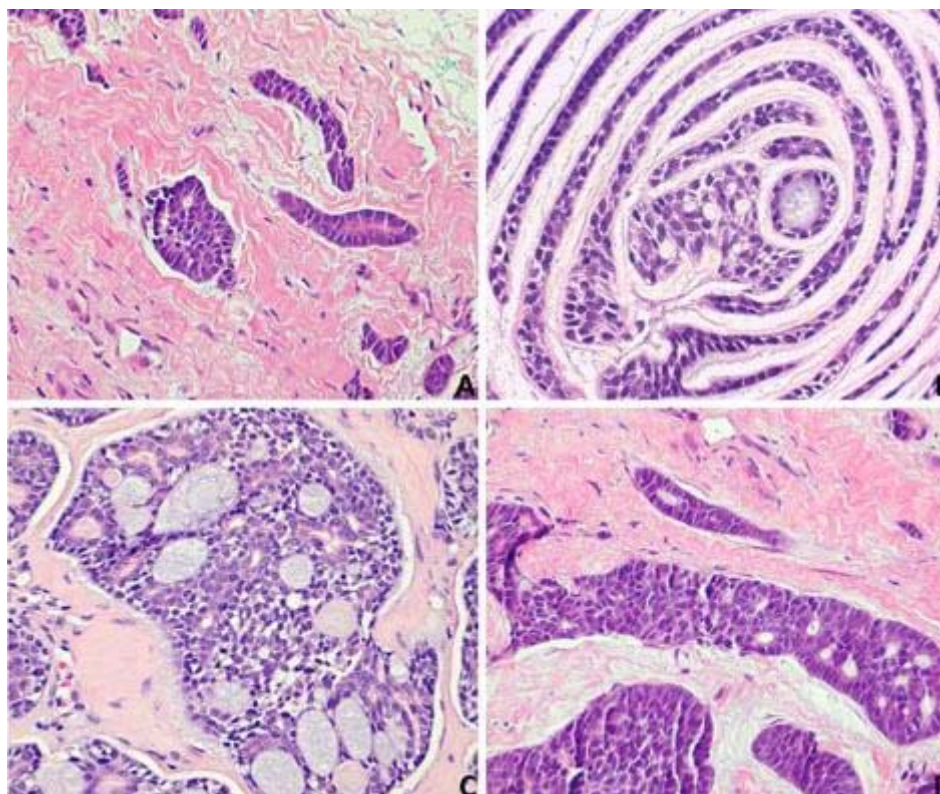


Figura 7 - Aspectos histopatológicos do carcinoma adenoide cístico. A, carcinoma adenóide cístico de padrão tubular (aumento original X250); B, carcinoma adenóide cístico de padrão túbulo cribriforme (aumento original X250); C, carcinoma adenóide cístico de padrão cribriforme (aumento original X250); D, carcinoma adenóide cístico de padrão sólido com pequenas aberturas luminiais (aumento original X250).

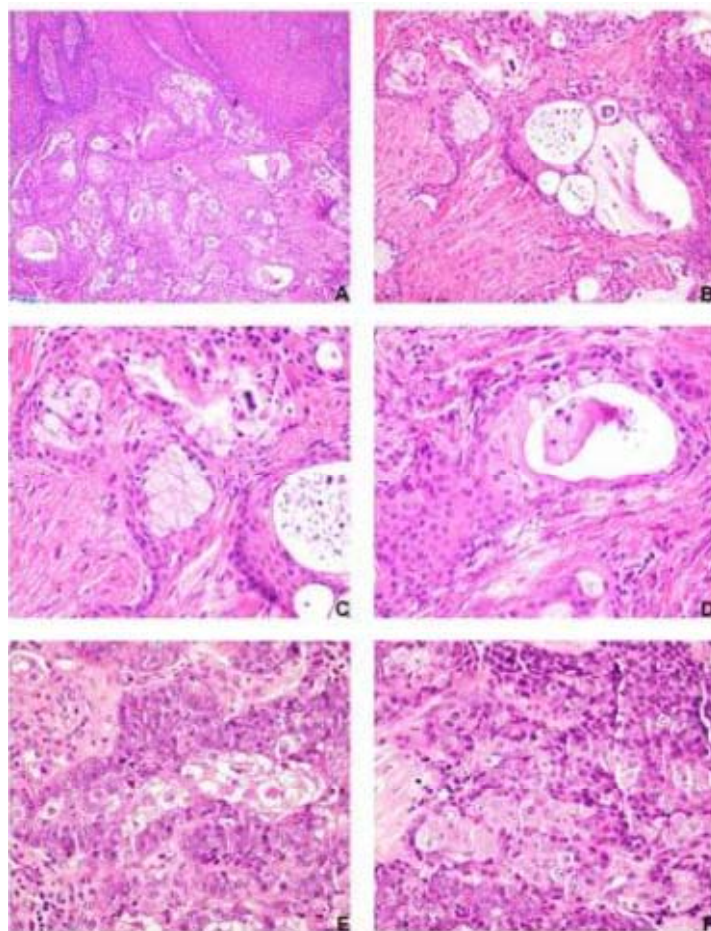


Figura 8 - Aspectos histopatológicos do carcinoma mucoepidermóide. A, aspecto geral do tumor, apresentando tanto áreas sólidas quanto lagos mucosos (aumento original X100); B, área de lago mucoso no carcinoma mucoepidermóide em maior aumento (aumento original X200); C e D, área de lago mucoso, mostrando células mucosas e intermediárias (aumento original X400); E e F, áreas mais sólidas do carcinomamucoepidermóide apresentando predomínio de células epidermóides (aumento original X400).

4.2 DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS

Dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico 12 eram mulheres e 11 homens e as idades variam entre 14 e 67 anos de idade (mediana das idades = 38 anos). O local mais frequentemente acometido foi a parótida com 14 pacientes (Tabela 1).

Dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico 11 eram mulheres e 7 eram homens e as idades variam entre 16 e 75 anos de idade (mediana de idades = 45 anos) (Tabela 2).

Dos pacientes portadores de carcinoma mucoepidermóide, 6 eram mulheres e 8 homens e as idades variaram entre 28 e 65 anos de idade (mediana das idades = 51 anos). O grau histológico baixo foi prevalente, ocorrendo em 5 pacientes (Tabela 3).

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico (n=23)

Características	Categorias	Número de pacientes (%)
Idade	< = 40	12 (52,1%)
	> 40	11 (47,9%)
Gênero	Feminino	12 (52,1%)
	Masculino	11 (47,9%)
Raça	Branca	18 (78,2%)
	Não Branca	04 (17,3%)
	n/d*	01 (4,5%)
Local do tumor	Parótida	14 (60,8%)
	Submandibular	06 (26,1%)
	Cavidade oral	03 (13,1%)
Invasão perineural	Sim	01 (4,4%)
	Não	15 (65,2%)
	n/d*	07 (30,4%)
Invasão vascular	Sim	00 (00,0%)
	Não	16 (69,5%)
	n/d*	07 (30,5%)

*, n/d informação não disponível

Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma adenóide cístico (n=18)

Características	Categorias	Número de pacientes (%)
Idade	< = 40	02 (11,1%)
	> 40	12 (66,6%)
	n/d*	04 (22,3%)
Gênero	Feminino	11 (61,1%)
	Masculino	07 (38,9%)
Raça	Branca	07 (38,9%)
	Não Branca	04 (22,2%)
	n/d*	07 (38,9%)
Local do tumor	Parótida	03 (16,6%)
	Submandibular	02 (11,1%)
	Cavidade oral	11 (61,2%)
	n/d*	02 (11,1%)
Invasão perineural	Sim	13 (72,3%)
	Não	05 (27,7%)
Invasão vascular	Sim	03 (16,6%)
	Não	14 (77,7%)
	n/d*	01 (5,7%)
Metástase em linfonodo	Sim	05 (27,7%)
	Não	11 (61,2%)
	n/d*	02 (11,1%)

*, n/d informação não disponível

Tabela 3 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide (n=14)

Características	Categorias	Número de pacientes (%)
Idade	< = 40	04 (28,5%)
	> 40	10 (71,5%)
Gênero	Feminino	06 (42,8%)
	Masculino	08 (57,2%)
Raça	Branca	12 (85,8%)
	Não Branca	02 (14,2%)
Local do tumor	Parótida	06 (42,8%)
	Cavidade oral	08 (57,2%)
Grau histológico	Alto	04 (28,5%)
	Intermediário	02 (14,2%)
	Baixo	05 (35,8%)
	n/d*	03 (21,4%)
Invasão perineural	Sim	04 (28,6%)
	Não	07 (50,0%)
	n/d*	03 (21,4%)
Invasão vascular	Sim	03 (21,4%)
	Não	08 (57,2%)
	n/d*	03 (21,4%)
Metástase em linfonodo	Sim	06 (42,9%)
	Não	03 (21,4%)
	n/d*	05 (35,7%)

*, n/d informação não disponível

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas para as 23 amostras cirúrgicas de pacientes com adenoma pleomórfico, 18 amostras cirúrgicas de pacientes com carcinoma adenoide cístico, 14 amostras cirúrgicas de pacientes com carcinoma mucoepidermóide, 14 amostras de glândulas salivares em desenvolvimento e 5 amostras de glândulas salivares histologicamente normais para avaliação das proteínas E-caderina, Twist, ZEB1 e c-Kit. As lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa e semiquantitativa. Os resultados estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 - Imunoexpressão das proteínas em amostras de adenoma pleomórfico, carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucoepidermóide e glândulas salivares em desenvolvimento

Proteína	Tecido	Positivo	Negativo	Total de amostras (número)*
E-caderina	Adenoma	20 (100,0%)	00 (0,0%)	20
	CAC	16 (100,0%)	00 (0,0%)	16
	Muco	13 (100,0%)	00 (0,0%)	13
	Glândula em desenvolvimento	12 (100,0%)	00 (0,0%)	12
Twist	Adenoma	21 (100,0%)	00 (0,0%)	21
	CAC	17 (100,0%)	00 (0,0%)	17
	Muco	10 (76,9%)	03 (23,1%)	13
	Glândula em desenvolvimento	08 (66,7%)	04 (33,3%)	12
ZEB1	Adenoma	20 (100,0%)	00 (0,0%)	20
	CAC	17 (100,0%)	00 (0,0%)	17
	Muco	09 (75,0%)	03 (25,0%)	12
	Glândula em desenvolvimento	12 (100,0%)	00 (0,0%)	12
c-kit	Adenoma	19 (86,4%)	03 (13,6%)	22
	CAC	16 (88,9%)	02 (11,1%)	18
	Muco	03 (23,1%)	10 (76,9%)	13
	Glândula em desenvolvimento	03 (23,1%)	10 (76,9%)	13

*, o valor total de amostras pode variar de acordo com a disponibilidade de material para a realização da técnica de imunoistoquímica

4.3.1 E-caderina

A proteína E-caderina foi expressa em todas amostras selecionadas. Os casos de adenoma pleomórfico apresentaram positividade nas células epiteliais neoplásicas, principalmente nas estruturas ductiformes. A expressão foi regular ao longo da membrana celular. Nas células mioepiteliais plasmocitóides a expressão de E-caderina foi fraca e descontínua na membrana plasmática, e nas regiões mixóides e condróides da neoplasia a proteína não foi expressa. A E-caderina também foi expressa nos casos de CAC, apresentando expressão forte nas células epiteliais, com uma forte marcação nas estruturas tubulares. Já nas áreas de células mioepiteliais a expressão foi fraca e descontínua. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide, a expressão de E-caderina foi heterogênea: positividade maior nas células mucosas e uma perda focal em áreas escamosas e de frente de invasão. E-caderina também foi expressa nas amostras de glândula salivar em desenvolvimento e glândulas normais. Os resultados estão ilustrados na Figura 9.

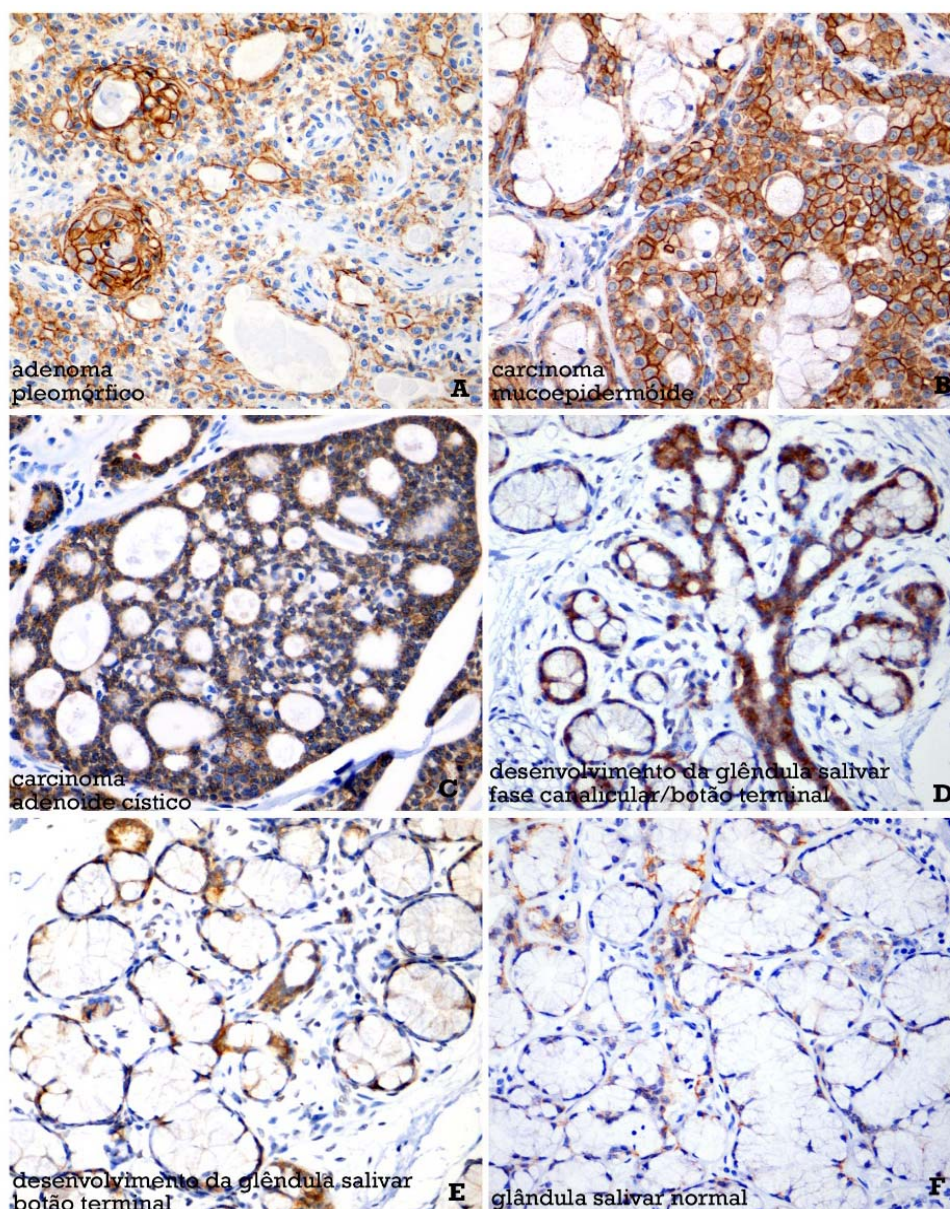


Figura 9 - Expressão da proteína E-caderina em tumores de glândula salivar. A, expressão forte no contorno da membrana plasmática de células epiteliais (células do tipo ductais) no adenoma pleomórfico (aumento original X400); B, carcinoma mucoepidermóide de baixo grau com exuberante área de células mucosas e células intermediárias positivas para E-caderina (aumento original X400); C, área cribriforme do carcinoma adenóide cístico: positividade nas células epiteliais neoplásicas e ausência da E-caderina nas células mioepiteliais (aumento original X250); D, glândula salivar em desenvolvimento: expressão de E-caderina na fase canalicular/botão terminal (aumento original X400); E, glândula salivar em desenvolvimento: expressão de E-caderina na fase de botão terminal, na região dos ductos intercalares (aumento original X400); F, expressão de E-caderina na glândula salivar normal (aumento original X400).

4.3.2 Twist

A proteína Twist foi amplamente expressa nas amostras selecionadas. Os casos de adenoma pleomórfico e CAC apresentaram positividade nuclear em todas as amostras. Twist apresentou positividade nuclear nas células epidermóides, mucosas e intermediárias na maioria dos casos de carcinoma mucoepidermóide. Positividade citoplasmática foi observada em um caso. Nas glândulas salivares em desenvolvimento Twist foi expressa na maioria das amostras em padrão nuclear. Positividade nuclear também foi observada nas amostras de glândula salivar normais. Os resultados estão ilustrados na Figura 10.

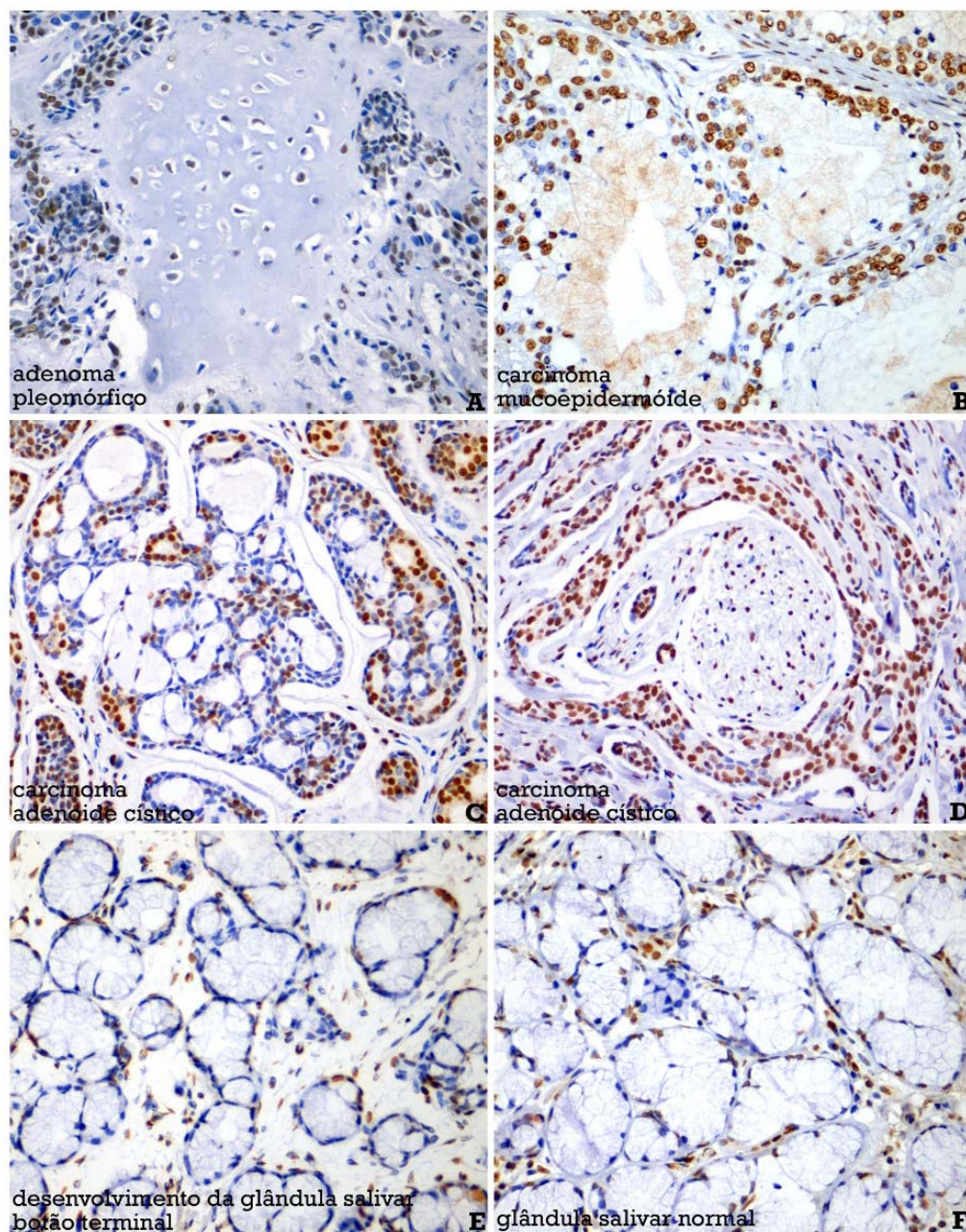


Figura 10 - Expressão da proteína Twist em tumores de glândula salivar. A, expressão nuclear de Twist em adenoma pleomórfico e negatividade na região de estroma (aumento original X400); B, carcinoma mucoepidermóide de baixo grau com área de células mucosas e células intermediárias positivas para Twist (aumento original X400); C, expressão de Twist em área cribriforme do carcinoma adenóide cístico (aumento original X250); D, expressão de Twist em área de invasão no carcinoma adenóide cístico (aumento original X250); E, glândula salivar em desenvolvimento: expressão de Twist na fase de botão terminal (aumento original X400); F, expressão de Twist no interstício da glândula salivar normal (aumento original X400).

4.3.3 ZEB1

Nos casos de adenoma pleomórfico, a expressão perinuclear de ZEB1 foi observada em raras células. Três casos apresentaram também positividade citoplasmática nas células luminais. Nos casos de CAC foi observada expressão perinuclear nas células tumorais e expressão nuclear nas células do estroma. Apenas 1 caso apresentou expressão nuclear nas células tumorais. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide também foi observada expressão perinuclear nas células tumorais e expressão nuclear nas células do estroma. Em 1 caso foi observada expressão nuclear em raras células epidermóides. Positividade perinuclear também foi observada nas glândulas salivares em desenvolvimento, sendo que em 5 casos também foi observada positividade nuclear. Nas glândulas normais foi observada positividade perinuclear nas células luminais. Os resultados estão ilustrados na Figura 11.

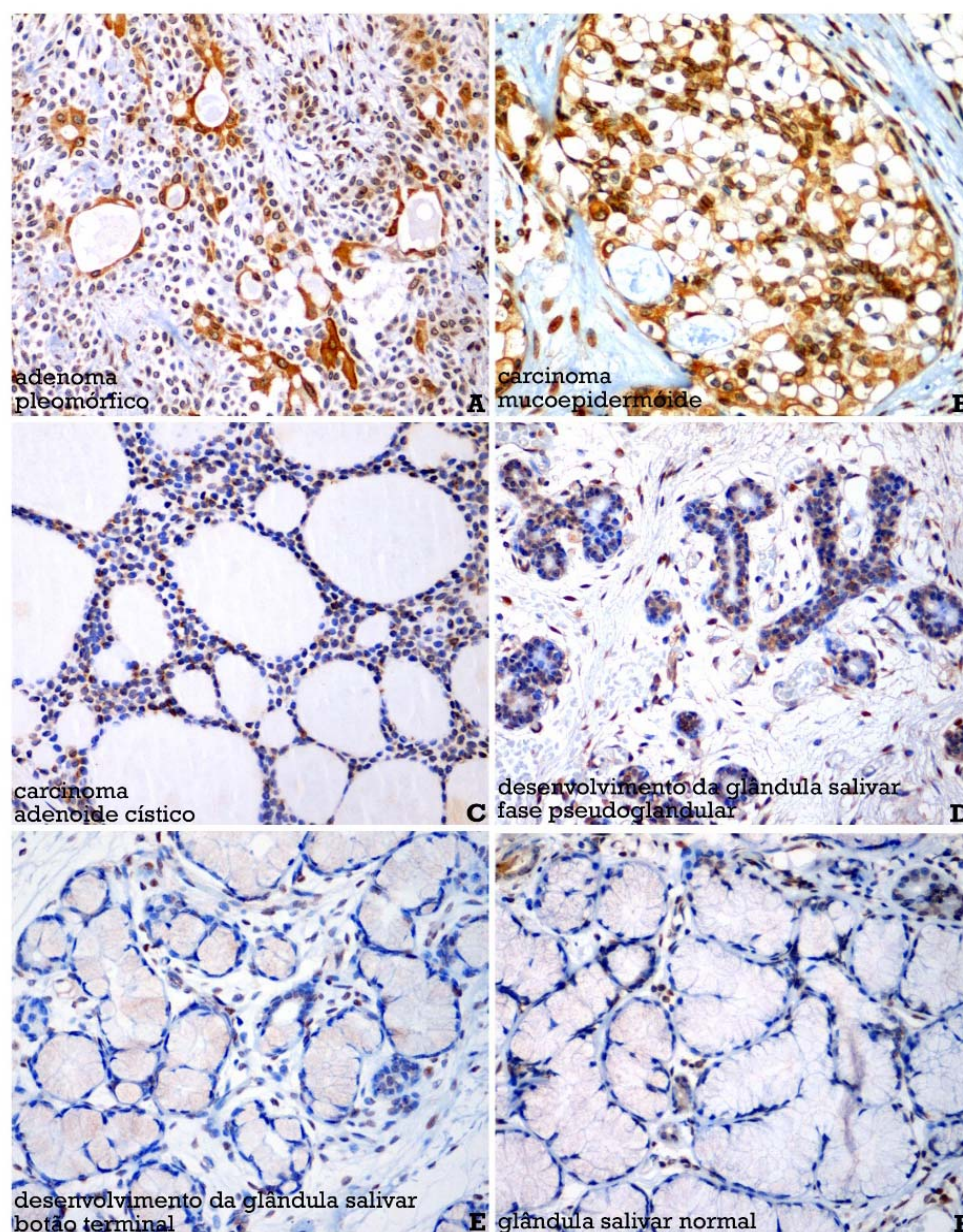


Figura 11 - Expressão da proteína ZEB1 em tumores de glândula salivar. A, expressão perinuclear de ZEB1 em raras células do adenoma pleomórfico e expressão citoplasmática em células luminais (aumento original X400); B, carcinoma mucoepidermóide apresentando expressão perinuclear nas células mucosas e células intermediárias (aumento original X400); C, expressão perinuclear de ZEB1 em área tubular do carcinoma adenóide cístico (aumento original X400); D, expressão perinuclear de ZEB1 na fase pseudoglandular da glândula salivar em desenvolvimento (aumento original X400); E, expressão perinuclear de ZEB1 no interstício do botão terminal da glândula salivar em desenvolvimento (aumento original X400); F, expressão de ZEB1 no interstício da glândula salivar normal (aumento original X400).

4.3.4 c-kit

Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade para c-kit foi observada nas células epiteliais e nos ductos neoplásicos; nas células mioepiteliais não houve expressão da proteína. Nos casos de CAC as células epiteliais e ductos neoplásicos apresentaram uma forte positividade; nas células mioepiteliais a proteína não foi expressa. Já para os casos de carcinoma mucoepidermóide houve positividade em poucas células nos centros das ilhas tumorais em algumas células escamosas. Em estruturas ductiformes a expressão foi positiva e nas áreas com células intermediárias e em todo o restante do tecido não houve expressão de c-Kit. Nas amostras de glândula salivar em desenvolvimento e glândulas normais, a expressão foi praticamente negativa apresentando positividade focal apenas em estruturas ductais. Os resultados estão ilustrados na Figura 12.

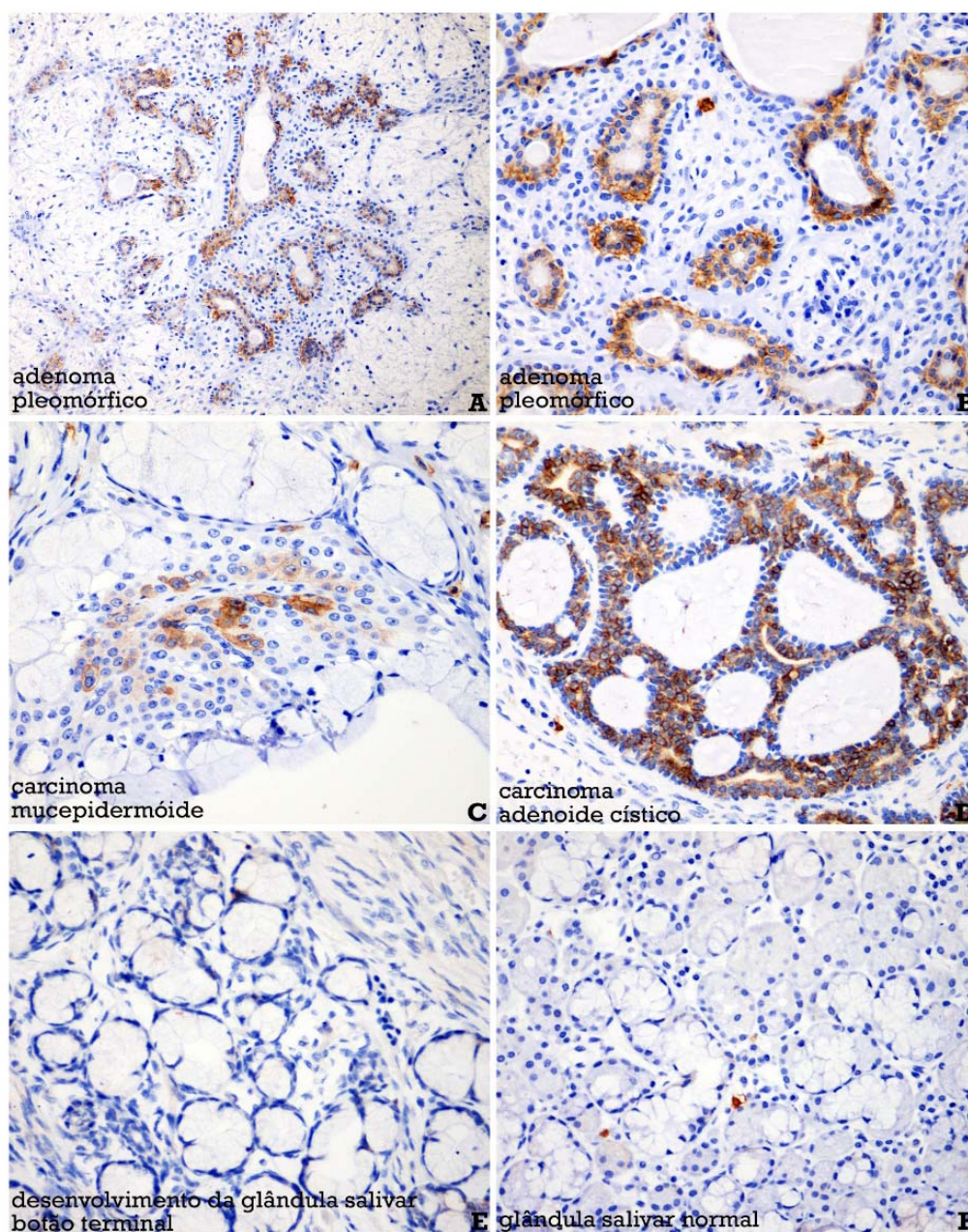


Figura 12 - Expressão da proteína c-kit em tumores de glândula salivar. A, ductos neoplásicos positivos para c-Kit e células mioepiteliais negativas no adenoma pleomórfico (aumento original X200); B, c-Kit expressa nos ductos e células epiteliais neoplásicas e células mioepiteliais negativas (aumento original X400); C, carcinoma mucoepidermóide: positividade focal em raras células isoladas (aumento original X400); D, estrutura cribriforme do carcinoma adenoide cístico apresentando positividade para c-kit (aumento original X400); E, ausência de expressão de c-kit em botão terminal da glândula salivar em desenvolvimento (aumento original X400); F, positividade em raras células da glândula salivar normal (aumento original X400).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão de proteínas associadas ao processo de transição epitélio-mesênquima (EMT) utilizando a técnica de imunohistoquímica em amostras de adenoma pleomórfico, carcinoma adenóide cístico, carcinoma mucoepidermóide e glândulas salivares em desenvolvimento.

O adenoma pleomórfico é o tumor benigno mais comum. Apesar de apresentar uma lenta progressão, apresenta uma taxa de recorrência de 1 a 5% e também há o risco de transformação maligna, que pode ocorrer de 3% a 4% dos casos (MENDENHALL et al. 2008; LINGAM et al. 2011). O carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares e representa cerca de 5 a 15% de todos os tumores de glândula salivar (GOODE et al. 1998; KAYE 2006; SEETHALA 2009; BAI et al. 2012; MCHUGH et al. 2012). O carcinoma adenóide cístico (CAC) representa aproximadamente 10% dos tumores de glândula salivar e é caracterizado por progressão lenta, entretanto, com alta taxa de recidiva local e metástase à distância (EVESON 2005; LIU et al. 2012).

A compreensão dos mecanismos associados ao desenvolvimento das neoplasias é de extrema importância para se alcançar inovações nos tratamentos. Vários estudos têm demonstrado que o processo de transição epitélio-mesênquima promove diferenciação em tecidos epiteliais, sugerindo

um papel importante no processo metastático (THIERY et al. 2009; LAMOUILLE et al. 2013; NIETO et al. 2016).

A EMT, é um processo celular em que as células epiteliais perdem a adesão célula-célula e adquirem características mesênquimais, com habilidades migratórias importantes, em um processo natural e crucial no desenvolvimento embrionário e em processos de cicatrização (CÔME et al. et al. 2004; TELLEZ et al. 2011; YEUNG e YANG 2017). O mecanismo também pode auxiliar na progressão tumoral: quando as células tumorais passam pelo processo da EMT podem adquirir propriedades invasivas, resultando na criação de um microambiente favorável para o desenvolvimento e progressão tumoral (PEINADO et al. 2004; IWATSUKI et al. 2010).

Diversas vias de sinalização como TGF β , WNT, NOTCH, receptores de fatores de crescimento, HIF-1 α , IL-6/STAT têm sido implicadas na indução da EMT em condições fisiológicas (YEUNG e YANG 2017). Em resposta a esses estímulos, fatores de transcrição são ativados, promovendo a regulação do processo de EMT. Os principais fatores incluem a família SNAIL (SNAIL1 e SNAIL2), a família TWIST (TWIST1 e TWIST2), e a família (ZEB 1 e ZEB2). Os fatores SNAIL e ZEB são capazes de se ligar às sequências E-box na região promotora da E-caderina e reprimir a sua transcrição. Já TWIST reprime a transcrição de E-caderina indiretamente pela indução de SNAIL (CHEN et al. 2017; YEUNG e YANG 2017).

A **E-caderina** é uma glicoproteína de membrana que desempenha um papel importante na adesão célula-célula e morfogênese tecidual. A perda

da sua expressão pode levar à progressão tumoral, metástase e pior prognóstico em carcinomas humanos (IWATSUKI et al. 2010; KOURTIDIS et al. 2017).

A perda da expressão de E-caderina é o principal evento no processo de EMT (THIERY et al. 2009; IWATSUKI et al. 2010; YEUNG e YANG 2017). Diversos estudos têm demonstrado a perda da expressão de E-caderina associada ao pior prognóstico em tumores. DA SILVA et al. (2014) observaram a diminuição da expressão de E-caderina e aumento de expressão de β -catenina e vimentina associada a carcinoma epidermóide oral. ANGADI et al. (2016) descreveu perda de E-caderina associada à diminuição na expressão de β -catenina e aumento na expressão de N-caderina em carcinoma epidermóide oral. YI et al. (2016) observaram perda de E-caderina associada a alta taxa de recorrência em carcinoma hepatocelular.

Nossos resultados demonstram expressão da proteína E-caderina em todas as amostras de glândula salivar. Contudo, foi possível observar que há diminuição da expressão de E-caderina nas células mioepiteliais tanto nos casos de adenoma quanto nos casos de carcinoma adenóide cístico. As células mioepiteliais aceleram a diferenciação das células epiteliais e participam na formação da membrana basal, e são conhecidas também por suprimir a invasão tumoral (YE et al. 2017). TANG e ZHOU (2011), citado por YE et al. (2017, p.6) utilizaram marcadores específicos para identificar as células mioepiteliais em amostras de adenoma pleomórfico, tumores malignos e áreas próximas ao tumor e observaram que as células

mioepiteliais são menos abundantes em tumores malignos, já no adenoma pleomórfico as células mioepiteliais são mais abundantes, sugerindo que a disfunção das células mioepiteliais pode aumentar a gravidade da malignidade para os tumores de glândula salivar e que células mioepiteliais irregularmente diferenciadas podem acelerar o desenvolvimento dos tumores de glândula salivar.

Já estudo de JIA et al. (2015) descreveu que expressão de E-caderina foi significativamente menor em CAC quando comparado com tecidos normais de glândula salivar. Além disso, a ausência de expressão de E-caderina foi significativamente associada com invasão perineural e vascular e também metástase a distância nos pacientes portadores de CAC.

Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a expressão de E-caderina foi heterogênea demonstrando uma positividade maior nas células mucosas e uma perda focal em áreas epidermóides e de frente de invasão. DA CUNHA et al. (2016) observaram perda de E-caderina mais acentuada nas áreas de frente de invasão em carcinoma epidermóide de pênis. COSTA et al. (2015) também descreveram perda mais acentuada de E-caderina em áreas de frente de invasão no carcinoma epidermóide oral, associada a tumores mais invasivos.

A proteína **Twist** é um fator de transcrição da família *basichelix-loop-helix* (bHLH). Alta expressão de Twist tem sido inversamente correlacionada à expressão de E-caderina (FENG et al. 2012; NOROZI et al. 2016). A ativação de Twist, além da perda de expressão de E-caderina, pode levar à

desregulação de diversas outras proteínas, como indução de N-caderina, BCL2 e β -catenina e inibição de p53 e p14 (KHAN et al. 2013).

Em nosso estudo observamos que a proteína Twist foi amplamente expressa em padrão nuclear nos tumores estudados. Contudo, não observamos diminuição da expressão de E-caderina. NIU et al. (2007) também descreveram aumento de expressão de Twist sem associação com a diminuição da expressão de E-caderina: foi observado aumento da expressão de VEGF, aumento da densidade de microvasos e aumento da expressão de N-caderina, sugerindo um importante papel de Twist na angiogênese e metástase do carcinoma hepatocelular.

Aumento da expressão da proteína Twist é frequentemente descrito em câncer de mama, sendo considerado um fator importante na resistência a hormônio, por estar associado à perda da atividade do receptor de estrógeno (VESUNA et al. 2012; MATYSIAK et al. 2017). Estudo de ZANG et al. (2017) em carcinoma epidermóide de esôfago demonstrou que a proteína Twist pode induzir as células a iniciar o processo de EMT levando a radorresistência adquirida. Expressão aumentada da proteína é associada à ocorrência de metástase, por meio da migração e invasão.

YANG et al. (2010) demonstraram, em linhagens celulares de carcinoma de cabeça e pescoço, que a proteína TWIST era um alvo da via HIF-1 α e que a inibição da expressão de TWIST em camundongos diminuía o número de nódulos metastáticos após a injeção de uma linhagem de tumor de hipofaringe com super expressão de HIF-1 α . Em tumores de cabeça e pescoço também foi observado que aumento de expressão de Twist e Bmi1

estava associado à diminuição da expressão de E-caderina e pior prognóstico. Essas proteínas, além de contribuir para o processo de EMT, também estão associadas à manutenção das células tronco (YANG et al. 2010; WU e YANG 2011).

Em nosso estudo a expressão de ZEB-1 foi observada principalmente na região perinuclear nas células tumorais, e expressão nuclear nas células do estroma. A positividade de ZEB-1 no estroma já foi descrita em outros tipos tumorais, como câncer de mama, bexiga, pulmão e colorretal, sugerindo que a sinalização parácrina de ZEB-1 poderia mediar a repressão de E-caderina (GEMMILL et al. 2011; GOSCINSKI et al. 2015).

No estudo de JANG et al. (2015), a expressão de ZEB1 em células tumorais foi descrita como um fator prognóstico independente para a sobrevida livre de doença em pacientes com câncer de mama triplo-negativo.

Estudos têm demonstrado que, em tumores sólidos, β -cateninaco-localiza com ZEB1 no núcleo de células tumorais indiferenciadas no fronte de invasão (SÁNCHEZ-TILLÓ et al. 2011). Estudo em linfoma demonstrou positividade de ZEB-1 associada a pior sobrevida, sendo que a associação com a expressão da proteína β -catenina ativada contribuiu para progressão tumoral e resistência a quimioterapia (SÁNCHEZ-TILLÓ et al. 2014). Em adição a um importante papel físico na adesão celular, a E-caderina desempenha um papel central na sinalização da via Wnt, interagindo com a proteína β -catenina. A β -catenina atua de duas maneiras diferentes dependendo da sua localização celular: quando a β -catenina está livre no

citoplasma ela atua na adesão e quando a localização é nuclear atua como um fator de transcrição (NATARAJAN, et al. 2014). Durante a transdução de sinal Wntless/Wnt a β -catenina se acumula no citoplasma e é translocada para o núcleo, associando-se ao fator TCF/Lef e promovendo a transcrição gênica (ZARAVINOS 2015).

A via de sinalização Wnt/ β -catenina também está ativa em células que demonstram um fenótipo de EMT *in vivo*, caracterizado por diferenciação celular e/ou aumento da motilidade celular, invasão e sobrevivência celular. Os fatores de transcrição SNAIL1 (SNAI1), SLUG (SNAI2) e ZEB1 (ZEB1), repressores da proteína E-caderina, podem ser induzidos direta e/ou indiretamente por essa via de sinalização levando a um aumento na motilidade celular e invasão (STRILLACCI et al. 2013). A via Wnt também desempenha um papel importante na regulação do desenvolvimento e na regulação da função de célula-tronco (YU et al. 2012).

A proteína **c-KIT** é um receptor de tirosina quinase e o seu ligante é o SCF (do inglês, *stem cell factor*). Além do papel na regulação de processos relacionados ao desenvolvimento, a ligação de c-kit ao SCF, pode induzir vias de sinalização envolvidas com a manutenção de células progenitoras (CHENG et al. 2012). c-kit desempenha um papel importante na proliferação e diferenciação de células tumorais e o aumento de sua expressão está associado à recorrência, invasão e metástase em diversos tumores (LENNARTSSON e RÖNNSTRAND 2012).

TANG et al. (2014) demonstraram que c-kit também pode induzir a expressão de fatores que estimulam a EMT e a sua expressão também é

induzida por fatores que controlam a EMT como TGF- β em carcinoma adenóide cístico.

Nossos resultados demonstram expressão de c-kit nas áreas ductais em adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico. Já os casos de carcinoma mucoepidermóide apresentaram positividade em raras áreas. Já TANG et al. (2010) demonstraram expressão aumentada de c-kit em tumores de glândulas salivares menores em comparação com tumores nas glândulas salivares maiores. Também observaram maior expressão de c-kit em pacientes em estágio III/IV quando comparados com pacientes em estágio I/II, sugerindo que a expressão de c-kit possa estar relacionada com o desenvolvimento tumoral em CAC. Expressão de c-kit estava associada à expressão de Slug.

TAN et al. (2015), em um estudo de adenocarcinoma colorretal mucinoso, sugerem que a ativação do c-Kit apresenta uma associação com pior prognóstico. A expressão aberrante de c-Kit poderia estar envolvida nos processos de proliferação celular e invasão nesses tumores. O potencial invasivo estava associado à diminuição da expressão de E-caderina e/ou aumento de vimentina, sugerindo a ocorrência de EMT. PENG et al. (2015), utilizando modelo animal, demonstraram expressão aberrante do c-kit em adenocarcinoma de próstata, sugerindo que o aumento de expressão de c-kit esteja envolvido no processo de proliferação e invasão.

Na indução da EMT três famílias de fatores de transcrição são fundamentais. Essas famílias são: as proteínas dedo de zinco (Snail e Slug), dedo de zinco com homeodomínio (ZEB1 e ZEB2) e *helix loop helix* (Twist 1

e 2). Estes fatores se ligam à região promotora da E-caderina e recrutam vários co-repressores que promovem o silenciamento gênico da E-caderina (LEE e KONG 2016). Apesar de observarmos uma expressão ampla das proteínas Twist e ZEB1, observamos a perda da E-caderina apenas em algumas áreas pontuais dos diferentes tumores (células mioepiteliais no AP e CAC e frente de invasão no MEC). Dessa forma, outros fatores estão provavelmente regulando a expressão da E-caderina nesses tumores.

Os mecanismos moleculares e celulares envolvidos na regulação da EMT são complexos e podem ser iniciados por diferentes sinais extracelulares, como por exemplo, TGF- β , WNT, NOTCH, que não foram avaliados nesse estudo. Diversos microRNAs têm sido descritos como reguladores dos fatores de transcrição que controlam o processo de EMT (LAMOUILLE et al. 2013; DÍAZ-LOPÉZ et al. 2014). Expressão de microRNAs membros da família miR-200 tem sido associada ao fenótipo epitelial de células tumorais, sendo considerada um marcador de células E-caderina⁺/vimentina⁻. A diminuição da expressão dos miRNAs da família miR-200 durante o processo de EMT está associada à repressão da atividade dos membros da família dos fatores de transcrição ZEB e a restauração da expressão do miR-200c é capaz de restituir a expressão de E-caderina e restabelecer o fenótipo epitelial em várias linhagens celulares tumorais (BRACKEN et al. 2008; BURK et al. 2008; IWATSUKI et al. 2010; D'AMATO et al. 2013; FENG et al. 2014). Um outro exemplo é o do miR-9, capaz de regular diretamente a E-caderina conforme demonstrado em linhagens de câncer de mama (D'AMATO et al. 2013; DÍAZ-LOPÉZ et al.

2014). O miR-138 pode suprimir a expressão de vimentina e ZEB2 assim como pode também inibir EZH2, responsável pelo silenciamento de E-caderina (D'AMATO et al. 2013). Já o miR-34a é bem estabelecido como supressor tumoral e tem sido associado à regulação de Snail, Slug e ZEB-1 (LAMOUILLE et al. 2013; DÍAZ-LOPÉZ et al. 2014).

Cabe ressaltar que em nosso estudo não foi possível a realização de análise de associação entre a expressão das proteínas e características clínicas, demográficas e patológicas dos tumores visto que foi observada ampla expressão das proteínas avaliadas nos tumores.

De forma geral, observamos a expressão das proteínas E-caderina, Twist, ZEB1 e c-kit nos tumores de glândula salivar. Perda da expressão dessas proteínas foi observada pontualmente e outros estudos são necessários para melhor esclarecer o papel do processo de EMT na morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares.

6 CONCLUSÕES

A proteína E-caderina foi expressa em todas as amostras tumorais e também nas glândulas salivares em desenvolvimento e glândulas sem evidência de neoplasia em padrão de membrana

A proteína Twist foi expressa na maioria das amostras tumorais e nas glândulas salivares em desenvolvimento e glândulas sem evidência de neoplasia em padrão nuclear

A proteína ZEB1 foi expressa na maioria das amostras tumorais e nas glândulas salivares em desenvolvimento e glândulas sem evidência de neoplasia em padrão perinuclear. Expressão nuclear foi observada nas células do estroma

A proteína c-kit foi expressa nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico e glândulas sem evidência de neoplasias. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide e glândulas salivares em desenvolvimento foi observada rara expressão de c-kit

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncol** 2014; 49:845-53.

Alves ATNN, Soares FD, Silva Junior A, et al. Carcinoma adenóide cístico: revisão de literatura e relato de caso clínico. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 40:1-8.

Angadi PV, Patil PV, Angadi V, et al. Immunoexpression of epithelial mesenchymal transition proteins E-Cadherin, β -Catenin, and N-Cadherin in oral squamous cell carcinoma. **Int J Surg Pathol** 2016; 24:696-703.

Bai S, Clubwala R, Adler E, et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma: a multi-institutional review of 76 patients. **Head Neck Pathol** 2013; 7:105-12.

Bell D, Hanna EY. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. **Curr Oncol Rep** 2012; 14:166-74.

Bracken CP, Gregory PA, Kolesnikoff N, et al. A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. **Cancer Res** 2008; 68:7846-54.

Burk U, Schubert J, Wellner U, et al. A reciprocal repression between ZEB1 and members of the miR-200 family promotes EMT and invasion in cancer cells. **EMBO Rep** 2008; 9:582-9.

Chen C, Zimmermann M, Tinhofer I, Kaufmann AM, Albers AE. Epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem(-like) cells in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett** 2013; 338:47-56.

Chen T, You Y, Jiang H, Wang ZZ. Epithelial-mesenchymal transition (EMT): A biological process in the development, stem cell differentiation, and tumorigenesis. **J Cell Physiol** 2017 Jan 12. [Epub ahead of print]

Cheng M, Qin G. Progenitor cell mobilization and recruitment: SDF-1, CXCR4, α 4-integrin, and c-kit. **Prog Mol Biol Transl Sci** 2012; 111:243-64.

Côme C, Arnoux V, Bibeau F, Savagner P. Roles of the transcription factors snail and slug during mammary morphogenesis and breast carcinoma progression. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2004; 9:183-93.

Costa LC, Leite CF, Cardoso SV, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. **J Appl Oral Sci** 2015; 23:169-78.

da Cunha IW, Souza MJ, da Costa WH, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) phenotype at invasion front of squamous cell carcinoma of the penis influences oncological outcomes. **Urol Oncol** 2016; 34:433.e19-26.

da Silva SD, Morand GB, Alobaid FA, et al. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma. **Clin Exp Metastasis** 2015; 32:55-63.

D'Amato NC, Howe EN, Richer JK. MicroRNA regulation of epithelial plasticity in cancer. **Cancer Lett** 2013; 341:46-55.

De Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Nico MMS, Lourenco SV. Overview of human salivary glands: highlights of morphology and developing processes. **Anat Rec (Hoboken)** 2017; 300:1180-8.

Díaz-López A, Moreno-Bueno G, Cano A. Role of microRNA in epithelial to mesenchymal transition and metastasis and clinical perspectives. **Cancer Manag Res** 2014; 6:205-16.

Diepenbruck M, Christofori G. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and metastasis: Yes, no, maybe? **Curr Opin Cell Biol** 2016; 43:7-13.

Ellis GL, Auclair PL. **Tumors of the salivary gland**. Washington DC: Armed Forces institute of Pathology; 1996. p.39-143. (Atlas of tumor pathology 3rd series, fascicle 17).

Eveson JW. Salivary gland tumors. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **Pathology and genetics of head and neck tumours**. 3rd ed. Lyon: IARC; 2005. p.190-2.

Feng Z, Gan H, Cai Z, et al. Aberrant expression of hypoxia-inducible Factor 1 α , TWIST and E-cadherin is associated with aggressive tumor phenotypes in endometrioid endometrial carcinoma. **Jpn J Clin Oncol** 2013; 43:396-403.

Fu J, Zhang L, He T, et al. TWIST represses estrogen receptor-alpha expression by recruiting the NuRD protein complex in breast cancer cells. **Int J Biol Sci** 2012; 8:522-32.

Gemmill RM, Roche J, Potiron VA, et al. ZEB1-responsive genes in non-small cell lung cancer. **Cancer Lett** 2011; 300:66-78.

Gomes ANM. **Apoptose nas glândulas salivares humanas: avaliação de marcadores durante o processo de morfogênese da glândula**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Goscinski MA, Xu R, Zhou F, et al. Nuclear, cytoplasmic, and stromal expression of ZEB1 in squamous and small cell carcinoma of the esophagus. **Apmis** 2015; 123:1040-7.

Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. **Cancer** 1998; 82:1217-24.

Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. **Pathology** 2007; 39:305-18.

Guo F, Cogdell D, Hu L, et al. MiR-101 suppresses the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting ZEB1 and ZEB2 in ovarian carcinoma. **Oncol Rep** 2014; 31:2021-8.

Imani S, Hosseinifard H, Cheng J, Wei C, Fu J. Prognostic value of EMT-inducing transcription factors (EMT-TFs) in metastatic breast cancer: a systematic review and meta-analysis. **Sci Rep** 2016; 6:28587.

Iwatsuki M, Mimori K, Yokobori T, et al. Epithelial-mesenchymal transition in cancer development and its clinical significance. **Cancer Sci** 2010; 101:293-9.

Jang MH, Kim HJ, Kim EJ, Chung YR, Park SY. Expression of epithelial-mesenchymal transition-related markers in triple-negative breast cancer: ZEB1 as a potential biomarker for poor clinical outcome. **Hum Pathol** 2015; 46:1267-74.

Jia B, Liu H, Kong Q, Li B. Overexpression of ZEB1 associated with metastasis and invasion in patients with gastric carcinoma. **Mol Cell Biochem** 2012; 366:223-9.

Jia S, Wang W, Hu Z, et al. BDNF mediated TrkB activation contributes to the EMT progression and the poor prognosis in human salivary adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2015; 51:64-70.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8.

Kaye FJ. Emerging biology of malignant salivary gland tumors offers new insights into the classification and treatment of mucoepidermoid cancer. **Clin Cancer Res** 2006; 12:3878-81.

Khan MA, Chen HC, Zhang D, Fu J. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. **Tumour Biol** 2013; 34:2497-506.

Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. **Exp Cell Res** 2017 Apr 12. [Epub ahead of print]

Lamouille S, Subramanyam D, Blelloch R, Derynck R. Regulation of epithelial-mesenchymal and mesenchymal-epithelial transitions by microRNAs. **Curr Opin Cell Biol** 2013; 25:200-7.

Laurie SA, Licitra L. Systemic therapy in the palliative management of advanced salivary gland cancers. **J Clin Oncol** 2006; 24:2673-8.

Lee J-Y, Kong G. Roles and epigenetic regulation of epithelial–mesenchymal transition and its transcription factors in cancer initiation and progression. **Cell Mol Life Sci** 2016; 73:4643-60.

Lennartsson J, Rönnstrand L. Stem cell factor receptor/c-Kit: from basic science to clinical implications. **Physiol Rev** 2012; 92:1619-49.

Lima RA, Tavares MR, Dias FL, et al. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2005; 133:702-8.

Lingam RK, Daghir AA, Nigar E, Abbas SA, Kumar M. Pleomorphic adenoma (benign mixed tumour) of the salivary glands: its diverse clinical, radiological, and histopathological presentation. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2011; 49:14-20.

Liu HX, Grosse AS, Iwatsuki K, Mishina Y, Gumucio DL, Mistretta CM. Separate and distinctive roles for Wnt5a in tongue, lingual tissue and taste papilla development. **Dev Biol** 2012; 361:39-56.

Matysiak M, Kapka-Skrzypczak L, Jodłowska-Jędrych B, Kruszewski M. EMT promoting transcription factors as prognostic markers in human breast cancer. **Arch Gynecol Obstet** 2017; 295:817-25.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer** 2012; 118:3928-36.

Mcbride ML, Baillie J, Poland BJ. Growth parameters in normal fetuses. **Teratology** 1984; 29:185-91.

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Malyapa RS, Mendenhall NP. Salivary gland pleomorphic adenoma. **Am J Clin Oncol** 2008; 31:95-9.

Milano A, Longo F, Basile M, Iaffaioli RV, Caponigro F. Recent advances in the treatment of salivary gland cancers: emphasis on molecular targeted therapy. **Oral Oncol** 2007; 43:729-34.

Natarajan J, Chandrashekar C, Radhakrishnan R. Critical biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in the head and neck cancers. **J Cancer Res Ther** 2014; 10:512-8.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. **Cell** 2016; 166:21-45.

Niu RF, Zhang L, Xi GM, et al. Up-regulation of Twist induces angiogenesis and correlates with metastasis in hepatocellular carcinoma. **J Exp Clin Cancer Res** 2007; 26:385-94.

Norozi F, Ahmadzadeh A, Shahjahani M, Shahrabi S, Saki N. Twist as a new prognostic marker in hematological malignancies. **Clin Transl Oncol** 2016; 18:113-24.

Ogawa AI, Takemoto LE, Navarro PL, Heshiki RE. Salivary gland neoplasm. **Int Arch Otorhinolaringol** 2008; 12:409-18.

Peinado H, Portillo F, Cano A. Transcriptional regulation of cadherins during development and carcinogenesis. **Int J Dev Biol** 2004; 48:365-75.

Peinado H, Olmeda D, Cano A. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? **Nat Rev Cancer** 2007; 7:415-28.

Peng Y, Chen Q, Gu M, et al. Human stromal cells in the peripheral zone of the prostate promote tumorigenesis of prostatic cancer stem cells through up-regulation of C-Kit expression. **J Cancer** 2015; 6:776-85.

Qin Q, Xu Y, He T, Qin C, Xu J. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms. **Cell Res** 2012; 22:90-106.

Rajwar YC, Jain N, Bhatia G, Sikka N, Garg B, Walia E. Expression and significance of cadherins and its subtypes in development and progression of oral cancers: a review. **J Clin Diagnostic Res** 2015; 9:ZE05-ZE07.

Raubenheimer EJ, van Nickerk JP, Hauman CH. Salivary myoepithelium: distribution, structure, functions and pathologic proliferations. **J Dent Assoc S Afr** 1987; 42:631-7.

Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. **Microsc Res Tech** 1994; 27:25-45.

Regezi JA, Batsakis JG. Histogenesis of salivary gland neoplasms. **Otolaryngol Clin North Am** 1977; 10:297-307.

Roy BC, Kohno T, Iwakawa R, et al. Involvement of LKB1 in epithelial-mesenchymal transition (EMT) of human lung cancer cells. **Lung Cancer** 2010; 70:136-45.

Sánchez-Tilló E, de Barrios O, Siles L, Cuatrecasas M, Castells A, Postigo A. β -catenin/TCF4 complex induces the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-activator ZEB1 to regulate tumor invasiveness. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2011; 108:19204-9.

Sánchez-Tilló E, Fanlo L, Siles L, et al. The EMT activator ZEB1 promotes tumor growth and determines differential response to chemotherapy in mantle cell lymphoma. **Cell Death Differ** 2014; 21:247-57.

Seethala RR. An update on grading of salivary gland carcinomas. **Head Neck Pathol** 2009; 3:69-77.

Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. **Cancer Metastasis Rev** 2009; 28:151-66.

Stacy AJ, Craig MP, Sakaram S, Kadakia M. Δ Np63 α and microRNAs: leveraging the epithelial-mesenchymal transition. **Oncotarget** 2017; 8:2114-29.

Strillacchi A, Valerii MC, Sansone P, et al. Loss of miR-101 expression promotes Wnt/ β -catenin signalling pathway activation and malignancy in colon cancer cells. **J Pathol** 2013; 229:379-89.

Tan J, Yang S, Shen P, Sun H, Xiao J, Wang Y. C-kit signaling promotes proliferation and invasion of colorectal mucinous adenocarcinoma in a murine model. **Oncotarget** 2015; 6:27037-48.

Tang Y, Liang X, Zheng M, et al. Expression of c-kit and Slug correlates with invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2010; 46:311-6.

Tang Y, Fan Y, Jiang J, et al. C-kit induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to salivary adenoid cystic cancer progression. **Oncotarget** 2014; 5:1491-501.

Tellez CS, Juri DE, Do K, et al. EMT and stem cell-like properties associated with miR-205 and miR-200 epigenetic silencing are early manifestations during carcinogen-induced transformation of human lung epithelial cells. **Cancer Res** 2011; 71:3087-97.

Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. **Cell** 2009; 139:871-90.

Vesuna F, Lisok A, Kimble B, et al. Twist contributes to hormone resistance in breast cancer by down regulating estrogen receptor- α . **Oncogene** 2012; 31:3223-34.

Voulgari A, Pintzas A. Epithelial-mesenchymal transition in cancer metastasis: mechanisms, markers and strategies to overcome drug resistance in the clinic. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1796:75-90.

Wellner U, Brabletz T, Keck T. ZEB1 in pancreatic cancer. **Cancers (Basel)** 2010; 2:1617-28.

Wu KJ, Yang MH. Epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness: the Twist1-Bmi1 connection. **Biosci Rep** 2011; 31:449-55.

Yang MH, Hsu DS, Wang HW, et al. Bmi1 is essential in Twist1-induced epithelial-mesenchymal transition. **Nat Cell Biol** 2010; 12:982-92.

Ye P, Gao Y, Wei T, Yu G-Y, Peng X. Absence of myoepithelial cells correlates with invasion and metastasis of Carcinoma ex pleomorphic adenoma. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2017; 46:958-64.

Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. **Med Oncol** 2017; 11:28-39.

Yi C, Li B, BIN, Zhou CX. Bmi-1 expression predicts prognosis in salivary adenoid cystic carcinoma and correlates with epithelial-mesenchymal transition-related factors. **Ann Diagn Pathol** 2016; 22:38-44.

Yu Z, Pestell TG, Lisanti MP, Pestell RG. Cancer stem cells. **Int J Biochem Cell Biol** 2012; 44:2144-51.

0Zang C, Liu X, Li B, He Y, Jing S, He Y. IL-6 / STAT3 / TWIST inhibition reverses ionizing radiation- induced EMT and radioresistance in esophageal squamous carcinoma. **Oncotarget** 2017; 8:11228-38.

Zaravinos A. The regulatory role of microRNAs in EMT and cancer. **J Oncol** 2015; 2015:865816.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



A.C. Camargo
Cancer Center

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

São Paulo, 19 de junho de 2013.

A

Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo.

Aluna: Elen Alves de Souza (Doutorado).

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1578/11C

"Avaliação da transcrição epitélio-mesênquima durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 18/06/2013, tomaram conhecimento e aprovaram os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa de análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um afiliado ao temático intitulado "Avaliação de marcadores de apoptose durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas", registrado neste CEP sob nº 1578/11. O presente projeto afiliado será desenvolvido pela aluna de Doutorado *Elen Alves de Souza*.
- Projeto de Doutorado, datado de 15 de março de 2013.

Atenciosamente,

Dr. Antônio Hugo José Fróes Marques Campos
2º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa