

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA ASSOCIADA À VIA DE
SINALIZAÇÃO TGF β EM TUMORES DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

ÁGATHA NAGLI DE MELLO GOMES

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

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Co-Orientador: Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Gomes, Agatha Nagli de Mello

Avaliação da expressão gênica associada à via de sinalização TGF β em tumores de glândulas salivares / Ágatha Nagli de Mello Gomes - São Paulo, 2021.

71f.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia
Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

1. Glândulas Salivares. 2. Adenoma Pleomórfico. 3. Carcinoma Mucoepidermoide. 4. Carcinoma Adenoide Cístico. 5. Expressão Gênica.

CDU 616

DEDICATÓRIA

À minha orientadora Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo,

Por depositar sua confiança no meu trabalho, permitir a continuação dos meus estudos sob sua orientação e proporcionar meu amadurecimento acadêmico. Sou grata por todos os ensinamentos, pela paciência e disposição nos momentos em que precisei de ajuda. Obrigada por todas as oportunidades atribuídas e consentir minha participação em outros trabalhos científicos.

À minha co-orientadora Dra. Silvia Vanessa Lourenço,

Por continuar me auxiliando no desenvolvimento de projetos e publicações científicas, além de todas as sugestões ao longo da minha trajetória acadêmica.

À minha família e aos meus amigos,

Por acreditar no meu potencial e pelo incentivo aos estudos.

Aos pacientes,

Por acreditarem na pesquisa científica e cederem amostras para a realização de estudos como este.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Pedro Gomes e a minha mãe Efigênia Moreira, por serem compreensíveis nos momentos de ausência e sempre me apoiarem em todas as minhas decisões. Obrigada por todos os conselhos e esforços para ajudar a superar minhas dificuldades.

À minha irmã do coração Carmelita Moreira, por estar sempre ao meu lado e me amparar em situações de angústia, além de ser meu ombro amigo que me incentiva a não desistir dos meus sonhos até mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pelos meus afilhados Gabriel e Daniel.

Ao meu noivo Fábio Elias, pela paciência e apoio durante a minha trajetória acadêmica. Obrigada por ser compreensivo e me ajudar nos momentos de aflição, sendo otimista e me mostrando que sempre há o lado positivo das coisas. Obrigada pelo carinho de todos os dias e fazer parte da minha história. À Vera e ao Eduardo também por me receberem de braços abertos na sua família.

Aos meus amigos, “minha segunda família”, que deixaram os meus dias mais felizes e descontraídos. Sem dúvidas foram as melhores companhias, os melhores sorrisos e as melhores aventuras. Obrigada por tudo e a todos os meus amigos, em especial: Mell e William Zapparoli, Ana Paula e Rafael Moraes, Carlos Samico Junior, Natália Cruz, Irina Bobrovnitchaia e Mayara Botelho.

Ao nosso grupo carinhosamente chamado “*Saliva group*”, por todas as conversas, brincadeiras e risadas, permitindo que a nossa rotina ficasse mais leve. Obrigada Katia Klug Oliveira por ser prestativa, compartilhar dos seus conhecimentos e me auxiliar sempre quando precisei de ajuda. Obrigada Carolinne Oliveira, Pedro Garcia, Milena Antunes e Raísa Costa por todos os comentários relacionados ao pensamento científico que contribuíram com este trabalho.

Ao Dr. Fabio Albuquerque Marchi pelas análises de clusterização hierárquica e meta-análise.

À Fundação Antônio Prudente e ao CIPE, por toda infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho. Ao Biobanco pelo processamento e fornecimento das amostras. Agradeço também ao Serviço de Estatística, especialmente a Janaina Naiara Germano e a Bárbara Beltrame Bettim. Aos professores e funcionários que foram sempre muito atenciosos, em especial: Severino Ferreira, Luciana Pitombeira, Edna Bedani e Dr.

Rubens Chojniak. Obrigada à Comissão de Pós-graduação e a Suely Francisco, pela oportunidade de ser representante discente e atender as minhas sugestões para contribuir com o apoio ao aluno.

A Capes, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Gomes ANM. **Avaliação da expressão gênica associada à via de sinalização TGF β em tumores de glândulas salivares.** São Paulo; 2021. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

As glândulas salivares são estruturas formadas por um sistema de ductos e ácinos responsáveis por secretar saliva. Apesar de raros, os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas, sendo de difícil classificação e comportamento clínico diverso. A identificação de novos marcadores moleculares tem sido alvo de pesquisas para melhor compreensão e classificação dessas neoplasias, visto que a avaliação da expressão gênica e suas vias envolvidas permite identificar genes associados à regulação que modula o desenvolvimento neoplásico. Assim, novos achados podem direcionar a aplicação de novas técnicas para o diagnóstico, prognóstico e tratamento terapêutico. Contudo, pouco se sabe sobre a via de sinalização TGF β em neoplasias mais comuns em glândulas salivares, como: Adenoma Pleomórfico (AP), Carcinoma Mucoepidermoide (CME) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC). Diante disso, torna-se necessário ampliar a pesquisa de genes associados para a determinação de um painel de marcadores e, deste modo, fornecer informações que possam contribuir com o diagnóstico dessas neoplasias. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão gênica relacionada à via de sinalização TGF β por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (qPCR) destacando os marcadores *TGF β 1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTPB1* e *c-MYC*. Para tanto, foram selecionadas 13 amostras de AP, 17 de CME e 13 de CAC, além de 10 amostras de glândulas salivares não neoplásicas provenientes de cirurgias realizadas no A.C.Camargo Cancer Center no período do ano 2000 a 2015 e fornecidas pelo Biobanco de Tumores. Os resultados indicam que em pacientes com AP há aumento da expressão dos genes *TGF β 1*, *LTPB1*, *c-MYC* e *FBN1*, enquanto a expressão de *SMAD2* diminui quando comparados às amostras não neoplásicas. Em pacientes com CME, foi observada expressão aumentada dos genes *TGF β 1*, *ITGB6*, *FBN1* e *c-MYC* enquanto a expressão dos genes *SMAD2* e *SMAD4* diminui ao serem comparados às amostras não neoplásicas. Nos pacientes com CAC, foi observada expressão aumentada em quase todos os genes avaliados. Na análise de

clusterização hierárquica não foi possível classificar nas diferentes neoplasias de glândula salivar. Para a validação dos resultados de expressão gênica foi realizada uma meta-análise utilizando dados da literatura, sendo possível observar concordância nos valores de expressão dos genes *ITGB6*, *LTBP1* e *TGFβ1* em amostras de CME e dos genes *FBN1*, *ITGB6*, *LTBP1*, *c-MYC*, *SMAD2* e *SMAD4* nas amostras de CAC. Comparando-se a expressão dos genes entre os três tipos de neoplasias estudados, foi observado aumento de expressão dos genes *c-MYC*, *SMAD2* e *SMAD4* nos casos de CAC e aumento da expressão do gene *ITGB6* nos casos de CME. A análise de sobrevida demonstrou que, em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide foi observado que a ausência de linfonodo comprometido e ausência de recidiva estão associadas a melhor probabilidade de sobrevida global em 5 anos. Nossos resultados sugerem que a expressão diminuída dos genes *SMAD2* e *SMAD4* parece não interferir na regulação transcricional de *c-MYC*, especialmente no AP e CME. Considerando os genes *ITGB6*, *TGFβ1*, *LTBP1*, *FBN1* e *c-MYC* a expressão aumentada parece ser relevante para a regulação da via de sinalização no processo de tumorigênese. Sendo assim, este estudo contribui para um melhor entendimento da via de sinalização TGFβ em neoplasias de glândulas salivares, além de fornecer informações para o desenvolvimento de potenciais marcadores biológicos para essas neoplasias.

SUMMARY

Gomes ANM. **[Expression evaluation of genes associated with the TGF β signaling pathway in salivary gland tumors]**. São Paulo; 2021. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Salivary glands are structures formed by a system of ducts and acini responsible for secreting saliva. Although rare, salivary gland tumors comprise a heterogeneous group of lesions, presenting different histological features, difficult classification, and diverse clinical behavior. Identification of new molecular markers has been the subject of researchers for better comprehension and classification of these tumors, since gene expression evaluation and their signaling pathways allow the identification of genes associated with regulation that modulated tumor development. Therefore, new findings can direct the application of new technologies for diagnosis, prognosis, and therapeutic treatment. However, little is known about the TGF β signaling pathway in the most common salivary gland tumors, such as: Pleomorphic adenoma (PA), mucoepidermoid carcinoma (MEC), and adenoid cystic carcinoma (ACC). In addition, it is necessary to expand research of genes and associated genes for determining a panel of markers and, thus, provide information that could be contribute with the diagnostic of these neoplasms. The aim of this study is to evaluate the expression of genes associated with the TGF β signaling pathway by real-time RT-PCR (qPCR) highlighting the markers *TGF β 1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTPB1*, and *c-MYC*. For this purpose, 13 PA samples, 17 MEC samples, 13 ACC samples, and histologically normal salivary glands samples were selected from surgeries performed at A.C.Camargo Cancer Center between 2000 and 2015. These samples were provided by Tumor Biobank. The results indicate that PA patients presented an increased *TGF β 1*, *LTPB1*, *c-MYC*, and *FBN1* gene expression whereas *SMAD2* expression was decreased when compared to the normal samples. In MEC patients, increased expression of *TGF β 1*, *ITGB6*, *FBN1*, and *c-MYC* genes was observed whereas *SMAD2* and *SMAD4* genes presented decreased expression. In ACC patients, increased expression in almost all genes was observed. In hierarchical clustering analysis it was not possible to classify the different salivary gland tumors. For the validation of the gene expression results it was carried out a meta-analysis using the literature data,

being possible to observe an agreement in the expression values of the genes *ITGB6*, *LTBP1* and *TGF β 1* in MEC samples and *FBN1*, *ITGB6*, *LTBP1*, *c-MYC*, *SMAD2* and *SMAD4* in ACC samples. Comparing gene expression among the three tumor types studied it was observed higher expression of *c-MYC*, *SMAD2* and *SMAD4* genes in ACC cases and higher expression of *ITGB6* in MEC cases. Survival analysis demonstrated that, in MEC patients it was observed that absence of affected lymph nodes and absence of recurrence are associated with better overall survival in 5 years. Our results suggest that the decreased expression of *SMAD2* and *SMAD4* genes seems not to interfere with the transcriptional regulation of *c-MYC*, especially in PA and MEC. Considering *ITGB6*, *TGF β 1*, *LTBP1*, *FBN1* and *c-MYC* increased gene expression appears to be relevant for the regulation of the signaling pathway in tumorigenic process. Thus, this study contributes to a better understanding of TGF β signaling pathway in salivary gland tumors, apart from supplying information in development of potential biomarkers for these tumors.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Aspectos histológicos de glândulas salivares em desenvolvimento	2
Figura 2	Imagem ilustrativa da estrutura de uma glândula salivar	2
Figura 3	Aspectos morfológicos do Adenoma Pleomórfico	5
Figura 4	Aspectos morfológicos do Carcinoma Mucoepidermoide	7
Figura 5	Aspectos histológicos do Carcinoma Adenoide Cístico	9
Figura 6	Imagem ilustrativa da via de sinalização TGF β	12
Figura 7	Visão geral das etapas metodológicas desenvolvidas no estudo	17
Figura 8	Análise da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico	26
Figura 9	Análise da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide	27
Figura 10	Análise da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Carcinoma Adenoide Cístico	28
Figura 11	Análise de clusterização hierárquica de genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico (AP), Carcinoma Mucoepidermoide (CME) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC)	29
Figura 12	Expressão diferencial dos genes associados à via de sinalização TGF β em neoplasias de glândula salivar	43
Figura 13	Curva de sobrevida global em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide com ou sem linfonodo comprometido	44
Figura 14	Curva de sobrevida global em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide com ou sem recidiva	45
Figura 15	Curva de sobrevida em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide com expressão normal ou diminuída de <i>SMAD2</i>	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Descrição dos genes avaliados nos experimentos de qPCR: nome oficial, localização cromossômica, tamanho do amplificado e número do catálogo	20
Tabela 2	Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com Adenoma Pleomórfico	22
Tabela 3	Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide	23
Tabela 4	Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com Carcinoma Adenoide Cístico	24
Tabela 5	Expressão relativa dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico em comparação com amostras de glândulas salivares não neoplásicas	26
Tabela 6	Expressão relativa dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide em comparação com amostras de glândulas salivares não neoplásicas	27
Tabela 7	Expressão relativa dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Carcinoma Adenoide Cístico em comparação com amostras de glândulas salivares não neoplásicas	28
Tabela 8	Características gerais dos estudos selecionados da literatura para análise de meta-análise	31
Tabela 9	Validação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com dados da meta-análise em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico	32
Tabela 10	Associação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Adenoma Pleomórfico	34
Tabela 11	Associação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide	36

Tabela 12	Associação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Carcinoma Adenoide Cístico	39
Tabela 13	Comparação da expressão gênica associada a via de sinalização TGF β em casos de Carcinoma Mucoepidermoide (CME), Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) e Adenoma Pleomórfico (AP)	41

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µL	Microlitro
18S	RNA ribossomal
AP	Adenoma Pleomórfico
B2M	Beta 2-microglobulina
CAC	Carcinoma Adenoide Cístico
CDKN2A	Inibidor de cinase dependente de ciclina 2A
CDKs	Cinases dependentes de ciclina
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CME	Carcinoma Mucoepidermoide
c-MYC	MYC proto-oncogene
CRTC1/3*	<i>CREB Regulated Transcription Coactivator 1/3</i>
Ct*	<i>Cycle Threshold</i>
DNA	Ácido desoxiribonucleico
dNTP	Desoxinucleotídeos trifosfatados
DPC4*	<i>Deleted in pancreatic cancer locus 4</i>
E3	Ubiquitina ligase
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FBN1	Fibrilina 1
FC*	<i>Fold Change</i>
G1	“GAP1” intervalo delimitante entre mitose e síntese de DNA
GAPDH	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GS	Glândula salivar
HER2	Receptor do tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
HMG2A*	<i>High Mobility Group AT-hook2</i>
ITGB6	Integrina subunidade 6 beta
KCl	Cloreto de potássio
LAP	Peptídeo associado a latência

LLC*	<i>Large Latency Complex</i>
LTBP1	Ligação ao TGF β latente 1
M	Molar
MAML2*	<i>Mastermind Like Transcriptional Coactivator 2</i>
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	Milimolar
MYB	MYB proto-oncogene
N/A	Não avaliado
NOTCH1	Notch receptor 1
pH	Potencial hidrogeniônico
PLAG1	Gene 1 do Adenoma Pleomórfico
pb	Pares de bases
pRB	Proteína do retinoblastoma
qPCR*	<i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Rotação por minuto
Rq	Expressão relativa
RT-PCR*	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatístico
SLC*	<i>Small Latency Complex</i>
SMAD 2/4	Família SMAD membro 2/4
TGFβ	Fator transformador de crescimento β
TGFβR	Receptor do fator transformador de crescimento β
TP53	Gene da proteína de tumor
Tris HCl	Hidroximetil amino metano/Cloreto de hidrogênio
vs.	Versus

* Siglas ou abreviaturas derivadas do inglês

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Desenvolvimento das glândulas salivares	1
1.2	Neoplasias de glândulas salivares.....	3
1.2.1	Adenoma Pleomórfico (AP)	4
1.2.2	Carcinoma Mucoepidermoide (CME)	5
1.2.3	Carcinoma Adenoide Cístico (CAC)	7
1.3	Alterações moleculares em neoplasias de glândulas salivares	9
1.3.1	Via de sinalização TGF β	10
1.4	Justificativa	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos gerais	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Casuística	17
3.2	Análise da expressão gênica	18
3.2.1	Extração do RNA total.....	18
3.2.2	Síntese do cDNA.....	18
3.2.3	Amplificação por RT-PCR em tempo real (qPCR).....	19
3.3	Análise de clusterização hierárquica	20
3.4	Validação da expressão gênica: Meta-análise	21
3.5	Análise estatística	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Características Demográficas, Clínicas e Patológicas	22
4.1.1	Análise da expressão gênica	25
4.2	Análise de clusterização hierárquica	29
4.3	Validação da expressão gênica: Meta-análise.....	30

4.4	Análise estatística	33
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54

ANEXOS

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

1 INTRODUÇÃO

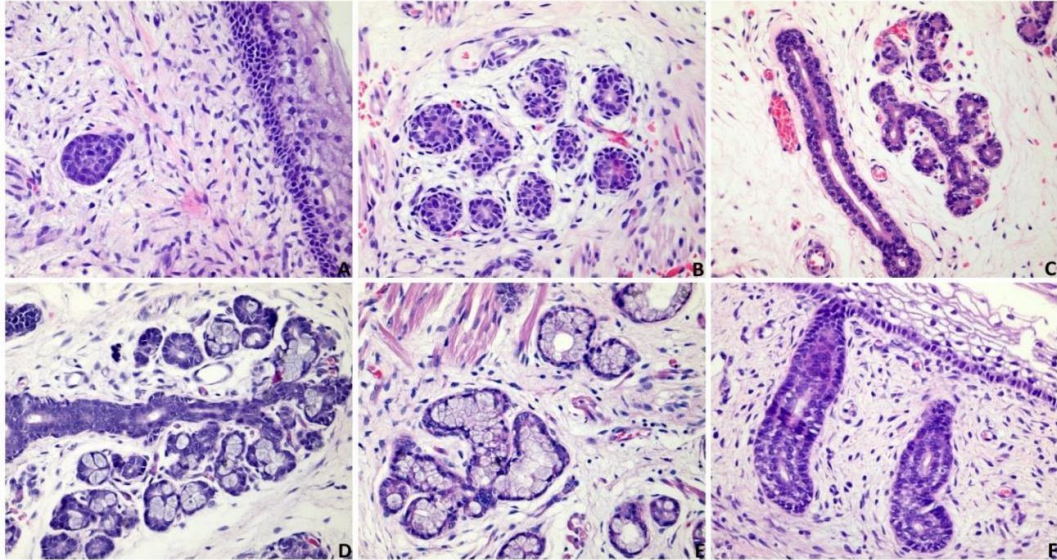
1.1 DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são estruturas exócrinas complexas responsáveis por secretar saliva, fundamental para a manutenção homeostática da cavidade oral (De Paula et al. 2017; Porcheri e Mitsiadis 2019; Suzuki et al. 2021). Sua estrutura funcional, o parênquima, é composta por um sistema de ductos e ácinos (Emmerson e Knox 2018). O estroma, constituído de tecido conjuntivo de suporte, mantém a sustentação do parênquima e supre as necessidades das glândulas pela presença de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (Dale 1994).

Além das glândulas menores dispersas pela cavidade oral humana – tais como as glândulas labiais, linguais, palatinas e do assoalho – existem três pares de glândulas salivares maiores: as glândulas parótida, submandibular e sublingual, que surgem ainda no período fetal (De Paula et al. 2017; Porcheri e Mitsiadis 2019; Suzuki et al. 2021). O desenvolvimento da glândula parótida inicia-se por volta de 4-6 semanas de vida embrionária; a glândula submandibular em torno de 6 semanas e a glândula sublingual e glândulas salivares menores iniciam-se em torno de 8-12 semanas de vida intrauterina (Cutler 1990; Dale 1994; Lourenço e Kapas 2005; Lourenço et al. 2008). As estruturas funcionais das glândulas salivares são originadas pelo mecanismo de morfogênese que envolve crescimento, proliferação, diferenciação, migração e morte celular, além da citodiferenciação em que as células assumem funções especializadas (Melnick e Jaskoll 2000; Patel et al. 2006, 2011; De Paula et al. 2017; De Mello Gomes et al. 2019).

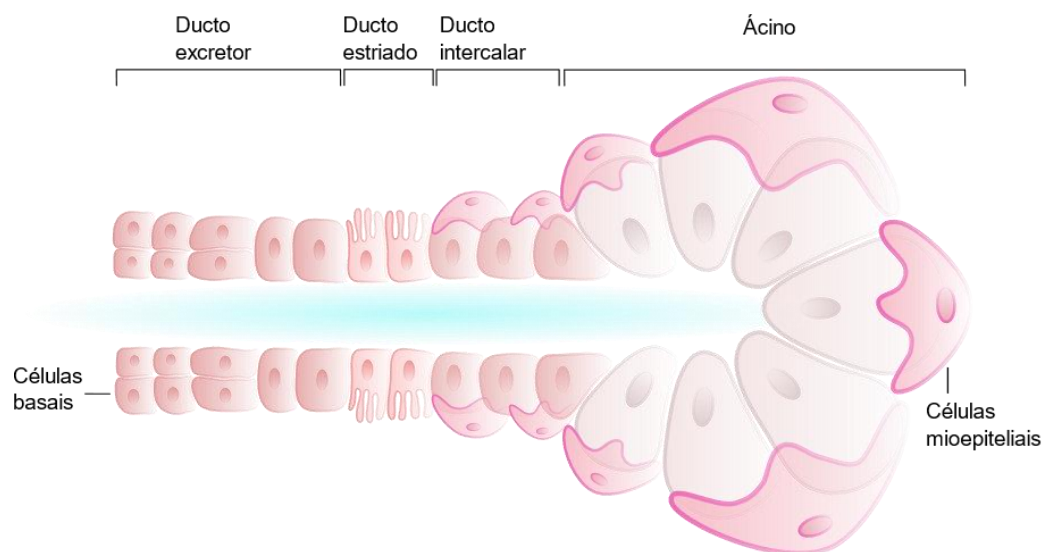
TUCKER 2007, utilizando um modelo animal, descreveu a morfogênese da glândula salivar em cinco estágios: pré-botão, botão inicial, pseudoglandular, canalicular e botão terminal. Em humanos o desenvolvimento é similar: a partir da cavidade oral primitiva botões sólidos de células epiteliais se proliferam e internalizam formando cordões e, durante o desenvolvimento, as células centrais são degeneradas para a origem do futuro sistema ductal (Ianez et al. 2010; Teshima et al. 2016; De Paula et al. 2017; Emmerson e Knox 2018; De Mello Gomes et al. 2019; Suzuki et al. 2021) (Figura 1). Os ductos são compostos por três unidades diferentes: ductos excretores e estriados envolvidos por células basais, além dos

ductos intercalares envolvidos por células mioepiteliais (Tucker 2007; Ianez et al. 2010; Adams et al. 2013; De Paula et al. 2017; Suzuki et al. 2021) (Figura 2).



Fonte: De Mello Gomes et al. 2019

Figura 1 – Aspectos histológicos de glândulas salivares em desenvolvimento. A e B, fase inicial do desenvolvimento: botões de células; C, fase pseudoglandular com cordões epiteliais ramificados; D, fase de transição canalicular/botão terminal; E, fase de botão terminal com estruturas acinares desenvolvidas; F, ducto excretor desembocando na mucosa (aumento original A-F = 400x).



Fonte: Adaptado de Adams et al. 2013

Figura 2 – Imagem ilustrativa da estrutura de uma glândula salivar. Diagrama ilustrativo da estrutura de uma glândula salivar identificada por cada elemento e as células envolvidas em sua composição.

1.2 NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Segundo o projeto Globocan 2020 da Organização Mundial de Saúde, em relação a 36 diferentes tipos de câncer em 185 países, estima-se que apenas 0,3% correspondem a novos casos de neoplasias de glândulas salivares (Sung et al. 2021). Apesar de menos frequentes, as neoplasias de glândulas salivares apresentam grande variabilidade morfológica e, além disso, a desdiferenciação celular pode confundir a classificação histopatológica comprometendo a interpretação diagnóstica (Barnes et al. 2005; Bradley 2016a; Seethala 2017). Com comportamento clínico diverso, esse grupo heterogêneo e amplo de lesões tem sido um desafio para a comunidade científica na tentativa de categorizar universalmente os subtipos de algumas neoplasias (Barnes et al. 2005; Bradley 2016a; Seethala 2017; Badlani et al. 2018; Skálová et al. 2018; Peraza et al. 2020).

Correspondendo a cerca de 3% a 6% das neoplasias de cabeça e pescoço, as neoplasias de glândulas salivares são classificadas em benignos (Adenoma Pleomórfico, Tumor de Warthin, Cistadenoma, Adenoma Canalicular, entre outros) e malignos (Carcinoma Mucoepidermoide, Carcinoma Adenoide Cístico, Carcinoma de Células Acinares, Carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico, entre outros) (Bradley 2016b; Badlani et al. 2018; Gatta et al. 2020; Porcheri et al. 2020). As glândulas salivares maiores, principalmente a glândula parótida, são os sítios anatômicos mais acometidos pela manifestação das diferentes neoplasias (Rapidis et al. 2007; De Oliveira et al. 2009; Di Villeneuve et al. 2020; Porcheri et al. 2020), enquanto nas glândulas salivares menores o sítio mais comumente afetado é o palato (Dossani et al. 2016; Goel et al. 2018; Porcheri et al. 2020).

A estratégia de tratamento padrão para as neoplasias de glândulas salivares é a excisão cirúrgica, sendo recomendada radioterapia pós-operatória para alguns pacientes e nos casos inoperáveis ou de recusa do procedimento cirúrgico. A quimioterapia é indicada apenas em casos clínicos individuais que apresentam recidiva inoperável, metástases, não passíveis à radioterapia ou de maneira paliativa (Guzzo et al. 2010; Gatta et al. 2020).

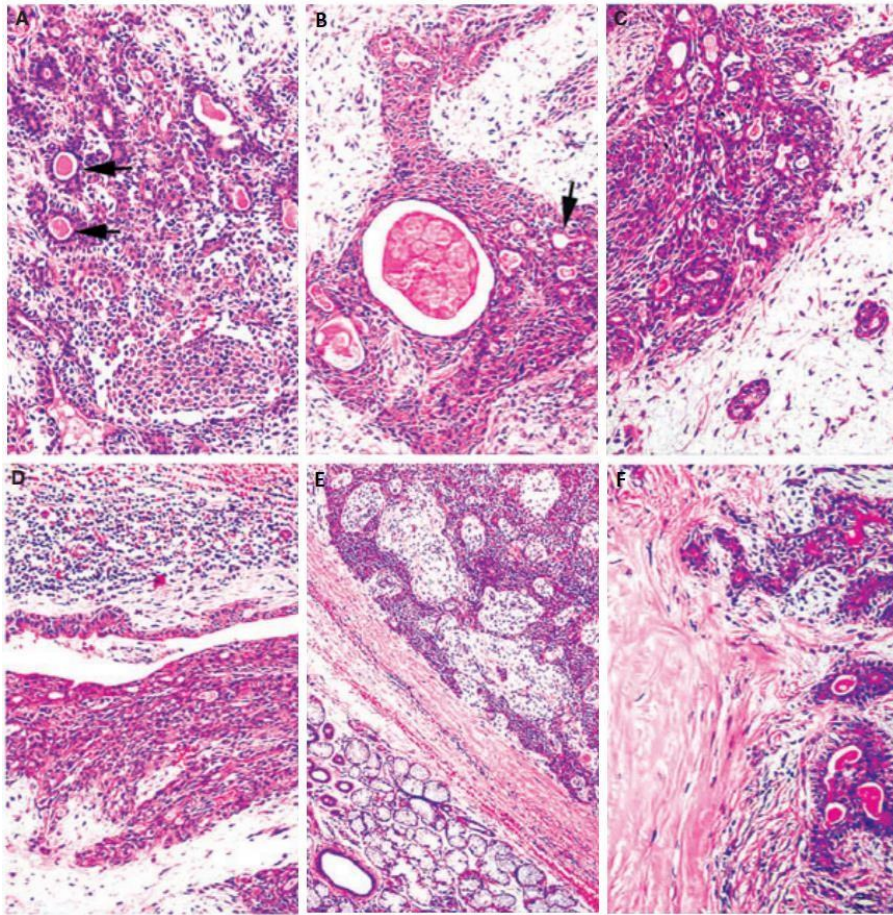
1.2.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO (AP)

A maioria das neoplasias de glândulas salivares é classificada como benigna, sendo o Adenoma Pleomórfico (AP) o mais frequente correspondendo a quase 70% dos casos registrados (Van Der Wal et al. 1998; Barnes et al. 2005; Porcheri et al. 2020;). A glândula parótida é a mais frequentemente acometida por esse tipo de neoplasia (Lingam et al. 2011; Lopes et al. 2017).

Do ponto de vista clínico, trata-se de uma massa nodular circunscrita encapsulada com tamanhos variáveis, crescimento lento e indolor (Barnes et al. 2005). A etiologia do AP é apoiada principalmente na teoria em que as células tronco sejam as precursoras do desenvolvimento neoplásico, localizadas nos ductos intercalares das glândulas salivares (Porcheri e Mitsiadis 2019). A aparência típica bifásica é resultante da mistura dos componentes epiteliais e estromais. Quanto aos aspectos histológicos, são variados por exibir diferentes proporções entre células ductais (epiteliais) e mioepiteliais (Jain et al. 2015; Lopes et al. 2017; Valstar et al. 2017; Porcheri et al. 2020). Apresenta elementos epiteliais dispersos por toda a matriz, com graus variados de tecido condróide (cartilaginoso), hialino, mixóide e até mesmo ósseo (Ianez et al. 2013; Alaizari et al. 2015; Jain et al. 2015) (Figura 3).

O tratamento comumente utilizado é a excisão cirúrgica (Abu-Ghanem et al. 2016; Bradley 2018). Já foram relatadas taxa de recorrência dessas neoplasias de até 15% (Zhang et al. 2009) a qual pode estar associada à cirurgia (Bradley 2018). Mesmo visto como raro, a transformação maligna pode ocorrer em 4% dos casos considerados altamente agressivos e de potencial metastático, que passa a ser chamado carcinoma ex-Adenoma Pleomórfico (Lingam et al. 2011; Abu-Ghanem et al. 2016; Porcheri et al. 2020).

Embora o AP se desenvolva em lenta progressão, a ausência de tratamento pode causar morbidade significativa e, por consequência, a transformação maligna. Os fatores de risco ainda não estão bem estabelecidos, no entanto, a exposição à radiação aumenta a probabilidade de desenvolvimento da doença (Mendenhall et al. 2008). Também há relatos de predominância do gênero feminino, principalmente entre a 3ª e a 4ª décadas de vida (Lopes et al. 2017).



Fonte: Adaptado de Ianez et al. 2013

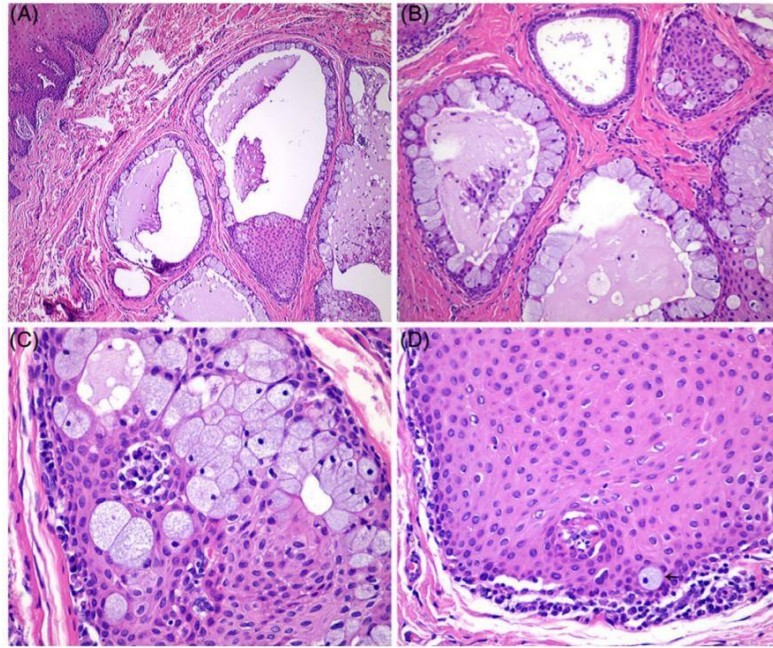
Figura 3 – Aspectos morfológicos do Adenoma Pleomórfico. A e B, células mioepiteliais e epiteliais envolvendo estruturas ductais neoplásicas (setas); C – E, células epiteliais e mioepiteliais dispostas em uma arquitetura compacta com estroma mixóide; F, presença de estroma hialino (aumento original A-F = 250x).

1.2.2 CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE (CME)

De todas as neoplasias de glândulas salivares cerca de 30% são malignos e o Carcinoma Mucoepidermoide (CME) é o mais comum compreendendo de 10 a 15% (Speight e Barrett 2002; Barnes et al. 2005; Coca-Pelaz et al. 2015a; Goel et al. 2018; Di Villeneuve et al. 2020). O sítio anatômico mais acometido por esse tipo de lesão é a glândula parótida (cerca de 80%) (Brandwein et al. 2001; McHugh et al. 2012; Coca-Pelaz et al. 2015a; Porcheri et al. 2020). Essa neoplasia deriva do ducto excretor e sua composição é variável entre células epidermóides, mucosas e intermediárias (Auclair et al. 1992; Brandwein et al. 2001; Barnes et al. 2005; McHugh et al. 2012; Porcheri e Mitsiadis 2019; Porcheri et al. 2020).

Clinicamente no CME é observado o aumento de volume de evolução lenta, normalmente assintomático, mas que esporadicamente algumas outras manifestações podem estar presentes como parestesia, ulceração superficial e dor (Auclair et al. 1992; Brandwein et al. 2001). Geralmente a primeira conduta de tratamento é a excisão cirúrgica e, dependendo da agressividade da neoplasia, pode ser necessária terapia adjuvante além da dissecação de linfonodos comprometidos (Brandwein et al. 2001; Coca-Pelaz et al. 2015a). O grau histológico é de suma importância prognóstica e no estabelecimento terapêutico, baseando-se nas características citológicas, formação arquitetural, presença de invasão perineural e necrose (Goode et al. 1998; Brandwein et al. 2001) (Figura 4). Pode ser classificado em: CME de baixo grau, CME de grau intermediário ou CME de alto grau (Goode et al. 1998; Brandwein et al. 2001; Seethala 2017).

A histopatologia do CME de baixo grau normalmente apresenta padrão de células escamosas circunscritas, numerosas células claras que podem conter mucina intracitoplasmática, presença de espaços císticos e manifestações clínicas menos agressivas (Brandwein et al. 2001; Porcheri et al. 2020). Por outro lado, o CME de grau intermediário exhibe estruturalmente um padrão menos cístico, irregular, folhas de células escamosas, população de células intermediárias proeminentes e comportamento biológico incerto sendo geralmente classificado como CME de alto grau (Brandwein et al. 2001; Aro et al. 2008; Porcheri et al. 2020). O CME de alto grau tem comportamento totalmente agressivo, infiltrativo, com escassa produção de mucina, predominantemente sólido e a presença de atipia nuclear pode ser notada (Brandwein et al. 2001; Porcheri et al. 2020). No geral, a taxa de sobrevivência global em 10 anos é cerca de 53% (Rinaldo et al. 2003).



Fonte: Adaptado de Da Silva et al. 2019

Figura 4 – Aspectos morfológicos do Carcinoma Mucoepidermoide. A, presença de células mucosas, células intermediárias e células escamosas (aumento original = 40x); B, presença de células mucosas que cercam a mucina em espaços císticos; C, ilhas de células mucosas entrelaçadas com células intermediárias; D, células escamosas envolvendo uma célula mucosa (seta) (aumento original B-D = 200x).

1.2.3 CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO (CAC)

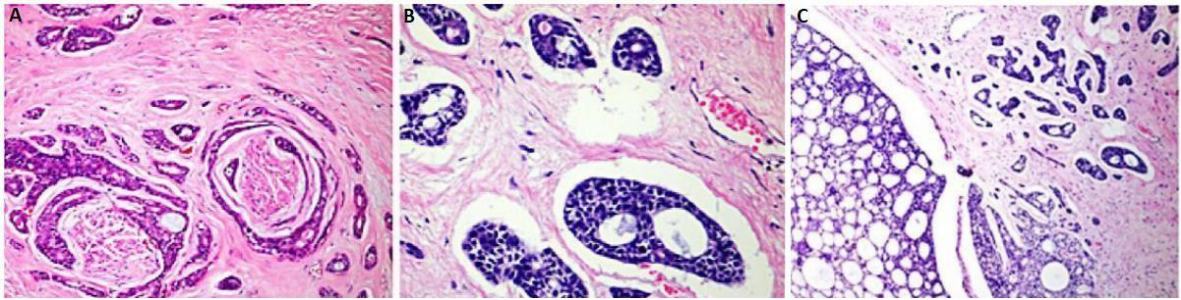
Considerada a segunda neoplasia maligna mais comum em glândulas salivares acometendo cerca de 7% dos casos (Barnes et al. 2005; Adelstein et al. 2012; Luksic e Suton 2019; Di Villeneuve et al. 2020; Porcheri et al. 2020), o Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) pode desenvolver em diferentes estruturas anatômicas sendo as mais comuns glândulas salivares menores, parótida e submandibular (Barnes et al. 2005; Coca-Pelaz et al. 2015b; Seethala 2017; Bahl et al. 2019; Porcheri et al. 2020).

O comportamento clínico apresenta crescimento lento e infiltrativo com aumento de volume ou nódulo lobulado de consistência firme (Barrett e Speight 2009; Dubal et al. 2016; Seethala 2017), além das múltiplas recorrências locais e metástases (Bhayani et al. 2012; Dubal et al. 2016; He et al. 2017; Luksic e Suton 2019; Di Villeneuve et al. 2020). Outras manifestações também podem ser notadas como parestesia e dor (Barrett e Speight 2009; Dubal et al. 2016). A origem do CAC é nas células ductais e mioepiteliais provenientes dos

ductos intercalares e apresenta três padrões distintos: cribriforme, tubular e sólido (Barnes et al. 2005; Coca-Pelaz et al. 2015b; Seethala 2017; Luksic e Suton 2019; Porcherl e Mitsiadis 2019; Porcheri et al. 2020).

A histopatologia cribriforme é a mais prevalente, composta por ilhas de pequenas células agrupadas com núcleo basofílico, citoplasma claro e muitos espaços císticos. Na variante tubular são observadas estruturas semelhantes a ductos ou túbulos com lúmens bem definidos, revestidos por células epiteliais na parte interna e mioepiteliais na parte externa (Figura 5). Esses dois padrões apresentam um comportamento clínico indolente (Barnes et al. 2005; Bell e Hanna 2012; Coca-Pelaz et al. 2015b; Porcheri et al. 2020). Em contrapartida a forma sólida é caracterizada pelo crescimento em folhas, basicamente basalóides e discreta formação luminal ou de espaços císticos (Coca-Pelaz et al. 2015b; Porcheri et al. 2020). Está associado à perda de células mioepiteliais e grande atividade mitótica o que diferencia dos dois outros padrões, além de atribuir comportamento biológico mais agressivo (Bell e Hanna 2012; Porcheri et al. 2020).

No tratamento é adotada a ressecção cirúrgica com margem e radiação pós-operatória (Kokemueller et al. 2004; Chen et al. 2006; Bahl et al. 2019; Luksic e Suton 2019). Esta conduta pode ser útil no controle da doença após cirurgia ou no tratamento de recorrência local (Luksic e Suton 2019). Em geral, a neoplasia é pouco responsiva à quimioterapia (Adelstein et al. 2012; Coca-Pelaz et al. 2015b). A taxa de sobrevida global é em média 11 anos (Kokemueller et al. 2004).



Fonte: Adaptado de Nagano et al. 2016

Figura 5 – Aspectos histológicos do Carcinoma Adenoide Cístico. A, massa primária com aspecto cribriforme composto por células epiteliais e células mioepiteliais ao redor de um feixe de nervos (infiltração perineural); B, aspecto cribriforme com disseminação angiolinfática (êmbolos); C, massa primária com aspecto tubular e fibriforme (aumento original A-C = 250x).

Diante das dificuldades em classificar e diferenciar os tipos de neoplasias das glândulas salivares, diversos estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos da tumorigênese e os componentes das neoplasias derivadas dessas glândulas (Speight e Barrett 2002; Barnes et al. 2005; Kar et al. 2020). Um dos seguimentos de interesse são estudos que avaliam a expressão gênica e suas vias envolvidas, onde novos achados podem direcionar o desenvolvimento de novas técnicas aplicáveis para o diagnóstico e terapêutica (Seethala 2017; Kar et al. 2020).

1.3 ALTERAÇÕES MOLECULARES EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Em geral, o processo de tumorigênese envolve diversas etapas onde várias alterações moleculares acumuladas são responsáveis pela resistência das células neoplásicas. A ativação de genes encarregados pela proliferação celular e/ou a inativação de genes supressores de tumores são os principais mecanismos envolvidos durante o desenvolvimento neoplásico (Loeb e Loeb 2000; Loeb 2001).

As neoplasias de glândula salivar compõem um grupo heterogêneo de lesões com manifestações clínicas diversas (Skálová et al. 2018) e o diagnóstico apenas pela técnica imunoistoquímica pode ser questionada, visto que a sobreposição histológica e a variabilidade entre os tipos de neoplasias apresentam, em algumas situações, laudos

inconclusivos (Zhu et al. 2015; Griffith et al. 2017; Skálová et al. 2018). Diante dessa premissa, mutações gênicas tem sido parâmetro de fator prognóstico que podem contribuir na detecção das neoplasias nos estádios mais precoces e, além disso, também desempenhar um papel importante durante o seguimento dos pacientes (Belbin et al. 2005; Kar et al. 2020).

Alguns estudos abordam a investigação de perfis moleculares nas diferentes neoplasias de glândulas salivares como: gene *TP53* (Kiyoshima et al. 2001); *EGFR* e *HER2* (Yin e Ha 2016); *TGF α* entre outros genes (Gibbons et al. 2001). Em relação a alterações genéticas pontuais, por exemplo, apresentam rearranjos de *PLAG1* e *HMGA2* em Adenoma Pleomórfico, fusão de *CRTC1/3-MAML2* e deleção de *CDKN2A* em Carcinoma Mucoepidermoide, e fusão de *MYB/MYBL1* e mutação de *NOTCH1* em Carcinoma Adenoide Cístico (Rito e Fonseca 2018).

Sabe-se que a via de sinalização TGF β contribui para a manutenção homeostática de tecidos epiteliais e, em resposta a processos patológicos, continua a desempenhar funções importantes principalmente em relação a células pré-malignas como agentes supressores tumorais (Massagué 2012). Alteração na expressão de componentes da via do TGF β , especialmente *TGF β 1* e receptor de *TGF β* , já foi avaliada em algumas neoplasias de glândula salivar, sugerindo que essa via possa estar relacionada ao processo de tumorigênese das glândulas (Dillard et al. 2001; Lourenço et al. 2004; Lourenço e Lima 2007; Dong et al. 2011; Wang et al. 2011; Xu et al. 2016; Cao et al., 2018).

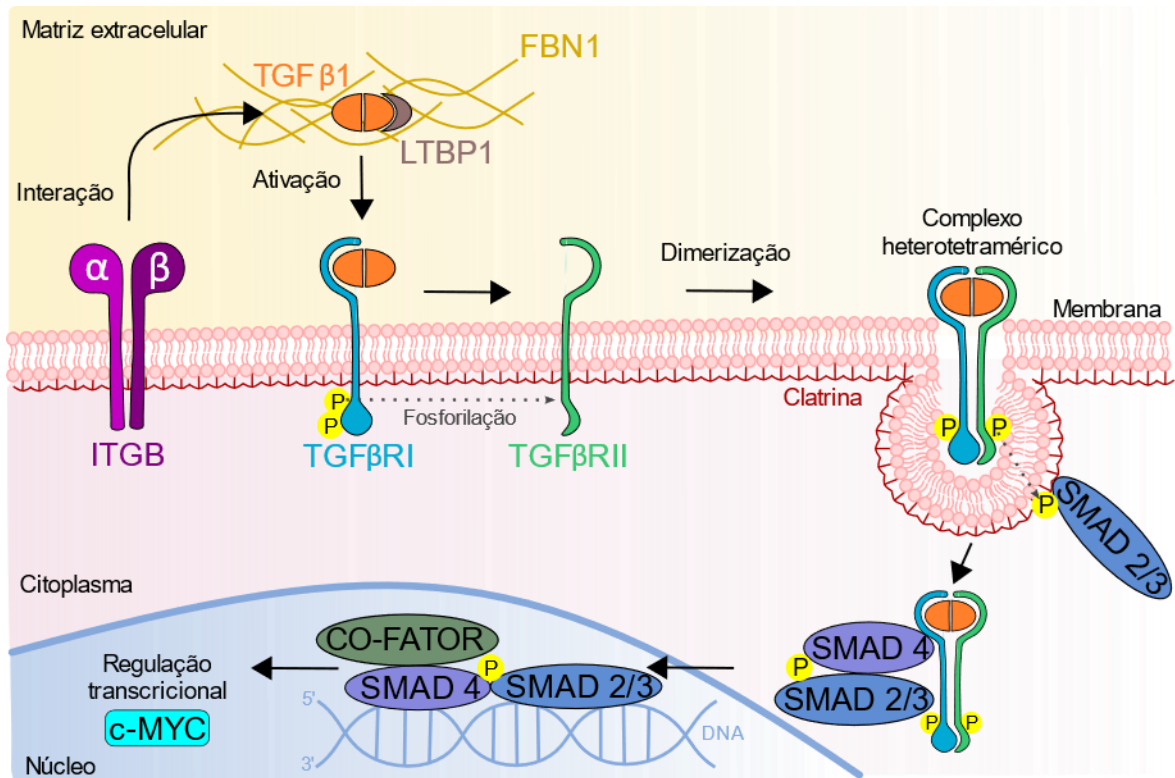
Nosso grupo já investigou o efeito do TGF β 1 na expressão da integrina em cultura de células derivadas de AP e CAC, indicando que são componentes importantes na diferenciação celular e estudos nessa linha de pesquisa podem ser úteis para melhor compreensão da biologia dessas lesões (Lourenço et al. 2004; Lourenço e Lima 2007). Contudo, não há relatos de uma avaliação abrangente sobre a expressão gênica associada à via de sinalização TGF β nesses tipos de neoplasias de glândulas salivares.

1.3.1 VIA DE SINALIZAÇÃO TGF β

A via de sinalização TGF β canônica é desencadeada inicialmente por estímulos das integrinas, que são moléculas transmembranas responsáveis pela adesão e migração celular,

onde uma extremidade se liga a componentes da porção citoplasmática e a outra extremidade se liga a componentes da matriz extracelular, permitindo assim a comunicação entre os dois meios intracelular e extracelular (Scaffidi et al. 2004; Takada et al. 2007; Huttenlocher e Horwitz 2011; Munger e Sheppard 2011; Tauriello et al. 2022). São importantes para a transdução de sinais, onde estímulos permitem sua interação com outras moléculas, como a fibrilina, que é essencial para a formação do tecido conjuntivo e compõe a matriz extracelular (Byers 2004; Chaudhry et al. 2007; Takada et al. 2007). A fibrilina se associa a moléculas latentes ligantes do TGF β e, quando associada ao TGF β , o mantém de forma latente (Todorovic et al. 2005; Rifkin et al. 2021). Para a atividade do TGF β é necessário que ocorra a dissociação do TGF β maduro do complexo latente, onde proteases fazem a clivagem do peptídeo associado a latência e promovem a ativação do TGF-beta (Wipff e Hinz 2008; Robertson et al. 2015; Tauriello et al. 2022).

Os membros da superfamília *TGF β* (do inglês *transforming growth factor β*) são fatores de crescimento que desempenham a função de comunicação intracelular ao se ligarem a receptores específicos de membrana (tipos I e II). Essa ligação promove a sinalização celular pela fosforilação do conjunto de proteínas SMADs no citoplasma, que estão envolvidas na transdução da sinalização intracelular dos ligantes da família TGFbeta ao núcleo (Kimura et al. 2007; Aashaq et al. 2021; Tauriello et al. 2022). Quando fosforiladas, essas proteínas vão para o núcleo e ativam ou reprimem a transcrição de diferentes genes, como o proto-oncogene c-MYC (Massagué et al. 2005; Weiss e Attisano 2013; Dhanasekaran et al. 2021; Tauriello et al. 2022) (Figura 6). Essa via de sinalização também é regulada negativamente pela ação da proteína inibitória SMAD7 e das enzimas E3 da via de proteólise mediada por ubiquitina (Heldin et al. 1997; Izzi e Attisano 2004; Kimura et al. 2007; Kumari et al. 2017; Aashaq et al. 2021).



Fonte: Adaptado de Budi et al. 2017 e Kang et al. 2009

Figura 6 – Imagem ilustrativa da via de sinalização TGFβ. Diagrama ilustrativo da via de sinalização TGFβ apresentando a interação entre *ITGB*, *TGFβ1* latente, *FBN1* e *LTBP*. Após o contato, ocorre o desencadeamento da via de sinalização pela ativação de *TGFβ1* que, ao se ligar ao receptor *TGFβRI*, permite a fosforilação de *TGFβRII* para a dimerização e formação do complexo heterotetramérico. A formação da vesícula endocítica envolvida por clatrina permite a internalização do complexo, promove o recrutamento de *SMAD2/3* citosólico e, ao ser fosforilado, *SMAD4* citosólico se associa a essas moléculas. Após a formação do heterodímero *SMAD2/3:SMAD4*, o complexo é direcionado ao núcleo e, em cooperação com outros fatores de transcrição, regula a expressão gênica envolvida na diferenciação celular como o gene *c-MYC*.

A via de sinalização TGFβ está envolvida em diversas funções da homeostase tecidual, inclusive na embriogênese, onde o equilíbrio na indução e repressão da proliferação celular determina a normalidade do ciclo (Kimura et al. 2007; Kahata et al. 2018). No processo neoplásico, o desequilíbrio da homeostase é comprometido pelo aumento do estímulo de agentes mutagênicos (oncogenes) ou pela diminuição de estímulos apoptóticos e de supressores tumorais (Derynck et al. 2001; Kimura et al. 2007; Massagué 2012; Weiss e Attisano 2013; Sanchez-Vega et al. 2018).

O gene *TGF β 1* está localizado no cromossomo 19q13 e codifica a proteína TGF β 1 (fator transformador de crescimento β 1). Essa proteína modula funções celulares essenciais, tais como proliferação, diferenciação e apoptose (Grande 1997; Aashaq et al. 2021). TGF β 1 é secretado biologicamente inativo sob a forma de um complexo latente e, ao sofrer clivagem proteolítica, apresenta uma proteína homodimérica ativa que interage com seu receptor de membrana tipo II (Weiss e Attisano 2013; Heldin et al. 1997; Massagué et al. 1998). Alterações na via TGF β 1 podem ser observadas principalmente em neoplasias de pâncreas e gastrointestinais (Sanchez-Vega et al. 2018).

Os genes *SMAD2* e *SMAD4* estão localizados no cromossomo 18q21, sendo considerada uma região passível de mutações. Originalmente o gene *SMAD4* foi descrito como *DPC4* (do inglês *deleted in pancreatic cancer locus 4*) por ser observada alterações estruturais cromossômicas deletérias em câncer de pâncreas (Hahn et al. 1996; Kimura et al. 2007). Essa mutação também está presente em neoplasias colorretais, gástricos, hepáticos, pulmão e de tireoide (Lazzereschi et al. 2005; Fleisch et al. 2006; Levy e Hill 2006). Mutações no gene *SMAD2* podem ser observadas em neoplasias de fígado, colorretal e pulmão (Levy e Hill 2006).

O gene *LTBP1* está localizado no cromossomo 2p22 e codifica proteínas de ligação ao TGF β latente (LTBP). Devido a associação do peptídeo associado a latência (LAP) com o TGF β maduro, não ocorre interação de TGF β aos receptores específicos permanecendo, assim, sua forma latente (Todorovic et al. 2005; Rifkin et al. 2021). Contudo, a interação de LAP com TGF β ativo forma o pequeno complexo latente (do inglês *Small Latency Complex* - SLC) e a ligação de uma proteína LTBP com LAP forma o grande complexo latente (do inglês *Large Latency Complex* - LLC) (Wipff e Hinz 2008; Robertson et al. 2015). Esse processo permite que citocinas sejam excretadas no meio extracelular até sua ativação e, desta forma, torna-o capaz de interagir com seus receptores específicos (Robertson et al. 2015; Shi et al. 2011). Mutações no gene *LTBP* podem ser observadas na síndrome de Marfan (Öklü e Hesketh 2000) e na síndrome do aneurisma da aorta torácica (Quiñones-Pérez et al. 2018).

O gene *ITGB6* está localizado no cromossomo 2q24 e codifica a proteína integrina subunidade 6 beta (Koivisto et al. 2018). Em geral, as integrinas se ligam a receptores específicos da matriz extracelular e promovem adesão celular (Takada et al. 2007). No processo de migração, liga-se ao substrato extracelular a filamentos de fibrinogênio e organiza redes de sinalização agindo em sinergia com outros fatores, como o receptor TGF β

(Scaffidi et al. 2004; Huttenlocher e Horwitz 2011; Munger e Sheppard 2011). A integrina 6 é expressa em células epiteliais, interage com o receptor de fibronectina e ativa o *TGFβ*. A perda da sua função pode desencadear resposta imune alterada na pele e nos pulmões, além de doenças periodontal e amelogênese imperfeita. A expressão elevada de integrina 6 e a ativação desordenada de *TGFβ* estão associados a fibrose e câncer (Bandyopadhyay e Raghavan 2009; Koivisto et al. 2018; Meecham e Marshall 2019).

O gene *FBN1* está localizado no cromossomo 15q21 e codifica a proteína fibrilina 1, sendo uma glicoproteína de matriz extracelular que se liga ao cálcio e compõe estruturalmente as microfibrilas (Schrenk et al. 2018). Após sua síntese e processamento, a fibrilina-1 compõe a matriz extracelular se associando a outras proteínas, como a LTBP1 (Byers 2004; Chaudhry et al. 2007). A ligação dessas duas proteínas permite alterações na matriz extracelular e promove a liberação de moléculas latentes de *TGFβ1*, passando para sua forma ativa (Kaartinen e Warburton 2003). Mutações nesse gene estão associadas a várias síndromes, como: síndrome de Marfan, síndrome da ectopia lentis, síndrome de Weill-Marchesani, síndrome de Shprintzen-Goldberg e síndrome progeroide neonatal (Byers 2004; Schrenk et al. 2018).

O gene *c-MYC* está localizado no cromossomo 8q24, considerado um proto-oncogene que codifica uma fosfoproteína nuclear envolvida na proliferação celular, apoptose e transformação celular (Nesbit et al. 1999; Krishna et al. 2015; Dhanasekaran et al. 2021; Lourenco et al. 2021). A via *TGFβ* bloqueia a sequência do ciclo celular na fase G1 pelo estímulo das proteínas p15 e p21 inibidoras de CDKs (do inglês *Cyclin-dependent kinases*) evitando, portanto, o aumento do grupamento fosfato na proteína do retinoblastoma (pRB) e a supressão de *c-MYC* (Geng e Weinberg 1993; Warner et al. 1999; Orian e Eisenman 2001; Kimura et al. 2007; Krishna et al. 2015). Quando mutado, *c-MYC* pode gerar expressão anormal de diversos alvos contribuindo para o desenvolvimento de algumas neoplasias (Nesbit et al. 1999; Sanchez-Vega et al. 2018; Dhanasekaran et al. 2021; Lourenco et al. 2021).

1.4 JUSTIFICATIVA

As neoplasias de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Estudos têm sido realizados na tentativa de esclarecer os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das neoplasias derivadas dessas glândulas. A avaliação da expressão gênica e suas vias envolvidas denota ser um cenário interessante para melhor compreensão do desenvolvimento neoplásico, onde novos achados podem direcionar a aplicação de novas técnicas para o diagnóstico e tratamento terapêutico. Nosso grupo de pesquisa tem conduzido a investigação do efeito do TGF β 1 na expressão da integrina em cultura de células derivadas de Adenoma Pleomórfico e Carcinoma Adenoide Cístico, indicando que são componentes importantes na diferenciação celular e estudos como este podem ser úteis para melhor compreensão da biologia dessas lesões (Lourenço et al. 2004; Lourenço e Lima 2007). Contudo, pouco se sabe sobre a via de sinalização TGF β nas neoplasias mais comuns em glândulas salivares, como: Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico. Diante disso, torna-se necessário ampliar a pesquisa de genes associados para a determinação de um painel de marcadores e, assim, fornecer informações que possam contribuir com o diagnóstico/prognóstico dessas neoplasias.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Avaliar a expressão gênica associada à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão gênica de *TGF β 1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTBP1* e *c-MYC* por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (qPCR);
- Comparar os resultados de expressão gênica entre as neoplasias Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico;
- Associar os resultados de expressão gênica com as características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico;
- Comparar a expressão gênica de *TGF β 1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTBP1* e *c-MYC* observadas nas neoplasias com bancos de dados públicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo retrospectivo onde foram utilizadas 43 amostras congeladas de neoplasias de glândulas salivares (13 casos de Adenoma Pleomórfico, 17 casos de Mucoepidermoide, 13 casos de Carcinoma Adenoide Cístico) provenientes de cirurgias realizadas no A.C.Camargo Cancer Center no período do ano 2000 a 2015 e fornecidas pelo Biobanco de Tumores. Também foram utilizadas 10 amostras de glândulas salivares maiores (parótidas) não neoplásicas provenientes de margens cirúrgicas. Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada paciente foram coletados nos prontuários arquivados no SAME do A.C.Camargo Cancer Center.

Uma visão geral dos procedimentos realizados neste estudo pode ser observada na Figura 7.

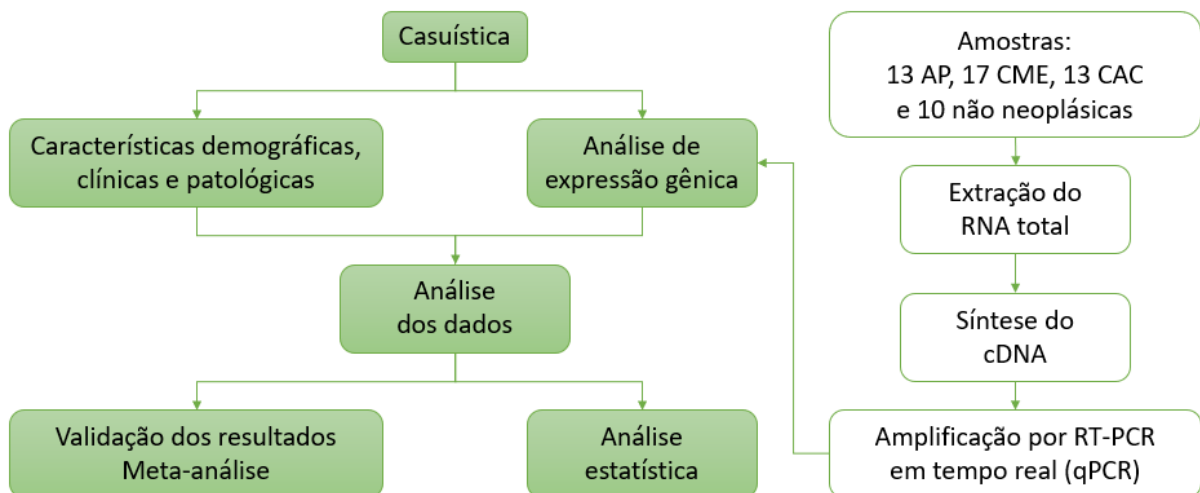


Figura 7 – Visão geral das etapas metodológicas desenvolvidas no estudo. AP: Adenoma Pleomórfico; CME: Carcinoma Mucoepidermoide; CAC: Carcinoma Adenoide Cístico.

3.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA

3.2.1 Extração do RNA total

De acordo com as recomendações do fabricante, as amostras congeladas com tecido neoplásico satisfatório provenientes de ressecção cirúrgica foram homogeneizadas pelo equipamento Precelly[®]s (Carlsbad, California, USA) sendo o RNA total extraído utilizando-se o miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands). Em relação a qualidade dessas amostras, foi avaliado a concentração e pureza do RNA por meio da leitura espectrofotométrica no equipamento Nanodrop[™] ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade foi determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA).

O RNA total foi incubado por 15 minutos, à temperatura ambiente, em solução composta por: 20mM de Tris HCl pH 8.4 2 mM MgCl₂ ,50 mM de KCl e 1U de DNase I (Invitrogen) para cada 1µg de RNA. Quanto à inativação da enzima, foi adicionado 2,5 mM de EDTA e incubado a 65°C por 10 minutos. As amostras foram precipitadas em solução de acetato de sódio 0,2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto por 16h a -20°C. Após esse processo as amostras foram centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos, o sobrenadante foi desprezado e o precipitado lavado com etanol 75%. Novamente foi centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos e o precipitado seco foi ressuscitado em água livre de DNase e RNase.

3.2.2 Síntese do cDNA

A síntese do cDNA foi realizada de acordo com as orientações do manual High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit. A partir de 1000ng de RNA total, foi adicionado em reação de volume final de 20 µL:

- 2 µL de 10 x RT Buffer
- 0,8 µL de 25 x dNTP mix
- 2 µL de 10 x Random Primers
- 1 µL de Enzima Multiscribe
- 1 µL de RNase out
- 13,2 µL de RNA

A reação foi incubada em ciclos de 25°C por 10 minutos, 37° por 120 minutos e 85°C por 5 minutos no aparelho termociclador Veriti 96 Well (Applied Biosystems). Os tubos foram armazenados a -20°C.

3.2.3 Amplificação por RT-PCR em tempo real (qPCR)

O ensaio de amplificação foi realizado em duplicata de acordo com as orientações recomendadas do manual Taq Man® Universal PCR Master Mix (2X). Para cada tubo o volume final de reação foi de 20 µL, contendo:

- 10 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (2X)
- 4 µL de água ultrapura
- 5 µL (10ng) do cDNA
- 1 µL de TaqMan Gene Expression Assay (Tabela 1)

Para este processo, a reação foi realizada em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos, 60°C por 1 minuto, 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

Conforme descrito em estudo anterior do nosso grupo (Flores et al. 2017; Flores 2015; Livak e Schmittgen 2001), foi determinado o gene referência a ser utilizado na quantificação da expressão, utilizando a ferramenta RefFinder. Foram testados os genes: *β-actina*, *18S*, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (*GAPDH*) e *β-2-microglobulina (B2M)*, sendo o gene *β-actina* foi selecionado como referência por apresentar a expressão mais estável entre as amostras de glândulas salivares humanas não neoplásicas e neoplásicas.

O gene alvo também foi quantificado relativamente à expressão de um *pool* composto por 10 amostras de glândulas salivares histologicamente normais (amostra calibradora). O resultado final (Rq gene) foi avaliado a expressão do gene em n-vezes comparado ao controle e ao calibrador de acordo com seu aumento ou diminuição, onde ΔCt da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do gene estudado do valor médio de Ct do gene usado como referência (Livak e Schmittgen 2001), da seguinte forma:

- $Rq \text{ gene} = 2^{- (\Delta Ct \text{ amostra} - \Delta Ct \text{ calibrador})}$

Foram excluídas da análise, amostras que apresentaram amplificação tardia (Ct acima de 37 ciclos). A determinação de aumento ou diminuição da expressão dos genes nas

amostras neoplásicas em comparação com as amostras não neoplásicas foi utilizada os valores para:

- Diminuição de expressão: Expressão (Rq) \leq 0,5
- Aumento de expressão: Expressão (Rq) \geq 2,0

A expressão relativa das amostras com valores entre 0,5 e 2,0 não foram consideradas como expressão alterada em relação às amostras não neoplásicas. Esses valores de corte estão de acordo com estudos já estabelecidos pela literatura (Flores et al. 2017; Coutinho-Camillo et al. 2006; 2015).

Tabela 1 – Descrição dos genes avaliados nos experimentos de qPCR: nome oficial, localização cromossômica, tamanho do amplificado e número do catálogo

Gene	Nome oficial	Localização	Tamanho do amplificado	Assay/nº do Catálogo
TGFβ1	<i>Transforming growth factor beta 1</i>	Cromossomo 19	57 pb	HS 00998133-m1
ITGB6	<i>Integrin subunit beta 6</i>	Cromossomo 2	101 pb	HS 00168458-m1
SMAD2	<i>SMAD family member 2</i>	Cromossomo 18	129 pb	HS 00183425-m1
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>	Cromossomo 18	86 pb	HS 00929647-m1
FBN1	<i>Fibrillin 1</i>	Cromossomo 15	57 pb	HS 00171191-m1
LTBP1	<i>Latent transforming growth factor beta binding protein 1</i>	Cromossomo 2	63 pb	HS 00386448-m1
c-MYC	<i>MYC proto-oncogene</i>	Cromossomo 8	87 pb	HS 00905030-m1
ACTB	<i>Actin beta</i>	Cromossomo 7	171 pb	4326315E

pb: Pares de bases

3.3 ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Para fins de análise de clusterização hierárquica não supervisionada, foi considerada a expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β nas diferentes neoplasias. Para a construção da clusterização hierárquica foi utilizada a função heatmap.2 disponível no pacote gplots (versão 3.0.1) e obtido no repositório bioconductor, sendo utilizado para essa análise o programa o R.

3.4 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: META-ANÁLISE

Para fins de comparação do perfil de expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β entre as amostras não neoplásicas e neoplásicas, foi realizada uma meta-análise com estudos publicados na literatura disponíveis no banco de dados NCBI-GEO (do inglês *National Center for Biotechnology Information – Gene Expression Omnibus*). Ao todo, 83 estudos foram selecionados com as palavras-chave: “*homo sapiens*”, “*expression profiling*” e “*head and neck*”. Em seguida, foram utilizadas as palavras-chave “*pleomorphic adenoma*”, “*adenoid cystic*” e “*mucoepidermoid*” para refinar o critério de seleção dos estudos que comporiam a meta-análise, resultando nos trabalhos de Meinrath et al. (2020) e Liu et al. (2020) em um total de 96 amostras entre tecidos não neoplásicos e neoplásicos. Comparações estatísticas entre os grupos foram realizadas com teste t, considerando significativos os genes que atingiram $p < 0.05$. Todas as análises foram realizadas no programa R.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação dos resultados de expressão gênica com as características demográficas, clínicas e patológicas, bem como a comparação da expressão dos genes entre si, foram realizadas por meio do teste qui-quadrado ou exato de Fisher quando apropriado. As variáveis analisadas foram gênero, raça, idade, sítio neoplásico, grau histológico, embolização vascular, invasão perineural, linfonodos comprometidos, recidiva e metástase. As curvas de sobrevida global foram estimadas pelo teste Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foram avaliadas pelo teste de log-rank. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS (versão 25).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS, CLÍNICAS E PATOLÓGICAS

De acordo com as análises dos dados demográficos, clínicos e patológicos de pacientes portadores de Adenoma Pleomórfico, foi observado que a maioria dos casos era do gênero feminino e com mais de 40 anos. Todos os casos ocorreram na parótida e não houve recidiva (Tabela 2).

Tabela 2 - Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com Adenoma Pleomórfico

Característica	Número de casos (%)
Gênero	
Feminino	9 (69,23)
Masculino	4 (30,77)
Raça	
Branca	11 (84,62)
Não branca	2 (15,38)
Idade	
< = 40 anos	5 (38,46)
> 40 anos	8 (61,54)
Sítio anatômico	
Parótida	13 (100,00)
Outro	0 (0,00)
Recidiva	
Sim	0 (0,00)
Não	13 (100,00)

Nos pacientes portadores de Carcinoma Mucoepidermoide, a maioria era do gênero feminino, com mais de 40 anos, sendo as glândulas salivares menores o sítio anatômico mais acometido. Alguns pacientes apresentaram linfonodos comprometidos (17,65%), invasão perineural (23,53%) e recidiva (29,41%). Não houve metástase a distância (Tabela 3).

Tabela 3 - Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide

Característica	Número de casos (%)
Gênero	
Feminino	11 (64,71)
Masculino	6 (35,29)
Raça	
Branca	14 (82,36)
Não branca	1 (5,88)
Informação não disponível	2 (11,76)
Idade	
< = 40 anos	4 (23,53)
> 40 anos	13 (76,47)
Sítio anatômico	
Parótida	7 (41,18)
Submandibular	1 (5,88)
Glândulas salivares menores	9 (52,94)
Embolização vascular	
Sim	0 (0,00)
Não	13 (100,00)
Linfonodos comprometidos	
Sim	3 (17,65)
Não	5 (29,41)
Informação não disponível	9 (52,94)
Metástase	
Sim	0 (0,00)
Não	15 (88,24)
Informação não disponível	2 (11,76)
Invasão perineural	
Sim	4 (23,53)
Não	13 (76,47)
Recidiva	
Sim	5 (29,41)
Não	10 (58,83)
Informação não disponível	2 (11,76)
Grau histológico	
Baixo	5 (29,41)
Intermediário	3 (17,65)
Alto	2 (11,76)
Informação não disponível	7 (41,18)

Já em pacientes portadores de Carcinoma Adenoide Cístico, foi observado que a maioria era do gênero masculino, com mais de 40 anos e o sítio anatômico de maior acometimento foram as glândulas salivares menores. Na maioria dos casos não houve embolização vascular (69,23%). Alguns pacientes apresentaram linfonodos comprometidos (15,38%), invasão perineural (46,15%) e recidiva (38,46%) (Tabela 4). Em relação à metástase distância (61,54%) (Tabela 4), oito pacientes manifestaram lesões pulmonares.

Tabela 4 - Aspectos demográficos, clínicos e patológicos dos pacientes com Carcinoma Adenoide Cístico

Característica	Número de casos (%)
Gênero	
Feminino	6 (46,15)
Masculino	7 (53,85)
Raça	
Branca	1 (7,69)
Não branca	0 (0,00)
Informação não disponível	12 (92,31)
Idade	
< = 40 anos	3 (23,08)
> 40 anos	10 (76,92)
Sítio anatômico	
Parótida	1 (7,69)
Submandibular	1 (7,69)
Glândulas salivares menores	11 (84,62)
Embolização vascular	
Sim	4 (30,77)
Não	9 (69,23)
Linfonodos comprometidos	
Sim	2 (15,38)
Não	6 (46,15)
Informação não disponível	5 (38,46)
Metástase	
Sim	8 (61,54)
Não	5 (38,46)
Invasão perineural	
Sim	6 (46,15)
Não	6 (46,15)
Informação não disponível	1 (7,69)
Recidiva	
Sim	5 (38,46)
Não	7 (53,85)
Informação não disponível	1 (7,69)

4.1.1 Análise da expressão gênica

A expressão gênica de *TGF β 1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTBP1* e *c-MYC* foi avaliada em 13 amostras de Adenoma Pleomórfico, 17 amostras de mucoepidermoide e 13 amostras de Carcinoma Adenoide Cístico. O gene *β -actina* já havia sido selecionado anteriormente como referência para a normalização dos experimentos de qPCR em tempo real (FLORES et al. 2017; FLORES 2015).

Para a análise dos dados, foi considerado o aumento ou diminuição da expressão quando comparado ao tecido neoplásico (duas vezes mais ou menos expresso) em relação ao tecido não neoplásico.

No Adenoma Pleomórfico, observamos os genes *TGF β 1*, *LTBP1* e *c-MYC* com a expressão aumentada em 76,92% e o gene *FBN1* em 84,62% dos casos. Em contrapartida o gene *SMAD2* apresentou expressão diminuída em 62,50% e os genes *ITGB6* e *SMAD4* apresentaram expressão normal na maioria dos casos (Figura 8 e Tabela 5).

No Carcinoma Mucoepidermoide, observamos que o gene *FBN1* apresentou expressão aumentada em 100% dos casos avaliados; os genes *TGF β 1*, *ITGB6* e *c-MYC* em 70,59%, 81,25% e 52,94% respectivamente. Para o gene *LTBP1* foi observada expressão normal na maioria dos casos (52,94%). Já os genes *SMAD2* e *SMAD4* apresentaram expressão diminuída em 81,25% e 52,94%, respectivamente (Figura 9 e Tabela 6).

No Carcinoma Adenoide Cístico, observamos que o gene *FBN1* apresentou expressão aumentada em 100% dos casos avaliados; os genes *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *LTBP1* e *c-MYC* em 75,00%, 69,23%, 76,92%, 84,62% e 92,31% respectivamente. Embora a maioria dos casos apresentasse expressão normal de *TGF β 1*, foi observada uma leve tendência de expressão aumentada em 46,15% (Figura 10 e Tabela 7).

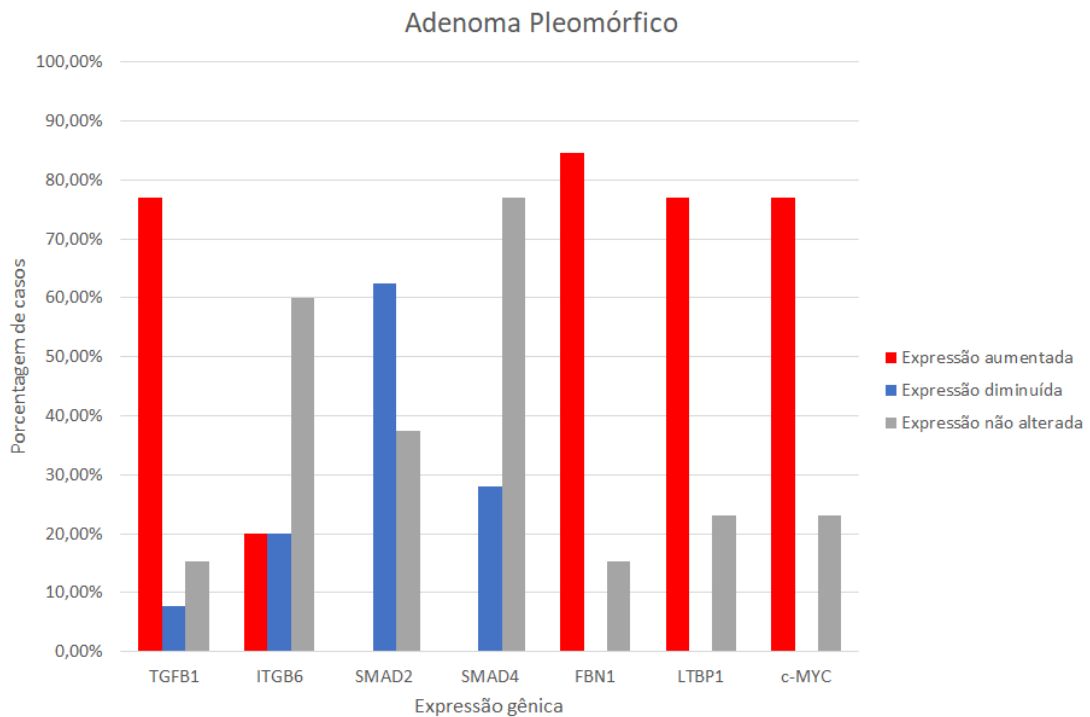


Figura 8 – Análise da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico. A expressão gênica relativa foi avaliada por qPCR e normalizada pela expressão do gene β -actina utilizado como referência. A representação gráfica em barras indica a porcentagem de casos com a expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada no *pool* composto por 10 amostras de glândulas salivares não neoplásicas. Considera-se aumento ou diminuição da expressão quando a expressão no tecido neoplásico variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não neoplásico.

Tabela 5 – Expressão relativa dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico em comparação com amostras de glândulas salivares não neoplásicas

Adenoma Pleomórfico	TGFB1	ITGB6	SMAD2	SMAD4	FBN1	LTBP1	c-MYC
Expressão	Número de casos (%)						
Aumentada	10 (76,92)	1 (20,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	11 (84,62)	10 (76,92)	10 (76,92)
Diminuída	1 (7,70)	1 (20,00)	5 (62,50)	3 (28,08)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Normal	2 (15,38)	3 (60,00)	3 (37,50)	10 (76,92)	2 (15,38)	3 (23,08)	3 (23,08)
Total de amostras	13 (100,00)	5 (100,00)	8 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)

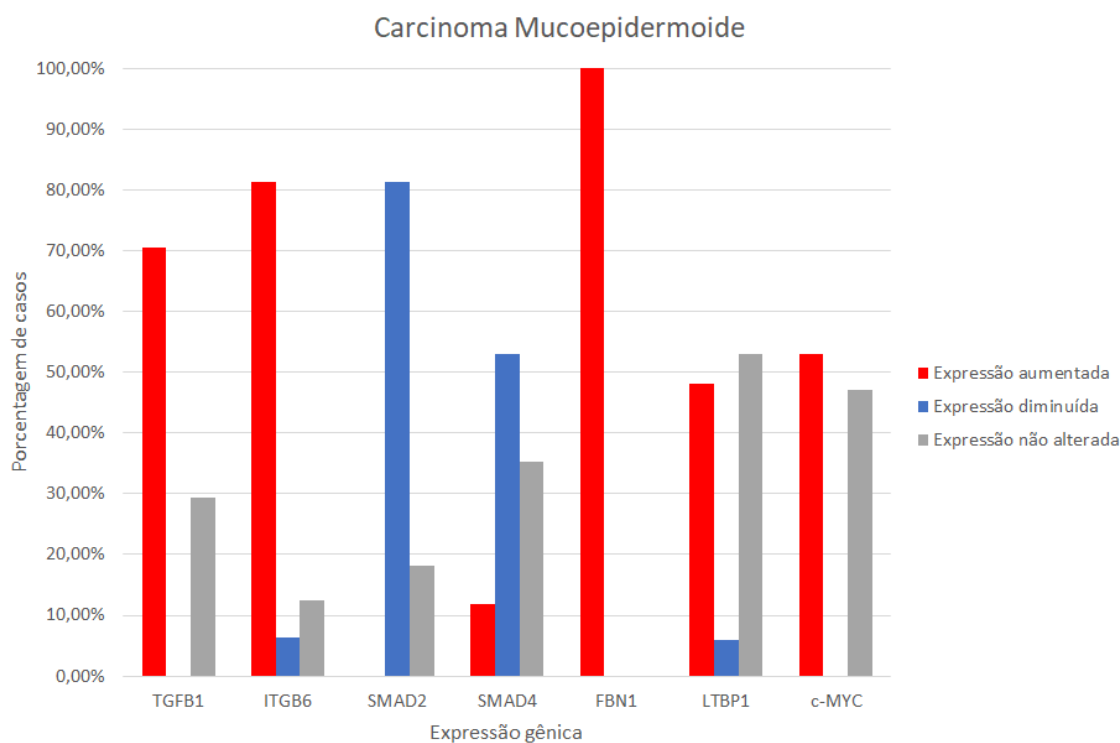


Figura 9 – Análise da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide. A expressão gênica relativa foi avaliada por qPCR e normalizada pela expressão do gene β -actina utilizado como referência. A representação gráfica em barras indica a porcentagem de casos com a expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada no *pool* composto por 10 amostras de glândulas salivares não neoplásicas. Considera-se aumento ou diminuição da expressão quando a expressão no tecido neoplásico variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não neoplásico.

Tabela 6 – Expressão relativa dos genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide em comparação com amostras de glândulas salivares não neoplásicas

Carcinoma Mucoepidermoide	TGFB1	ITGB6	SMAD2	SMAD4	FBN1	LTBP1	c-MYC
Expressão	Número de casos (%)						
Aumentada	12 (70,59)	13 (81,25)	0 (0,00)	2 (11,76)	17 (100,00)	7 (48,18)	9 (52,94)
Diminuída	0 (0,00)	1 (6,25)	13 (81,25)	9 (52,94)	0 (0,00)	1 (5,88)	0 (0,00)
Normal	5 (29,41)	2 (12,50)	3 (18,25)	6 (35,30)	0 (0,00)	9 (52,94)	8 (47,06)
Total de amostras	17 (100,00)	16 (100,00)	16 (100,00)	17 (100,00)	17 (100,00)	17 (100,00)	17 (100,00)

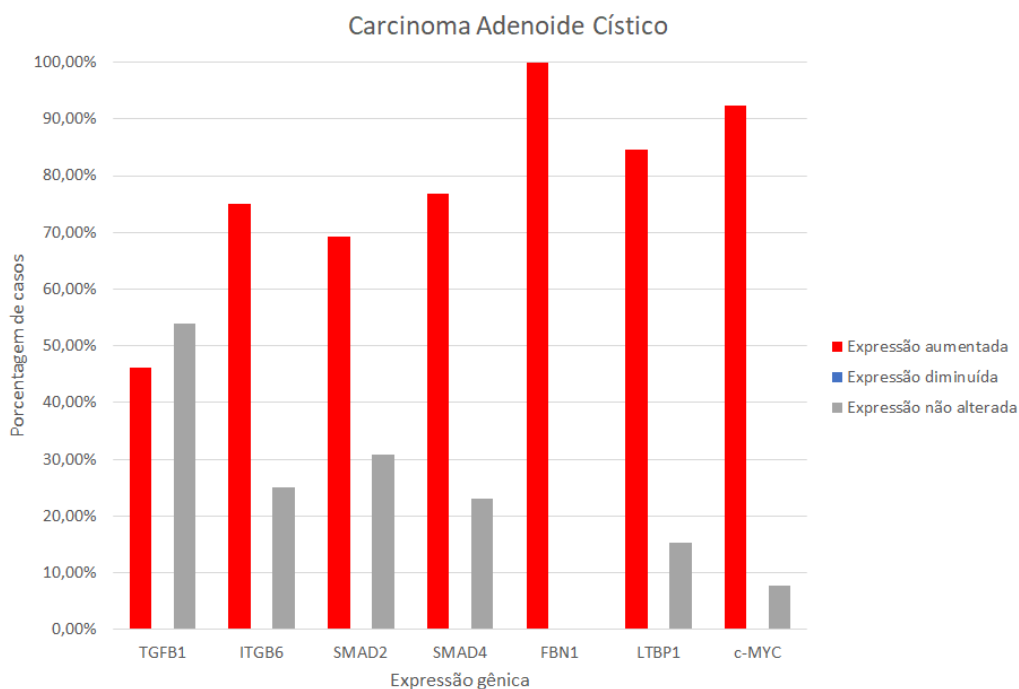


Figura 10 – Análise da expressão dos genes associados à via de sinalização TGFβ em amostras de Carcinoma Adenoide Cístico. A expressão gênica relativa foi avaliada por qPCR e normalizada pela expressão do gene *β-actina* utilizado como referência. A representação gráfica em barras indica a porcentagem de casos com a expressão aumentada ou diminuída considerando a expressão observada no *pool* composto por 10 amostras de glândulas salivares não neoplásicas. Considera-se aumento ou diminuição da expressão quando a expressão no tecido neoplásico variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não neoplásico.

Tabela 7 – Expressão relativa dos genes associados à via de sinalização TGFβ em amostras de Carcinoma Adenoide Cístico em comparação com amostras de glândulas salivares não neoplásicas

Carcinoma Adenoide Cístico	TGFβ1	ITGB6	SMAD2	SMAD4	FBN1	LTBP1	c-MYC
Expressão	Número de casos (%)						
Aumentada	6 (46,15)	9 (75,00)	9 (69,23)	10 (76,92)	13 (100,00)	11 (84,62)	12 (92,31)
Diminuída	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)	0 (0,00)
Normal	7 (53,85)	3 (25,00)	4 (30,77)	3 (23,08)	0 (0,00)	2 (15,38)	1 (7,69)
Total de amostras	13 (100,00)	12 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)	13 (100,00)

4.2 ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

A fim de verificar se o perfil de expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β era capaz de separar as neoplasias estudadas e verificar se existem conjuntos de genes que possuem padrão de expressão específica (aumentada ou diminuída) dependente do tipo de neoplasia, foi realizada uma análise de clusterização hierárquica. Contudo, por essa análise não foi possível classificar as neoplasias estudadas pela expressão gênica (Figura 11).

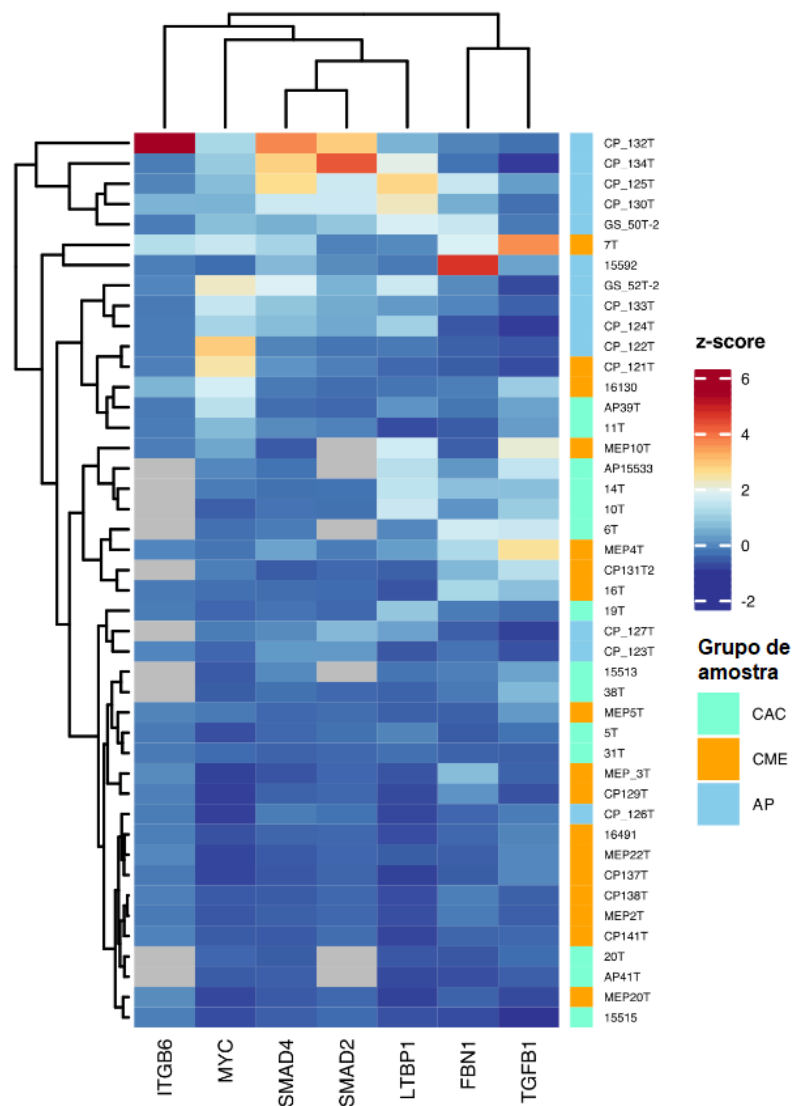


Figura 11 – Análise de clusterização hierárquica de genes associados à via de sinalização TGF β em amostras de Adenoma Pleomórfico (AP), Carcinoma Mucoepidermoide (CME) e Carcinoma Adenoide Cístico (CAC). Conforme indicado na escala de expressão, são representados aumento e diminuição por vermelho e azul, respectivamente. Dendrograma baseado na expressão dos genes *TGFB1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTBP1* e *c-MYC*.

4.3 VALIDAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA: META-ANÁLISE

Para verificar se a expressão gênica associada a via de sinalização TGF β observada neste estudo corrobora os dados disponíveis na literatura, foi realizada uma meta-análise considerando dois estudos compatíveis publicados no NCBI-GEO, sendo Meinrath et.al (2020) e Liu et.al (2020). As características gerais de cada estudo podem ser observadas na Tabela 8.

Em relação aos casos de Adenoma Pleomórfico, não foram encontrados dados publicados disponíveis na literatura para realizar a validação da expressão gênica por meio de meta-análise.

Comparando as amostras de glândulas salivares normais com as amostras de Carcinoma Mucoepidermoide, houve concordância entre os resultados dos estudos que apresentaram aumento da expressão dos genes *ITGB6*, *LTBP1* e *TGF β 1*. Para os genes *FBN1*, *c-MYC*, *SMAD2* e *SMAD4* não houve concordância entre os resultados. Esses dados podem ser observados na Tabela 9.

Comparando as amostras de glândulas salivares normais com as amostras de Carcinoma Adenoide Cístico, os estudos indicaram concordância no aumento da expressão dos genes *FBN1*, *ITGB6*, *LTBP1*, *c-MYC*, *SMAD2* e *SMAD4*. Apenas para o gene *TGF β 1* não houve concordância entre os resultados. Esses dados podem ser observados na Tabela 9.

Tabela 8 – Características gerais dos estudos selecionados da literatura para análise de meta-análise

Autor, ano e país	Modelo	Quantidade e tipo das amostras	Metodologia	Objetivo geral do estudo	Nº de acesso GEO
Meinrath et.al 2020, Alemanha	Humano - FFPE	13 CME 14 CAC 20 ADC SOE 47 GS normais	Hibridização <i>N-Counter</i> usando <i>PanCancer Pathway Panel (Nanostring)</i>	Caracterização do perfil da expressão gênica de 770 genes em carcinomas primários de glândula salivar	GSE153283
Liu et.al 2020, China	Cultura de células	13 CAC 2 Xenoenxertos de CAC 7 GS normais	Chip de DNA <i>HuGene 1.0 ST microarray (Affymetrix)</i>	Diferenciação na expressão gênica global entre Carcinoma Adenoide Cístico e glândulas salivares normais	GSE88804

FFPE: Tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina; CME: Carcinoma Mucoepidermoide; CAC: Carcinoma Adenoide Cístico; ADC SOE: Adenocarcinoma de glândulas salivares sem outra especificação; GS normais: Glândulas salivares normais.

Tabela 9 – Validação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com dados da meta-análise em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico

Genes	CME vs. GS normais			CAC vs. GS normais					CME vs. CAC	
	Estudo	GSE153283		Estudo	GSE88804		GSE153283		GSE153283	
	*FC	p-valor	FC	FC	p-valor	FC	p-valor	FC	p-valor	FC
FBN1	12,85	---	---	17,11	7.19e-02	0.91	---	---	---	---
ITGB6	10,78	5.82e-03	2.09	25,07	---	---	1.51e-01	0.97	7.61e-03	2.07
LTBP1	2,7	1.12e-01	0.65	8,75	3.46e-03	1.16	2.71e-04	1.59	2.16e-01	-0.59
c-MYC	3,8	8.77e-01	-0.09	8,76	2.36e-02	0.84	6.93e-03	1.21	2.63e-02	-0.93
SMAD2	0,45	5.11e-02	0.37	5,17	3.24e-07	0.95	2.66e-03	0.51	8.26e-01	-0.06
SMAD4	0,94	2.63e-01	-0.17	4,51	2.16e-04	0.29	8.77e-01	0.03	2.57e-01	-0.21
TGFβ1	4,69	6.98e-03	1.04	1,97	9.58e-01	0.02	9.29e-01	-0.04	4.17e-04	1.60

FC: *Fold Change*; vs.: *versus*; CME: Carcinoma Mucoepidermoide; GS normais: Glândulas salivares normais; CAC: Carcinoma Adenoide Cístico. *No nosso estudo foi considerada a média da expressão relativa (Rq) para cada gene alvo, sendo: down regulado valores $\leq 0,5$, up regulado valores $\geq 2,0$ e normal entre 0,5 e 2,0. Nos estudos de comparação, considera-se *down*-regulado valores negativos e *up*-regulado valores positivos. Os resultados que foram validados conforme os estudos de comparação estão em negrito.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Na análise de comparação da expressão gênica associada à via de sinalização TGF β em relação às características demográficas, clínicas e patológicas, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa nos casos de Adenoma Pleomórfico (Tabela 10).

Nos casos de Carcinoma Mucoepidermoide, observamos que o aumento da expressão do gene *LTBP1* está associado a lesões que ocorreram nas glândulas salivares menores enquanto a expressão normal do gene está associada a neoplasias que ocorreram nas glândulas parótida e submandibular ($p=0,043$). Para as demais análises não foi observada associação estatisticamente significativa (Tabela 11).

Em relação aos casos de Carcinoma Adenoide Cístico, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa (Tabela 12).

Tabela 10 – Associação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Adenoma Pleomórfico

Característica	TGFB1			ITGB6			SMAD2		SMAD4		LTBP1		c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Gênero																
Masculino	0 0,0%	3 75,0%	1 25,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 100,0%	3 75,0%	1 25,0%	1 25,0%	3 75,0%	1 25,0%	3 75,0%	1 25,0%	3 75,0%
Feminino	2 22,2%	7 77,8%	0 0,0%	3 75,0%	0 0,0%	1 25,0%	3 50,0%	3 50,0%	7 77,8%	2 22,2%	2 22,2%	7 77,8%	2 22,2%	7 77,8%	1 11,1%	8 88,9%
p-valor	0,371			0,400			0,464		>0,999		>0,999		>0,999		>0,999	
Raça																
Branca	2 18,2%	8 72,7%	1 9,1%	3 60,0%	1 20,0%	1 20,0%	2 28,6%	5 71,4%	9 81,8%	2 18,2%	2 18,2%	9 81,8%	3 27,3%	8 72,7%	2 18,2%	9 81,8%
Não branca	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 50,0%	1 50,0%	1 50,0%	1 50,0%	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	2 100,0%
p-valor	>0,999			N/A			0,375		0,423		0,423		>0,999		>0,999	
Sítio anatômico																
Parótida	2 15,4%	10 76,9%	1 7,7%	3 60,0%	1 20,0%	1 20,0%	3 37,5%	5 62,5%	10 76,9%	3 23,1%	3 23,1%	10 76,9%	3 23,1%	10 76,9%	2 15,4%	11 84,6%
Outro	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A			N/A			N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Embolização vascular																
Não	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A			N/A			N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	

N/A: Não avaliável

Tabela 10 – Continuação

Característica	TGFB1			ITGB6			SMAD2		SMAD4		LTBP1		c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Invasão perineural																
Não	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A			N/A			N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Linfonodo comprometido																
Não	1 14,3%	6 85,7%	0 0,0%	2 66,7%	0 0,0%	1 33,3%	2 50,0%	2 50,0%	6 85,7%	1 14,3%	1 14,3%	6 85,7%	2 28,6%	5 71,4%	0 0,0%	7 100,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A			N/A			N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Recidiva																
Não	2 20,0%	7 70,0%	1 10,0%	2 66,7%	1 33,3%	0 0,0%	1 20,0%	4 80,0%	7 70,0%	3 30,0%	3 30,0%	7 70,0%	2 20,0%	8 80,0%	2 20,0%	8 80,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A			N/A			N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Metástase																
Não	2 20,0%	7 70,0%	1 10,0%	2 66,7%	1 33,3%	0 0,0%	1 20,0%	4 80,0%	7 70,0%	3 30,0%	3 30,0%	7 70,0%	2 20,0%	8 80,0%	2 20,0%	8 80,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A			N/A			N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	

N/A: Não avaliável

Tabela 11 – Associação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Carcinoma Mucoepidermoide

Característica	TGFB1		ITGB6			SMAD2		SMAD4			LTBP1			c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Gênero																	
Masculino	2 33,3%	4 66,7%	1 20,0%	4 80,0%	0 0,0%	2 40,0%	3 60,0%	1 16,7%	1 16,7%	4 66,7%	2 33,3%	3 50,0%	1 16,7%	2 33,3%	4 66,7%	0 0,0%	6 100,0%
Feminino	3 27,3%	8 72,7%	1 9,1%	9 81,8%	1 9,1%	1 9,1%	10 90,9%	5 45,5%	1 9,1%	5 45,5%	7 63,6%	4 36,4%	0 0,0%	6 54,5%	5 45,5%	0 0,0%	11 100,0%
p-valor	>0,999		>0,999			0,214		0,508			0,406			0,620		N/A	
Raça																	
Branca	3 21,4%	11 78,6%	1 7,7%	11 84,6%	1 7,7%	3 23,1%	10 76,9%	6 42,9%	2 14,3%	6 42,9%	6 42,9%	7 50,0%	1 7,1%	6 42,9%	8 57,1%	0 0,0%	14 100,0%
Não branca	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%
p-valor	0,267		0,214			>0,999		>0,999			>0,999			0,467		N/A	
Sítio anatômico																	
Parótida	3 42,9%	4 57,1%	2 28,6%	4 57,1%	1 14,3%	1 14,3%	6 85,7%	1 14,3%	1 14,3%	5 71,4%	6 85,7%	1 14,3%	0 0,0%	4 57,1%	3 42,9%	0 0,0%	7 100,0%
Glândulas menores	2 22,2%	7 77,8%	0 0,0%	8 100,0%	0 0,0%	1 12,5%	7 87,5%	4 44,4%	1 11,1%	4 44,4%	2 22,2%	6 66,7%	1 11,1%	4 44,4%	5 55,6%	0 0,0%	9 100,0%
Submandibular	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%
p-valor	0,715		0,250			0,350		0,605			0,043			>0,999		N/A	
Embolização vascular																	
Não	5 29,4%	12 70,6%	2 12,5%	13 81,3%	1 6,3%	3 18,8%	13 81,3%	6 35,3%	2 11,8%	9 52,9%	9 17,6%	7 41,2%	1 5,9%	8 47,1%	9 52,9%	0 0,0%	17 100,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A		N/A			N/A		N/A			N/A			N/A		N/A	

N/A: Não avaliável

Tabela 11 – Continuação

Característica	TGFB1		ITGB6			SMAD2		SMAD4			LTBP1			c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Invasão perineural																	
Não	4	9	1	10	1	2	10	5	1	7	6	6	1	7	6	0	13
	30,8%	69,2%	8,3%	83,3%	8,3%	16,7%	83,3%	38,5%	7,7%	53,8%	46,2%	46,2%	7,7%	53,8%	46,2%	0,0%	100,0%
Sim	1	3	1	3	0	1	3	1	1	2	3	1	0	1	3	0	4
	25,0%	73,0%	25,0%	73,0%	0,0%	25,0%	73,0%	25,0%	25,0%	50,0%	73,0%	25,0%	0,0%	25,0%	73,0%	0,0%	100,0%
p-valor	>0,999		0,607			>0,999		0,561			0,682			0,576		N/A	
Linfonodo comprometido																	
Não	1	4	2	2	0	1	4	1	1	3	3	2	0	1	4	0	5
	20,0%	80,0%	50,0%	50,0%	0,0%	20,0%	80,0%	20,0%	20,0%	60,0%	60,0%	40,0%	0,0%	20,0%	80,0%	0,0%	100,0%
Sim	1	2	0	3	0	0	3	2	0	1	1	2	0	1	2	0	3
	33,3%	66,7%	0,0%	100,0%	0,0%	0,0%	100,0%	66,7%	0,0%	33,3%	33,3%	66,7%	0,0%	33,3%	66,7%	0,0%	100,0%
p-valor	>0,999		0,429			>0,999		0,679			>0,999			>0,999		N/A	
Recidiva																	
Não	2	8	1	7	1	3	7	2	2	6	6	4	0	5	5	0	10
	20,0%	80,0%	11,1%	77,8%	11,1%	30,0%	70,0%	20,0%	20,0%	60,0%	60,0%	40,0%	0,0%	50,0%	50,0%	0,0%	100,0%
Sim	1	4	1	4	0	0	4	3	0	2	1	3	1	1	4	0	5
	20,0%	80,0%	20,0%	80,0%	0,0%	0,0%	100,0%	60,0%	0,0%	40,0%	20,0%	60,0%	20,0%	20,0%	80,0%	0,0%	100,0%
p-valor	>0,999		>0,999			0,505		0,324			0,364			0,580		N/A	

N/A: Não avaliável

Tabela 11 – Continuação

Característica	TGFB1		ITGB6			SMAD2		SMAD4			LTBP1			c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Diminuído	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Metástase																	
Não	4 26,7%	11 73,3%	2 14,3%	11 78,6%	1 7,1%	3 21,4%	11 78,6%	4 26,7%	2 13,3%	9 60,0%	8 53,3%	6 40,0%	1 6,7%	7 46,7%	8 53,3%	0 0,0%	15 100,0%
Sim	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A		N/A			N/A		N/A			N/A			N/A		N/A	
Grau histológico																	
Baixo	1 20,0%	4 80,0%	1 20,0%	3 60,0%	1 20,0%	2 40,0%	3 60,0%	1 20,0%	2 40,0%	2 40,0%	2 40,0%	3 60,0%	0 0,0%	2 40,0%	3 60,0%	0 0,0%	5 100,0%
Intermediário	0 0,0%	3 100,0%	1 33,3%	2 66,7%	0 0,0%	1 33,3%	2 66,7%	2 66,7%	0 0,0%	1 33,3%	3 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	3 100,0%	0 0,0%	3 100,0%
Alto	1 50,0%	1 50,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	2 100,0%	1 50,0%	1 50,0%	0 0,0%	1 50,0%	1 50,0%	0 0,0%	2 100,0%
p-valor	0,667		>0,999			>0,999		0,476			0,286			0,500		N/A	

N/A: Não avaliável

Tabela 12 – Associação da expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de Carcinoma Adenoide Cístico

Característica	TGFB1		ITGB6		SMAD2		SMAD4		LTBP1		c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Gênero														
Masculino	4 57,1%	3 42,9%	3 42,9%	4 57,1%	2 28,6%	5 71,4%	2 28,6%	5 71,4%	2 28,6%	5 71,4%	1 14,3%	6 85,7%	0 0,0%	7 100,0%
Feminino	3 50,0%	3 50,0%	0 0,0%	5 100,0%	2 33,3%	4 66,7%	1 16,7%	5 83,3%	0 0,0%	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%
p-valor	>0,999		0,205		>0,999		>0,999		0,462		>0,999		N/A	
Raça														
Branca	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%
Não branca	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%	0 0,0%
p-valor	N/A		N/A		N/A		N/A		N/A		N/A		N/A	
Sítio anatômico														
Parótida	1 100,0%	0 0,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%
Glândulas menores	6 54,5%	5 45,5%	3 30,0%	7 70,0%	4 36,4%	7 63,6%	3 27,3%	8 72,7%	2 18,2%	9 81,8%	1 9,1%	10 90,9%	0 0,0%	11 100,0%
Submandibular	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%	0 0,0%	1 100,0%
p-valor	>0,999		>0,999		>0,999		>0,999		>0,999		>0,999		N/A	
Embolização vascular														
Não	6 66,7%	3 33,3%	3 37,5%	5 62,5%	2 22,2%	7 77,8%	2 22,2%	7 77,8%	2 22,2%	7 77,8%	1 11,1%	8 88,9%	0 0,0%	9 100,0%
Sim	1 25,0%	3 75,0%	0 0,0%	4 100,0%	2 50,0%	2 50,0%	1 25,0%	3 75,0%	0 0,0%	4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%	0 0,0%	4 100,0%
p-valor	0,266		0,491		0,530		>0,999		>0,999		>0,999		N/A	

N/A: Não avaliável

Tabela 12 – Continuação

Característica	TGFB1		ITGB6		SMAD2		SMAD4		LTBP1		c-MYC		FBN1	
	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado	Normal	Aumentado
Invasão perineural														
Não	4 66,7%	2 33,3%	2 40,0%	3 60,0%	2 33,3%	4 66,7%	3 50,0%	3 50,0%	2 33,3%	4 66,7%	1 16,7%	5 83,3%	0 0,0%	6 100,0%
Sim	2 33,3%	4 66,7%	1 16,7%	5 83,3%	1 16,7%	5 83,3%	0 0,0%	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%	0 0,0%	6 100,0%
p-valor	0,567		0,545		>0,999		0,182		0,455		>0,999		N/A	
Linfonodo comprometido														
Não	3 50,0%	3 50,0%	1 20,0%	4 80,0%	2 33,3%	4 66,7%	3 50,0%	3 50,0%	2 33,3%	4 66,7%	1 16,7%	5 83,3%	0 0,0%	6 100,0%
Sim	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	2 100,0%	1 50,0%	1 50,0%	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	2 100,0%	0 0,0%	2 100,0%
p-valor	0,464		>0,999		>0,999		0,464		>0,999		>0,999		N/A	
Recidiva														
Não	2 28,6%	5 71,4%	1 14,3%	6 85,7%	3 42,9%	4 57,1%	1 14,3%	6 85,7%	1 14,3%	6 85,7%	1 14,3%	6 85,7%	0 0,0%	7 100,0%
Sim	4 80,0%	1 20,0%	2 50,0%	2 50,0%	1 20,0%	4 80,0%	2 40,0%	3 60,0%	0 0,0%	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%	0 0,0%	5 100,0%
p-valor	0,242		0,491		0,576		0,523		>0,999		>0,999		N/A	
Metástase														
Não	3 60,0%	2 40,0%	2 40,0%	3 60,0%	1 20,0%	4 80,0%	1 20,0%	4 80,0%	2 40,0%	3 60,0%	1 20,0%	4 80,0%	0 0,0%	5 100,0%
Sim	4 50,0%	4 50,0%	1 14,3%	6 85,7%	3 37,5%	5 62,5%	2 25,0%	6 75,0%	0 0,0%	8 100,0%	0 0,0%	8 100,0%	0 0,0%	8 100,0%
p-valor	>0,999		0,523		>0,999		>0,999		0,128		0,385		N/A	

N/A: Não avaliável

Comparando-se a expressão dos genes associada à via de sinalização TGF β entre os três tipos de neoplasias estudados, foi observado aumento de expressão dos genes *c-MYC* ($p=0,055$), *SMAD2* ($p<0,001$) e *SMAD4* ($p<0,001$) nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico e aumento da expressão do gene *ITGB6* ($p=0,047$) nos casos de Carcinoma Mucoepidermoide (Tabela 13, Figura 12).

Tabela 13 – Comparação da expressão gênica associada a via de sinalização TGF β em casos de Carcinoma Mucoepidermoide (CME), Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) e Adenoma Pleomórfico (AP)

Gene	Neoplasia	Normal	Aumentado	Diminuído	Total decasos	p-valor
TGFβ1	CME	5 29,40%	12 70,60%	0 0,00%	17	0,121
	CAC	7 53,80%	6 46,20%	0 0,00%	13	
	AP	2 15,40%	10 76,90%	1 7,70%	13	
ITGB6	CME	2 12,50%	13 81,20%	1 6,30%	16	0,047
	CAC	3 25,00%	9 75,00%	0 0,00%	12	
	AP	3 60,00%	1 20,00%	1 20,00%	5	
SMAD2	CME	3 18,80%	0 0,00%	13 81,20%	16	<0,001
	CAC	4 30,80%	9 69,20%	0 0,00%	13	
	AP	3 23,10%	0 0,00%	5 38,50%	8	
SMAD4	CME	6 35,30%	2 11,80%	9 52,90%	17	<0,001
	CAC	3 23,10%	10 76,90%	0 0,00%	13	
	AP	10 76,90%	0 0,00%	3 23,10%	13	

Tabela 13 – Continuação

Gene	Neoplasia	Normal	Aumentado	Diminuído	Total decasos	p-valor
FBN1	CME	0 0,00%	17 100,00%	0 0,00%	17	0,173
	CAC	0 0,00%	13 100,00%	0 0,00%	13	
	AP	2 15,40%	11 84,60%	0 0,00%	13	
LTBP1	CME	9 52,90%	7 41,20%	1 5,90%	17	0,066
	CAC	2 15,40%	11 84,60%	0 0,00%	13	
	AP	3 23,10%	10 76,90%	0 0,00%	13	
c-MYC	CME	8 47,10%	9 52,90%	0 0,00%	17	0,055
	CAC	1 7,70%	12 92,30%	0 0,00%	13	
	AP	3 23,10%	10 76,90%	0 0,00%	13	

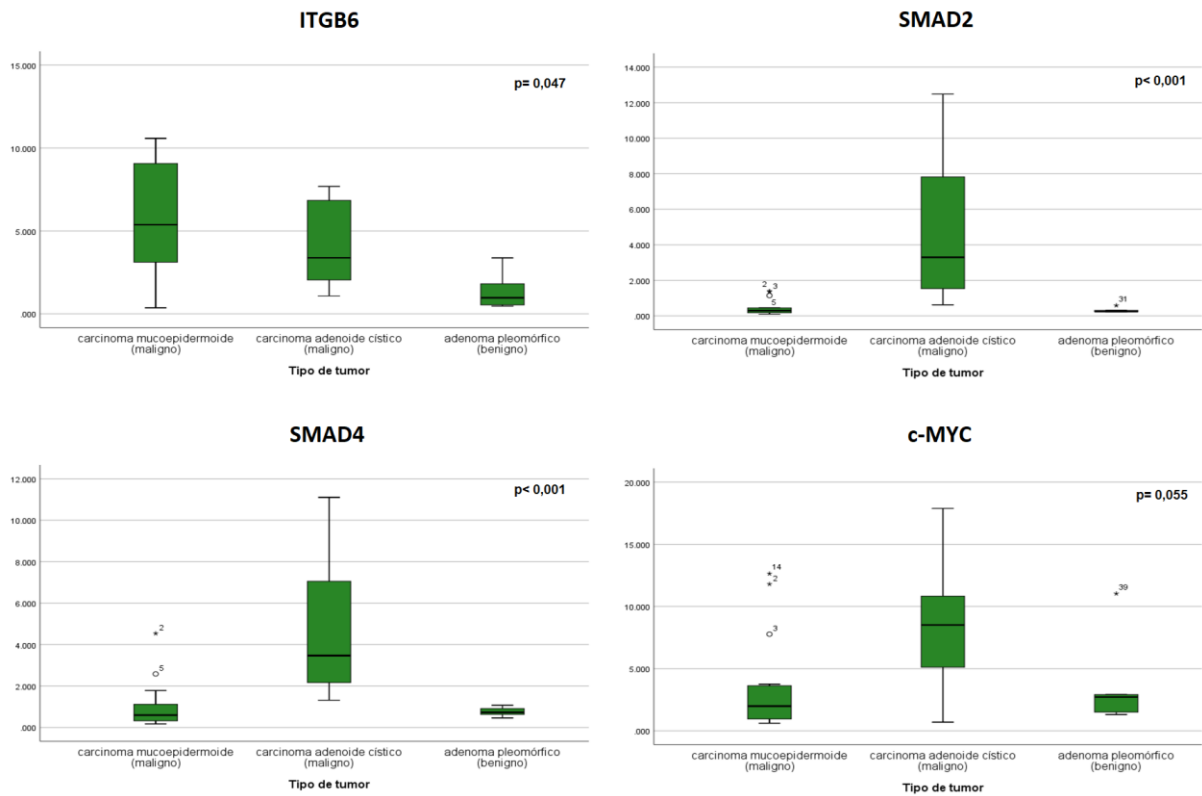


Figura 12 – Expressão diferencial dos genes associados à via de sinalização TGF β em neoplasias de glândula salivar. Os gráficos mostram que houve diferenças estatisticamente significativas entre as expressões dos genes *ITGB6* (p = 0,047), *SMAD2* (p < 0,001), *SMAD4* (p < 0,001) e *c-MYC* (p = 0,055) e os tipos de neoplasias estudados. Para facilitar a visualização do gráfico, foram omitidos valores elevados de *ITGB6* (Carcinoma Mucoepidermoide 67,51 e 35,65; Carcinoma Adenoide Cístico 249,51 e 34,75).

Comparando-se a expressão dos genes entre si em relação a cada tipo de neoplasia estudado, no Adenoma Pleomórfico foi observada associação da expressão aumentada dos genes *FBN1* e *LTBP1* (p=0,038), *FBN1* e *TGF β 1* (p=0,038); expressão aumentada de *FBN1* e expressão normal de *SMAD4* (p=0,038); expressão aumentada de *LTBP1* e expressão normal de *SMAD4* (p=0,003).

No Carcinoma Mucoepidermoide, foi observada associação da expressão aumentada dos genes *LTBP1* e *c-MYC* (p=0,050), *LTBP1* e *TGF β 1* (p=0,050), *c-MYC* e *TGF β 1* (p=0,009); expressão diminuída dos genes *SMAD2* e *SMAD4* (p=0,011).

Em relação às amostras de Carcinoma Adenoide Cístico, não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa quando comparado à expressão dos genes entre si.

Considerando-se a análise de sobrevida, em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide foi observado que ausência de linfonodo comprometido ($p=0,022$) e ausência de recidiva ($p<0,001$) estão associadas a melhor probabilidade de sobrevida global em 5 anos (Figuras 13 e 14). Em relação à expressão gênica, apenas para o gene *SMAD2* houve uma diferença entre as curvas, sendo a expressão normal associada a uma tendência na probabilidade de melhor sobrevida global em 5 anos. Contudo, esse resultado não apresentou significância estatística ($p= 0,162$) (Figura 15).

Em pacientes com Carcinoma Adenoide Cístico, não houve associação estatisticamente significativa nas comparações de sobrevida global em relação às características demográficas, clínicas e patológicas analisadas. Em pacientes com Adenoma Pleomórfico, nenhum paciente faleceu e, portanto, não foi possível realizar análise de sobrevida.

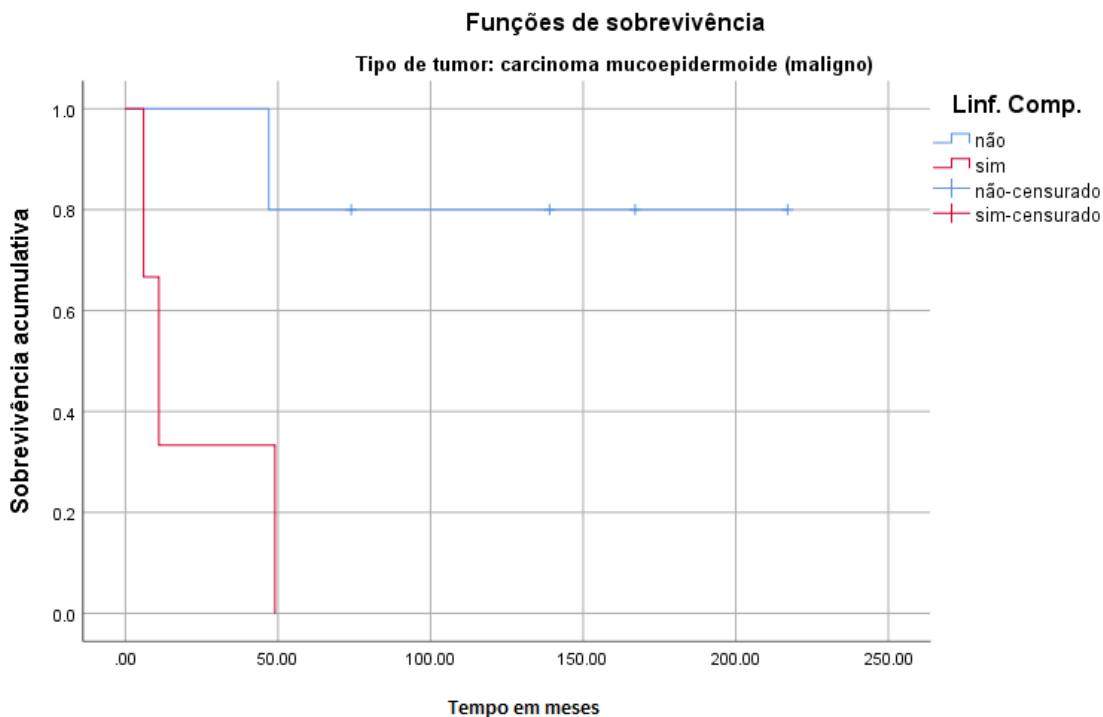


Figura 13 – Curva de sobrevida global em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide com ou sem linfonodo comprometido. A estimativa da sobrevida em 5 anos foi de 80% para pacientes sem linfonodo comprometido e 0% para pacientes com linfonodo comprometido ($p=0,022$).

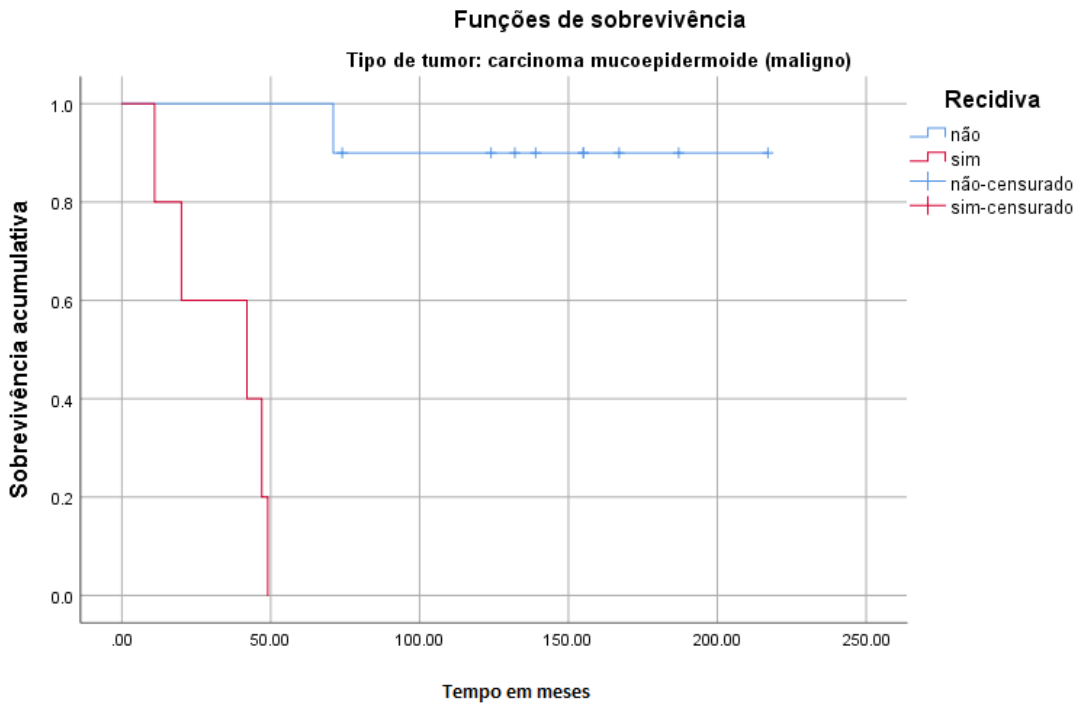


Figura 14 – Curva de sobrevida global em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide com ou sem recidiva. A estimativa da sobrevida em 5 anos foi de 90% para pacientes sem recidiva e 0% para pacientes com recidiva ($p < 0,001$).

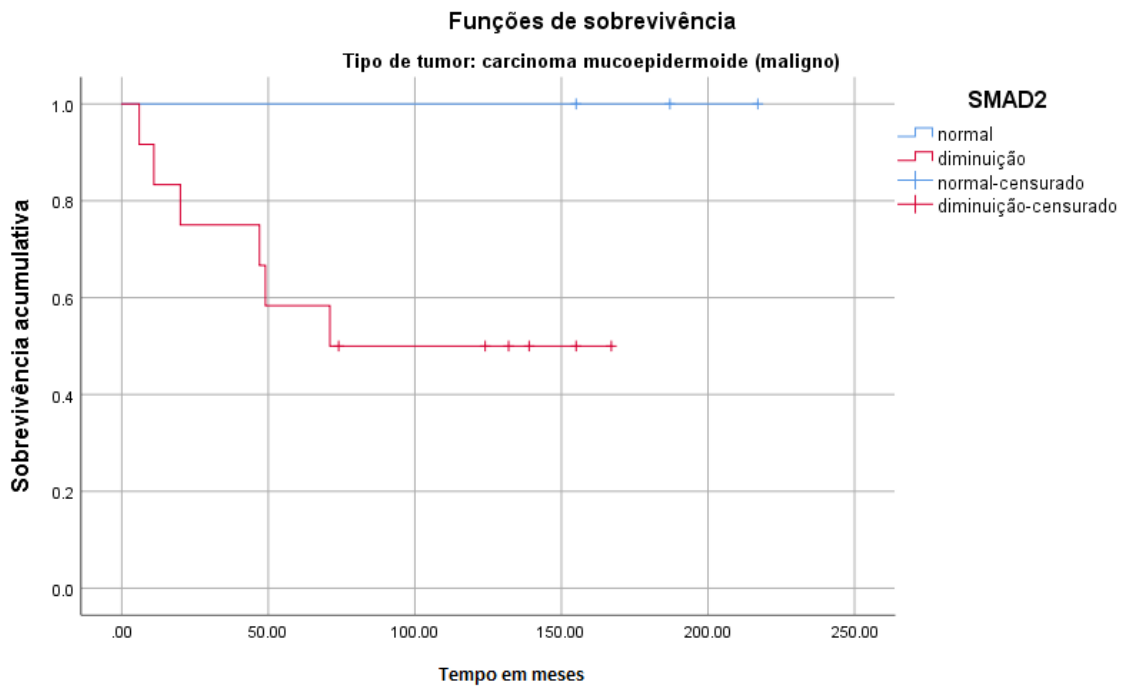


Figura 15 – Curva de sobrevida em pacientes com Carcinoma Mucoepidermoide com expressão normal ou diminuída de *SMAD2*. A estimativa da sobrevida em 5 anos (60 meses) foi de 100% para pacientes com expressão normal e 58% para pacientes com expressão diminuída ($p = 0,162$).

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a expressão gênica associada à via de sinalização TGF β por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (qPCR), destacando os marcadores *TGF β 1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTBP1* e *c-MYC*, em amostras de Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico das glândulas salivares.

Embora sejam menos frequentes, as neoplasias de glândulas salivares correspondem de 3 a 6% das neoplasias de cabeça e pescoço, além de apresentar grande variabilidade clínica e morfológica (Barnes et al. 2005; Bradley 2016a; Seethala 2017; Gatta et al. 2020; Porcheri et al. 2020). O modelo abordado neste estudo abrange as neoplasias mais comuns em glândulas salivares: benigno, o Adenoma Pleomórfico, e os malignos, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico (Bradley 2016b; Badlani et al. 2018; Porcheri et al. 2020). Estes tipos de neoplasias apresentam diferentes origens histológicas, sendo o Adenoma Pleomórfico e o Carcinoma Adenoide Cístico no ducto intercalar; e o Carcinoma Mucoepidermoide no ducto excretor (Bell e Hanna 2012; Adams et al. 2013).

Representando cerca de dois terços de todos os tipos de neoplasias das glândulas salivares, o Adenoma Pleomórfico é o mais comum e apresenta elementos epiteliais e mioepiteliais (Zarbo 2002). Sugere-se que essa neoplasia ocorra em jovens adultos e de meia-idade (30 a 60 anos), tem predileção ao gênero feminino e a localização anatômica mais frequente é a parótida (Almeslet 2020). Embora o número pequeno de amostras, neste estudo foi possível observar o mesmo comportamento relatado pela literatura.

O Carcinoma Mucoepidermoide representa de 10 a 15% de todas as neoplasias de glândulas salivares e é caracterizado pela presença de células mucosas, intermediárias e epidermoides (Peraza et al. 2020). A proporção entre homens e mulheres ainda é questionável, mas a maioria dos estudos indica predileção feminina, sendo a idade média inicial de 55 anos e o tipo maligno mais comum em jovens (Lopes et al. 1999; Peraza et al. 2020). Corroborando com nossos resultados, observamos maior frequência nos casos do gênero feminino e maior que 40 anos. A localização anatômica mais acometida pela neoplasia foram as glândulas salivares menores e, em seguida, as glândulas parótidas. Dados da literatura indicam que o grau histológico pode estar associado com a região comprometida pela neoplasia (Dalgic et al. 2014; Peraza et al. 2020).

Representando cerca de 10% de todos os tipos de neoplasias das glândulas salivares, o Carcinoma Adenoide Cístico é composto por células epiteliais e mioepiteliais, comumente relatado por comprometer as glândulas salivares menores (Coca-Pelaz et al. 2015b; Seethala 2017). Predominantemente na idade adulta, essa neoplasia apresenta maior incidência entre os 40 a 60 anos e tem predileção ao gênero feminino (Garg et al. 2019). Nossos resultados corroboram os dados da literatura, contudo, há uma tendência ao equilíbrio entre os casos avaliados em relação a homens e mulheres portadores da doença.

Devido ao comportamento clínico diverso e ao grupo heterogêneo de lesões, ainda há muita controvérsia quanto à classificação e diferenciação entre as diferentes neoplasias derivadas das glândulas salivares (Barnes et al. 2005; Bradley 2016a; Seethala 2017; Badlani et al. 2018; Skálová et al. 2018; Peraza et al. 2020). Diante disso, diversos estudos têm como propósito esclarecer os mecanismos envolvidos durante a tumorigênese e os componentes dessas neoplasias (Speight e Barrett 2002; Barnes et al. 2005; Kar et al. 2020), sendo um dos seguimentos de interesse pesquisas que envolvem expressão gênica e suas vias associadas (Seethala 2017; Kar et al. 2020).

A via de sinalização $TGF\beta$ está envolvida na resposta a processos patológicos e desempenha um papel importante como supressor tumoral (Massagué 2012). Alguns estudos têm mostrado algumas alterações na expressão de componentes dessa via sugerindo, portanto, a sua relação no processo de tumorigênese, inclusive nas glândulas salivares (Dillard et al. 2001; Lourenço et al. 2004; Lourenço e Lima 2007; Dong et al. 2011; Wang et al. 2011; Xu et al. 2016; Cao et al., 2018).

No nosso estudo, o gene *TGF β 1* apresentou expressão aumentada no Adenoma Pleomórfico. Em modelo animal, a expressão aumentada de *TGF β 1* parece estar associada a substituição do parênquima da glândula salivar submandibular por tecido conjuntivo em casos de fibrose (Hall et al. 2010). No Adenoma Pleomórfico, outras isoformas de *TGF β* são expressas e podem desempenhar um papel na diferenciação das células ductais, além de atuar no desenvolvimento neoplásico e produção de matriz (Kusafuka et al. 2001). Em relação as neoplasias malignas avaliados no presente estudo, foi observado aumento de expressão do gene *TGF β 1* no Carcinoma Mucoepidermoide e expressão normal no Carcinoma Adenoide Cístico. Segundo dados da literatura, o *TGF β 1* parece ter um potencial regulatório na invasão celular e metástase no Carcinoma Mucoepidermoide (Wang et al. 2011) e o mesmo comportamento pode ser observado no Carcinoma Adenoide Cístico (Dong

et al. 2011, 2013).

A expressão diminuída do gene *SMAD2* foi observada na maioria dos casos de Adenoma Pleomórfico e *SMAD4* apresentou expressão normal. No Carcinoma Mucoepidermoide, os genes *SMAD2* e *SMAD4* apresentaram expressão diminuída. Em contrapartida, nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico foi observado aumento da expressão dos genes *SMAD2* e *SMAD4*. Estudos mostram que a sinalização alterada da via $TGF\beta$ por meio das proteínas *SMAD2* e *SMAD4* pode refletir na progressão de algumas neoplasias, como por exemplo: próstata (Perttu et al. 2006), colorretal (Thiagalingam 2001) e cervical (Kloth et al. 2008). Em modelo animal, a deleção de supressores tumorais como *SMAD4* e *PTEN* pode desencadear o desenvolvimento neoplásico em glândulas salivares, como o Adenoma Pleomórfico e Carcinoma Adenoide Cístico (Cao et al. 2018). Contudo, alguns estudos revelam que *TGF\beta1* pode regular o crescimento e a sobrevivência celular neoplásica independente ou não da ação de *SMADs* (Derynck e Zhang 2003; Moustakas e Heldin 2005; Aashaq et al. 2021; Tauriello et al. 2022).

No Adenoma Pleomórfico a maioria dos casos apresentaram expressão normal do gene *ITGB6*, contudo, o número de amostras avaliadas foi pequeno. Nas neoplasias malignas, foi observado aumento de expressão do gene *ITGB6* nos carcinomas mucoepidermoide e adenoide cístico. Em ensaio de imunistoquímica, foi observada baixa expressão de *ITGB6* predominantemente em células periféricas no Adenoma Pleomórfico e, em contrapartida, a expressão aumentada de *ITGB6* em neoplasias malignas de glândulas salivares sugere que possa ser um fator significativo na invasão do estroma (Westernoff et al. 2005).

O gene *LTBP1* apresentou expressão aumentada no Adenoma Pleomórfico e no Carcinoma Adenoide Cístico. Já no Carcinoma Mucoepidermoide foi observada expressão normal de *LTBP1*. Não há relatos na literatura sobre a atividade do *LTBP1* em relação as neoplasias estudadas, contudo, em carcinoma de células escamosas esofágico a superexpressão de *LTBP1* foi associada com o desenvolvimento de metástases em linfonodos (Cai et al. 2020). Outra isoforma da família *LTBP*, o *LTBP2*, parece estar envolvida em carcinoma de tireoide, evidenciando que o *knockdown* de *LTBP2* inibe a invasão e a progressão neoplásica em cultura celular (Wan et al. 2017).

A superexpressão de *c-MYC* pode estar associada com a agressividade neoplásica e pode ser um fator de risco relacionado à sobrevida livre de doença em Carcinoma Adenoide

Cístico (Fujii et al. 2017). A ativação de *c-MYC* e seu envolvimento com outras proteínas mutadas, como o *p53*, podem contribuir com a transformação maligna do Adenoma Pleomórfico (Deguchi et al. 1993). Em nosso estudo, foi observado expressão aumentada do gene *c-MYC* nas neoplasias Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico. O mesmo comportamento foi evidenciado em relação ao gene *FBN1*. A superexpressão de *FBN1* em células neoplásicas de carcinoma de tireoide foi relacionada com o estágio mais avançado da doença e, além disso, pode estar associado à progressão neoplásica por facilitar o acesso de células neoplásicas na parede dos vasos sanguíneos rico em elastina (Tseleni-Balafouta et al. 2006). Com esses resultados, é possível observar que a diminuição da expressão de *SMAD2* e *SMAD4* não interfere na regulação transcricional de *c-MYC*, principalmente no Adenoma Pleomórfico e no Carcinoma Mucoepidermoide. Em contrapartida, nos casos de Carcinoma Adenoide Cístico a expressão aumentada em quase todos os genes associados parece ser importante para a regulação da via de sinalização TGF β .

Para verificarmos se os casos de Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico poderiam ser classificados de acordo com o perfil de expressão dos genes associados à via de sinalização TGF β avaliadas em nosso estudo, foi realizada uma análise de clusterização hierárquica. Essa abordagem metodológica tem sido comumente utilizada em estudos de expressão gênica na tentativa de se distinguir subgrupos de neoplasias baseado em comportamento biológico, fenótipo, sítio de origem, entre outros (Ramoni et al. 2002; Bergkvist et al. 2010). Considerando o perfil de expressão gênica avaliados em nosso estudo, não foi possível separar as amostras em grupos de Adenoma Pleomórfico, Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico.

A fim de validar os resultados da expressão gênica associada à via de sinalização TGF β obtidos no presente estudo, foi realizada uma meta-análise com dados de expressão gênica global em neoplasias de glândulas salivares relatados pela literatura. Foram considerados dois estudos compatíveis publicados no NCBI- GEO, sendo Meinrath et.al (2020) e Liu et.al (2020). Cabe ressaltar, que esses estudos utilizaram abordagens metodológicas diferentes. Contudo, para fins da análise, foi considerada expressão aumentada ou diminuída dos genes de acordo com os critérios de cada abordagem metodológica. Com essas ressalvas, foi possível validar alguns resultados do nosso estudo

comparado aos dados da literatura disponíveis para o Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico. Para o Adenoma Pleomórfico não foram encontrados dados publicados disponíveis na literatura para comparação dos dados obtidos em nosso estudo.

No Carcinoma Mucoepidermoide, foi observado concordância entre os estudos em relação ao aumento da expressão dos genes *ITGB6*, *LTBP1* e *TGFβ1*. A expressão de *ITGB6* já foi investigada em diferentes neoplasias, inclusive em carcinoma oral de células escamosas, responsável por promover invasão celular e estar associada ao pior prognóstico (Bandyopadhyay e Raghavan 2009). A ativação de *TGFβ* dependente de *ITGB6* parece desempenhar um papel importante durante a carcinogênese, além de cooperar com o aumento do crescimento neoplásico e invasão celular (Sheppard 2005; Koivisto et al. 2018). Em carcinoma epidermoide de esôfago, a superexpressão de *LTBP1* foi associada à progressão da neoplasia e metástase em linfonodos (Cai et al. 2020). Diante dessa premissa, nosso estudo indica que a expressão conjunta desses genes pode ser importante na progressão do Carcinoma Mucoepidermoide, contudo, estudos complementares devem ser realizados. Com relação à expressão dos genes *SMAD2*, *SMAD4* e *c-MYC* não foi observada concordância entre os diferentes estudos.

No Carcinoma Adenoide Cístico, foi observada concordância entre os estudos em relação ao aumento da expressão dos genes *FBN1*, *ITGB6*, *LTBP1*, *c-MYC*, *SMAD2* e *SMAD4*. Sabe-se que a expressão das integrinas pode ser regulada pelo *TGFβ1* (Massagué 2012) e essa interação pode estar envolvida no desenvolvimento neoplásico, inclusive em glândulas salivares (Lourenço e Lima 2007). *TGFβ1* é capaz de induzir a transição epitélio-mesênquima em cooperação com via de sinalização RAS e pode estar associada ao desenvolvimento das células neoplásicas (Su et. al 2020). Além disso, há indícios que o aumento da expressão dos genes *TGFβ1* e *SMAD2* está correlacionado com a presença de metástase pulmonar em Carcinoma Adenoide Cístico (Dong et al. 2013). Nesse sentido, a expressão aumentada em quase todos os genes estudados pode estar relacionada com a progressão do processo neoplásico na glândula salivar, contudo, outras pesquisas devem ser realizadas. Já para o gene *TGFβ1* não foi observada concordância de expressão entre os diferentes estudos.

Comparando-se a expressão dos genes nas diferentes neoplasias, foi observado aumento de expressão dos genes *SMAD2*, *SMAD4* e *c-MYC* no Carcinoma Adenoide Cístico quando comparado ao Adenoma Pleomórfico e ao Carcinoma Mucoepidermoide. Os dados da meta-análise também demonstram maior expressão dos genes *SMAD2*, *SMAD4* e *c-MYC*

nas amostras de Carcinoma Adenoide Cístico em comparação com o Carcinoma Mucoepidermoide. Sabe-se que a formação do complexo *SMAD2/SMAD3* fosforilado permite a translocação de *SMAD4* para o núcleo e, assim, ativa a transcrição de genes alvos envolvidos na proliferação celular, como o *c-MYC* (Budi et al. 2017; Kang et al. 2009). Aberrações na via de sinalização TGF β podem interromper os transdutores de sinal SMADs (Hahn et al. 1996), contudo, Daa e colaboradores (2009) observaram que a produção da proteína *SMAD4* em Carcinoma Adenoide Cístico parece não estar envolvida com o desenvolvimento neoplásico. Em contrapartida, Fujii e colaboradores (2017) sugeriram associação da superexpressão de *c-MYC* com a agressividade desse tipo de neoplasia.

No nosso estudo também foi possível observar aumento de expressão do gene *ITGB6* no Carcinoma Mucoepidermoide quando comparado ao Adenoma Pleomórfico e ao Carcinoma Adenoide Cístico. Os dados da meta-análise corroboram os nossos achados comparando-se as amostras de Carcinoma Mucoepidermoide e Carcinoma Adenoide Cístico.

Embora o número de amostras em nosso estudo seja limitado e os resultados estatísticos devam ser analisados com cautela, foi possível observar a expressão diferencial de *SMAD2*, *SMAD4*, *c-MYC* e *ITGB6* nas neoplasias de glândula salivar. A expressão diminuída dos genes *SMAD2* e *SMAD4* parece não interferir na regulação transcricional de *c-MYC*, especialmente no Adenoma Pleomórfico e Carcinoma Mucoepidermoide. Considerando os genes *ITGB6*, *TGF β 1*, *LTBP1*, *FBN1* e *c-MYC* a expressão aumentada parece ser relevante para a regulação da via de sinalização no processo de tumorigênese nas neoplasias mais comuns em glândulas salivares.

Nos casos de Carcinoma Mucoepidermoide, apenas o gene *SMAD2* apresentou uma tendência na probabilidade de melhor sobrevida global em 5 anos quando comparado à sua expressão normal. Contudo, esse resultado não apresentou significância estatística. Observamos também que a ausência de linfonodos comprometido e ausência de recidiva estão associadas à melhor probabilidade de sobrevida global dos pacientes. Essas características clínicas e patológicas já foram demonstradas na literatura, onde a presença desses fatores está associada ao pior prognóstico da doença (Louredo et al. 2020; Taylor et al. 2020; Filho et al. 2020; Goel et al. 2018). Ao analisar os outros tipos neoplásicos estudados, Adenoma Pleomórfico e Carcinoma Adenoide Cístico, não foi observada associação estatisticamente significativa nas comparações de sobrevida global em relação às características demográficas, clínicas e patológicas.

Nossa hipótese é que a via de sinalização TGF β canônica, por meio da expressão dos genes SMADS no citoplasma, possa contribuir diretamente no desenvolvimento do Carcinoma Adenoide Cístico, uma vez que apenas o TGF β 1 apresenta expressão normal com leve tendência a expressão aumentada. Em relação ao Adenoma Pleomórfico e ao Carcinoma Mucoepidermoide, os genes SMADs no citoplasma não parecem desenvolver um papel crucial para o desencadeamento da via TGF β e outras vias podem estar associadas para a transcrição de genes alvos, como a sinalização intracelular por cascata das proteínas quinases. Contudo, outros estudos devem ser realizados.

A comparação entre as diferentes histopatologias das glândulas salivares denota um cenário interessante para analisar o comportamento da diferenciação celular, além de classificar os tipos neoplásicos e esclarecer os mecanismos envolvidos durante a progressão das neoplasias derivadas dessas glândulas (Barnes et al. 2005; Kar et al. 2020; Speight e Barrett 2002). Diante disso, a avaliação da expressão gênica e suas vias envolvidas podem direcionar o desenvolvimento de novas técnicas aplicáveis para o diagnóstico, prognóstico e tratamento terapêutico (Kar et al. 2020; Seethala 2017). O presente estudo contribui para melhor compreensão sobre a via de sinalização TGF β nas neoplasias mais comuns em glândulas salivares, além de fornecer informações para o desenvolvimento de potenciais marcadores biológicos que possam auxiliar na rotina clínica.

6 CONCLUSÃO

- Os genes *TGFβ1*, *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1*, *LTBP1* e *c-MYC* foram expressos nas amostras de AP, CME e CAC de glândulas salivares avaliadas.
- Comparando-se a expressão dos genes entre os três tipos neoplásicos estudados, foi observado que os genes *SMAD2*, *SMAD4* e *c-MYC* apresentaram expressão aumentada nas amostras de CAC e aumento da expressão do gene *ITGB6* nas amostras de CME.
- Associando-se os resultados de expressão gênica com as características demográficas, clínicas e patológicas nos três tipos neoplásicos estudados, apenas nos casos de CME foi observado aumento da expressão do gene *LTBP1* associado a lesões que ocorreram nas glândulas salivares menores.
- Comparando-se a expressão dos genes observados nos neoplásicos estudados com banco de dados públicos, foi observado concordância nos valores de expressão dos genes *TGFβ1*, *ITGB6* e *LTBP1* em amostras de CME e dos genes *ITGB6*, *SMAD2*, *SMAD4*, *FBN1* e *LTBP1* nas amostras de CAC.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aashaq S, Batool A, Mir SA, Beigh MA, Andrabi KI, Shah ZA. TGF- β signaling: A recap of SMAD-independent and SMAD-dependent pathways [published online ahead of print, 2021 Jul 19]. *J Cell Physiol.* 2021;10.1002/jcp.30529.

Abu-Ghanem Y, Mizrachi A, Popovtzer A, Abu-Ghanem N, Feinmesser R. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: Institutional experience and review of the literature. *J. Surg. Oncol.* 2016; 114:714–718.

Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. *Oral Oncol.* 2013 Sep;49(9):845-853.

Adelstein DJ, Koyfman SA, El-Naggar AK, Hanna EY. Biology and Management of Salivary Gland Cancers. *Semin. Radiat. Oncol.* 2012; 22:245–253.

Alaizari NA, Tarakji B, Al-Maweri SA, Al-Shamiri HM, Darwish S, Baba F. p53 expression in pleomorphic adenoma of salivary glands: A systematic review and meta-analysis. *Arch. Oral Biol.* 2015; 60:1437–1441.

Almeslet AS. Pleomorphic Adenoma: A Systematic Review. *Int J Clin Pediatr Dent.* 2020 May-Jun;13(3):284-287.

Aro K, Leivo I, Mäkitie AA. Management and outcome of patients with mucoepidermoid carcinoma of major salivary gland origin: A single institution's 30- year experience. *Laryngoscope* 2008; 118:258–262.

Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. *Cancer* 1992; 69:2021–2030.

Badlani J, Gupta R, Balasubramanian D, Smith J, Luk P, Clark J. Primary salivary gland malignancies: a review of clinicopathological evolution, molecular mechanisms and management. *ANZ J. Surg.* 2018; 88:152–157.

Bahl A, Panda NK, Elangovan A, et al. Evaluation of Multimodality Management of Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. *Indian J. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2019; 71:628–632.

Bandyopadhyay A, Raghavan S. Defining the role of integrin α v β 6 in cancer. *Curr Drug Targets.* 2009 Jul;10(7):645-52.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pathology and genetics of head and neck tumours: salivary glands. 3rd ed. Lyon: IARC; 2005. (WHO Classification of Tumours, v.9, IARC WHO Classification of Tumours, n^o 9).

Barrett AW, Speight PM. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: A valid prognostic indicator? *Oral Oncol.* 2009; 45:936–940.

Belbin TJ, Singh B, Smith RV, Socci ND, Wreesmann VB, Sanchez-Carbayo M, Masterson J, Patel S, Cordon-Cardo C, Prystowsky MB, Childs G. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2005 Jan;131(1):10-8.

Bell D, Hanna EY. Salivary gland cancers: Biology and molecular targets for therapy. *Curr. Oncol. Rep.* 2012; 14:166–174.

Bergkvist A, Rusnakova V, Sindelka R, Garda JM, Sjögreen B, Lindh D, Forootan A, Kubista M. Gene expression profiling--Clusters of possibilities. *Methods.* 2010 Apr;50(4):323-35.

Bhayani MK, Yener M, El-Naggar A, et al. Prognosis and risk factors for early- stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Cancer* 2012; 118:2872–2878.

Bioconductor Open Source Software For Bioinformatics (BioC). 2021. Disponível em: <https://www.bioconductor.org/>.

Bradley PJ. Classification of Salivary Gland Neoplasms. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2016a; 78:1–8.

Bradley PJ. Frequency and Histopathology by Site, Major Pathologies, Symptoms and Signs of Salivary Gland Neoplasms. *Adv. Otorhinolaryngol.* 2016b; 78:9–16.

Bradley PJ. The recurrent pleomorphic adenoma conundrum. *Curr. Opin. Otolaryngol. Head Neck Surg.* 2018; 26:134–141.

Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, et al. Mucoepidermoid carcinoma: A clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am. J. Surg. Pathol.* 2001; 25:835–845.

Budi EH, Duan D, Derynck R. Transforming Growth Factor- β Receptors and Smads: Regulatory Complexity and Functional Versatility. *Trends Cell Biol.* 2017 Sep;27(9):658-672.

Byers PH. Determination of the molecular basis of Marfan syndrome: A growth industry. *J. Clin. Invest.* 2004; 114:161–163.

Cai R, Wang P, Zhao X, Lu X, Deng R, Wang X, Su Z, Hong C, Lin J. LTBP1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through epithelial- mesenchymal transition and cancer-associated fibroblasts transformation. *J Transl Med.* 2020 Mar 26;18(1):139.

Cao Y, Liu H, Gao L, Lu L, Du L, Bai H, Li J, Said S, Wang XJ, Song J, Serkova N, Wei M, Xiao J, Lu SL. Cooperation Between Pten and Smad4 in Murine Salivary Gland Tumor Formation and Progression. *Neoplasia.* 2018 Aug;20(8):764-774.

Chaudhry SS, Cain SA, Morgan A, Dallas SL, Shuttleworth CA, Kielty CM. Fibrillin- 1 regulates the bioavailability of TGF β 1. *J. Cell Biol.* 2007; 176:355–367.

Chen AM, Bucci MK, Weinberg V, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated by surgery with or without postoperative radiation therapy: Prognostic features of recurrence. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2006; 66:152–159.

Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck - An update. *Oral Oncol.* 2015b; 51:652–661.

Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Triantafyllou A, et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 2015a; 272:799–819.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, de Araújo Lima L, Kowalski LP, Soares FA. Expression of apoptosis-regulating miRNAs and target mRNAs in oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet.* 2015;208(7-8):382-389.

Coutinho-Camillo CM, Salaorni S, Sarkis AS, Nagai MA. Differentially expressed genes in the prostate cancer cell line LNCaP after exposure to androgen and anti-androgen. *Cancer Genet Cytogenet.* 2006;166(2):130-138.

Cutler LS. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. *Adv Dent Res.* 1990 Jun;4:27-33.

Da Silva GM, Saavedra V, Ianez RCF, et al. Apoptotic signaling in salivary mucoepidermoid carcinoma. *Head Neck* 2019; 41:2904–2913.

Daa T, Yada N, Kashima K, Suzuki M, Yokoyama S. Alteration of SMAD4 does not participate in tumorigenesis of adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *Mol Med Rep.* 2009 Jan-Feb;2(1):13-5.

Dale AC. Salivary gland. In: Ten Cate AR, editor. *Oral histology*. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1994. Cytoskeleton, junctions, fibroblasts and extracellular matrix; p.57-63 Salivary glands; p.292-9;p.304- 11.

Dalgic A, Karakoc O, Aydin U, Hidir Y, Gamsizkan M, Karahatay S, Gerek M. Minor salivary gland neoplasms. *J Craniofac Surg*. 2014 May;25(3):e289-91.

De Mello Gomes ÁN, Nagai MA, Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM. Apoptosis and proliferation during human salivary gland development. *J Anat*. 2019 Jun;234(6):830-838.

De Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira CT, et al. Salivary gland tumor: A review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol*. 2009; 3:271–275.

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 Jul;300(7):1180-1188.

Deguchi H, Hamano H, Hayashi Y. c-myc, ras p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. *Acta Pathol Jpn*. 1993 Jul-Aug;43(7-8):413-22.

Derynck R, Akhurst RJ, Balmain A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nat Genet*. 2001 Oct;29(2):117-29.

Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- beta family signalling. *Nature*. 2003 Oct 9;425(6958):577-84.

Dhanasekaran R, Deutzmann A, Mahauad-Fernandez WD, Hansen AS, Gouw AM, Felsher DW. The MYC oncogene - the grand orchestrator of cancer growth and immune evasion. *Nat Rev Clin Oncol*. 2021 Sep 10.

Di Villeneuve L, Souza IL, Tolentino FDS, Ferrarotto R, Schvartsman G. Salivary Gland Carcinoma: Novel Targets to Overcome Treatment Resistance in Advanced Disease. *Front Oncol*. 2020 Oct 22;10:580141.

Dillard DG, Muller S, Cohen C, Bloch D, Del Gaudio JM, Gal AA. High tumor grade in salivary gland mucoepidermoid carcinomas and loss of expression of transforming growth factor beta receptor type II. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Jun;127(6):683-6.

Dong L, Ge XY, Wang YX, Yang LQ, Li SL, Yu GY, Gao Y, Fu J. Transforming growth factor- β and epithelial-mesenchymal transition are associated with pulmonary metastasis in adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol.* 2013 Nov;49(11):1051-8.

Dong L, Wang YX, Li SL, Yu GY, Gan YH, Li D, Wang CY. TGF-beta1 promotes migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *J Dent Res.* 2011 Jun;90(6):804-9.

Dossani R, Akbarian-Tefaghi H, Lemonnier L, Mehta V, Jacobsohn J, Guthikonda B. Mucoepidermoid Carcinoma of Palatal Minor Salivary Glands with Intracranial Extension: A Case Report and Literature Review. *J. Neurol. Surg. Reports* 2016; 77:e156–e159.

Dubal PM, Unsal AA, Chung SY, et al. Population-based trends in outcomes in adenoid cystic carcinoma of the oral cavity. *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.* 2016; 37:398–406.

Emmerson E, Knox SM. Salivary gland stem cells: A review of development, regeneration and cancer. *Genesis.* 2018 May;56(5):e23211.

Filho OVO, Rêgo TJRD, Mendes FHO, Dantas TS, Cunha MDPSS, Malta CEN, Silva PGB, Sousa FB. Prognostic factors and overall survival in a 15-year followup of patients with malignant salivary gland tumors: a retrospective analysis of 193 patients. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2020 Aug 4:S1808-8694(20)30116-6.

Fleisch MC, Maxwell CA, Barcellos-Hoff MH. The pleiotropic roles of transforming growth factor beta in homeostasis and carcinogenesis of endocrine organs. *Endocr. Relat. Cancer* 2006; 13:379–400.

Flores BC, Lourenço SV, Damascena AS, Kowalski LP, Soares FA, Coutinho-Camillo CM. Altered expression of apoptosis-regulating miRNAs in salivary gland tumors suggests their involvement in salivary gland tumorigenesis. *Virchows Arch.* 2017 Mar;470(3):291-299.

Flores BCTCP. Avaliação da expressão de microRNAs reguladores da apoptose em tumores de glândula salivar. [Evaluation of apoptosis-regulating microRNAs in salivary gland tumors]. São Paulo, 2015. 74 p. Dissertação(Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Fujii K, Murase T, Beppu S, Saida K, Takino H, Masaki A, Ijichi K, Kusafuka K, Iida Y, Onitsuka T, Yatabe Y, Hanai N, Hasegawa Y, Inagaki H. MYB, MYBL1, MYBL2 and NFIB gene alterations and MYC overexpression in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Histopathology.* 2017 Nov;71(5):823-834.

Garg M, Tudor-Green B, Bisase B. Current thinking in the management of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2019 Oct;57(8):716-721.

Gatta G, Guzzo M, Locati LD, McGurk M, Prott FJ. Major and minor salivary gland tumours. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2020 Aug;152:102959.

Geng Y, Weinberg RA. Transforming growth factor β effects on expression of G1 cyclins and cyclin-dependent protein kinases. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1993; 90:10315–10319.

Gibbons MD, Manne U, Carroll WR, Peters GE, Weiss HL, Grizzle WE. Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Laryngoscope* 2001; 111:1373–1378.

Goel AN, Badran KW, Braun APG, Garrett AM, Long JL. Minor Salivary Gland Carcinoma of the Oropharynx: A Population-Based Analysis of 1426 Patients. *Otolaryngol. - Head Neck Surg. (United States)* 2018; 158:287–294.

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.

Grande JP. Role of transforming growth factor-beta in tissue injury and repair. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1997 Jan;214(1):27-40.

Griffith CC, Schmitt AC, Little JL, Magliocca KR. New Developments in Salivary Gland Pathology: Clinically Useful Ancillary Testing and New Potentially Targetable Molecular Alterations. *Arch Pathol Lab Med.* 2017 Mar;141(3):381-395.

Guzzo M, Locati LD, Prott FJ, Gatta G, McGurk M, Licitra L. Major and minor salivary gland tumors. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010; 74:134–148.

Hahn SA, Schutte M, Shamsul Hoque ATM, et al. DPC4, a candidate tumor suppressor gene at human chromosome 18q21.1. *Science* (80-.). 1996; 271:350– 353.

Hall BE, Zheng C, Swaim WD, Cho A, Nagineni CN, Eckhaus MA, Flanders KC, Ambudkar IS, Baum BJ, Kulkarni AB. Conditional overexpression of TGF-beta1 disrupts mouse salivary gland development and function. *Lab Invest.* 2010 Apr;90(4):543-55.

He S, Li P, Zhong Q, et al. Clinicopathologic and prognostic factors in adenoid cystic carcinoma of head and neck minor salivary glands: A clinical analysis of 130 cases. *Am. J. Otolaryngol. - Head Neck Med. Surg.* 2017; 38:157–162.

Heldin CH, Miyazono K, Ten Dijke P. TGF- β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins. *Nature* 1997; 390:465–471.

Huttenlocher A, Horwitz AR. Integrins in cell migration. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3:1–16.

Ianez RCF, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pinto CAL, Soares FA, Lourenço S V. CD24 and CD44 in salivary gland pleomorphic adenoma and in human salivary gland morphogenesis: Differential markers of glandular structure or stem cell indicators? *Histopathology* 2013; 62:1075–1082.

Ianez RF, Buim ME, Coutinho-Camillo CM, Schultz R, Soares FA, Lourenço SV. Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers. *Histopathology*. 2010 Sep;57(3):410-7.

Izzi L, Attisano L. Regulation of the TGF β signalling pathway by ubiquitin-mediated degradation. *Oncogene*. 2004; 23:2071–2078.

Jain S, Hasan S, Vyas N, Shah N, Dalal S. Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland: Report of a Case With Review of Literature. *Ethiop. J. Health Sci*. 2015; 25:189–194.

Kaartinen V, Warburton D. Fibrillin controls TGF- β activation. *Nat. Genet*. 2003; 33:331–332.

Kahata K, Maturi V, Moustakas A. TGF- β Family Signaling in Ductal Differentiation and Branching Morphogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2018 Mar 1;10(3). pii: a031997.

Kang JS, Liu C, Derynck R. New regulatory mechanisms of TGF-beta receptor function. *Trends Cell Biol*. 2009 Aug;19(8):385-94.

Kar A, Adeniji A, Rao VUS, Ghosh M. Molecular landscape of salivary gland cancers. *Oral Oncol*. 2020 Feb 17:104595.

Kimura ET, Matsuo SE, Ricarte-Filho JC. TGFbeta, activina e sinalização SMAD em câncer de tiróide [TGFbeta, activin and SMAD signalling in thyroid cancer]. *Arq Bras Endocrinol Metabol*. 2007;51(5):683-689.

Kiyoshima T, Shima K, Kobayashi I, et al. Expression of p53 tumor suppressor gene in adenoid cystic and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Oral Oncol*. 2001; 37:315–322.

Kloth JN, Kenter GG, Spijker HS, Uljee S, Corver WE, Jordanova ES, Fleuren GJ, Gorter A. Expression of Smad2 and Smad4 in cervical cancer: absent nuclear Smad4 expression correlates with poor survival. *Mod Pathol*. 2008 Jul;21(7):866-75.

Koivisto L, Bi J, Häkkinen L, Larjava H. Integrin $\alpha\beta 6$: Structure, function and role in health and disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2018; 99:186–196.

Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, Hausamen JE. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck - A 20 years experience. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg*. 2004; 33:25–31.

Krishna A, Singh S, Kumar V, Pal US. Molecular concept in human oral cancer. *Natl J Maxillofac Surg*. 2015 Jan-Jun;6(1):9-15.

Kumari N, Jaynes PW, Saei A, Iyengar PV, Richard JLC, Eichhorn PJA. The roles of ubiquitin modifying enzymes in neoplastic disease. *Biochim. Biophys. Acta - Rev. Cancer*. 2017; 1868:456–483.

Kusafuka K, Yamaguchi A, Kayano T, Takemura T. Immunohistochemical localization of members of the transforming growth factor (TGF)-beta superfamily in normal human salivary glands and pleomorphic adenomas. *J Oral Pathol Med*. 2001 Aug;30(7):413-20.

Lazzereschi D, Nardi F, Turco A, et al. A complex pattern of mutations and abnormal splicing of Smad4 is present in thyroid tumours. *Oncogene*. 2005; 24:5344–5354.

Levy L, Hill CS. Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2006; 17:41–58.

Lingam RK, Dagher AA, Nigar E, Abbas SAB, 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 HB, Huang GJ, Luo MS. Transcriptome analyses identify hub genes and potential mechanisms in adenoid cystic carcinoma. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jan;99(2):e18676.

Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*. 2001;25(4):402-408.

Loeb KR, Loeb LA. Significance of multiple mutations in cancer. *Carcinogenesis*. 2000 Mar;21(3):379-85.

Loeb LA. A mutator phenotype in cancer. *Cancer Res*. 2001 Apr 15;61(8):3230-9.

Lopes MA, Kowalski LP, da Cunha Santos G, Paes de Almeida O. A clinicopathologic study of 196 intraoral minor salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med*. 1999 Jul;28(6):264-7.

Lopes MLD DE S, Barroso KMA, Henriques ÁCG, Dos Santos JN, Martins MD, De Souza LB. Pleomorphic adenomas of the salivary glands: retrospective multicentric study of 130 cases with emphasis on histopathological features. *Eur. Arch. Oto- Rhino-Laryngology* 2017; 274:543–551.

Louredo BVR, Santos-Silva AR, Vargas PA, Ajudarte Lopes M, Martins MD, Guerra ENDS, Prado Ribeiro AC, Brandão TB, de Mendonça RMH, Kowalski LP, Speight PM, Khurram SA, Pérez-de-Oliveira ME. Clinicopathological analysis and survival outcomes of primary salivary gland tumors in pediatric patients: A systematic review. *J Oral Pathol Med*. 2020 Dec 12. Epub ahead of print.

Lourenço SV, Kapas S, Williams DM, Leite K, Araújo VC. Expression patterns of integrins on pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: study on specimens and in vitro investigation of the effects of extracellular matrix on the expression of these adhesion molecules. *J Oral Pathol Med*. 2004 Oct;33(9):574- 80.

Lourenço SV, Kapas S. Integrin expression in developing human salivary glands. *Histochem Cell Biol*. 2005 Nov;124(5):391-9.

Lourenço SV, Lima DM. Pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: in vitro study of the impact of TGFbeta1 on the expression of integrins and cytoskeleton markers of cell differentiation. *Int J Exp Pathol*. 2007 Jun;88(3):191-8.

Lourenço SV, Uyekita SH, Lima DM, Soares FA. Developing human minor salivary glands: morphological parallel relation between the expression of TGF-beta isoforms and cytoskeletal markers of glandular maturation. *Virchows Arch*. 2008 Apr;452(4):427-34.

Lourenco C, Resetca D, Redel C, et al. MYC protein interactors in gene transcription and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2021;21(9):579-591.

Luksic I, Sutton P. Elective neck dissection in adenoid cystic carcinoma of head and neck: yes or no? A systematic review. *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngology* 2019; 276:2957–2962.

Massagué J, Seoane J, Wotton D. Smad transcription factors. *Genes Dev*. 2005; 19:2783–2810.

Massagué J. TGF-beta signal transduction. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:753-91.

Massagué J. TGFβ signalling in context. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 Oct;13(10):616-30.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Cancer* 2012; 118:3928–3936.

Meecham A, Marshall JF. The ITGB6 gene: its role in experimental and clinical biology. *Gene X*. 2019 Nov 6;5:100023.

Meinrath J, Haak A, Igci N, Dalvi P, Arolt C, Meemboor S, Siebolts U, Eischeidt-Scholz H, Wickenhauser C, Grünewald I, Drebber U, Büttner R, Quaas A, Klußmann JP, Odenthal M, Beutner D, Meyer M. Expression profiling on subclasses of primary parotid gland carcinomas. *Oncotarget*. 2020 Nov 10;11(45):4123-4137.

Melnick M, Jaskoll T. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 2000; 11:199–215.

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Malyapa RS, Mendenhall NP. Salivary gland pleomorphic adenoma. *Am. J. Clin. Oncol. Cancer Clin. Trials* 2008; 31:95–99.

Moustakas A, Heldin CH. Non-Smad TGF-beta signals. *J Cell Sci.* 2005 Aug 15;118(Pt 16):3573-84.

Munger JS, Sheppard D. Cross talk among TGF- β signaling pathways, integrins, and the extracellular matrix. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2011; 3:1–18.

Nagano CP, Coutinho-Camillo CM, Pinto CA, Soares FA, Santos F, Fonseca I, Lourenço SV. Cytokeratin immunoprofile of primary and metastatic adenoid cystic carcinoma of salivary glands: a report of two cases. *Autops Case Rep.* 2016 Dec 30;6(4):57-63.

National Center for Biotechnology Information - Gene Expression Omnibus (NCBI-GEO). 2021. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>.

Nesbit CE, Tersak JM, Prochownik EV. MYC oncogenes and human neoplastic disease. *Oncogene.* 1999 May 13;18(19):3004-16.

Öklü R, Hesketh R. The latent transforming growth factor β binding protein (LTBP) family. *Biochem. J.* 2000; 352:601–610.

Orian A, Eisenman RN. TGF-beta flips the Myc switch. *Sci STKE.* 2001 Jun 26;2001(88):pe1.

Patel N, Sharpe PT, Miletich I. Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. *Dev Biol.* 2011 Oct 1;358(1):156- 67.

Patel VN, Rebutini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. *Differentiation.* 2006 Sep;74(7):349-64.

Peraza A, Gómez R, Beltran J, Amarista FJ. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*. 2020 Dec;121(6):713-720.

Perttu MC, Martikainen PM, Huhtala HS, Bläuer M, Tammela TL, Tuohimaa PJ, Syvälä H. Altered levels of Smad2 and Smad4 are associated with human prostate carcinogenesis. *Prostate Cancer Prostatic Dis*. 2006;9(2):185-9.

Porcheri C, Meisel CT, Mitsiadis TA. Molecular and Cellular Modelling of Salivary Gland Tumors Open New Landscapes in Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)*. 2020 Oct 24;12(11):3107.

Porcheri C, Mitsiadis TA. Physiology, Pathology and Regeneration of Salivary Glands. *Cells*. 2019 Aug 26;8(9):976.

Quiñones-Pérez B, VanNoy GE, Towne MC, et al. Three-generation family with novel contiguous gene deletion on chromosome 2p22 associated with thoracic aortic aneurysm syndrome. *Am. J. Med. Genet. Part A*. 2018; 176:560–569.

R Development Core Team. R: A language and environment for statistical computing. 2021. Disponible em: <https://www.r-project.org/>.

Ramoni MF, Sebastiani P, Kohane IS. Cluster analysis of gene expression dynamics. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Jul 9;99(14):9121-6.

Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Stavrianos SD, Faratzis G, Lagogiannis GA, Katsilieris I, Patsouris E. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol*. 2007 Feb;43(2):130-6.

Rifkin D, Sachan N, Singh K, Sauber E, Tellides G, Ramirez F. The role of LTBP3 in TGF beta signaling. *Dev Dyn*. 2021 Mar 20.

Rinaldo A, Ferlito A, Pellitteri PK, Robbins KT, Shaha AR, Bradley PJ, Kowalski LP, Wei WI. Management of malignant submandibular gland tumors. *Acta Otolaryngol.* 2003 Oct;123(8):896-904.

Rito M, Fonseca I. Salivary Gland Neoplasms: Does Morphological Diversity Reflect Tumor Heterogeneity. *Pathobiology* 2018; 85:85–95.

Robertson IB, Horiguchi M, Zilberberg L, Dabovic B, Hadjiolova K, Rifkin DB. Latent TGF- β -binding proteins. *Matrix Biol.* 2015; 47:44–53.

Sanchez-Vega F, Mina M, Armenia J, et al. Oncogenic Signaling Pathways in The Cancer Genome Atlas. *Cell.* 2018; 173:321-337.e10.

Scaffidi AK, Petrovic N, Moodley YP, et al. $\alpha v \beta 3$ integrin interacts with the transforming growth factor β (TGF β) type II receptor to potentiate the proliferative effects of TGF $\beta 1$ in living human lung fibroblasts. *J. Biol. Chem.* 2004; 279:37726–37733.

Schrenk S, Cenzi C, Bertalot T, Conconi MT, Di Liddo R. Structural and functional failure of fibronectin-1 in human diseases (Review). *Int. J. Mol. Med.* 2018; 41:1213– 1223.

Seethala RR. Salivary Gland Tumors: Current Concepts and Controversies. *Surg. Pathol. Clin.* 2017; 10:155–176.

Sheppard D. Integrin-mediated activation of latent transforming growth factor beta. *Cancer Metastasis Rev.* 2005 Sep;24(3):395-402.

Shi M, Zhu J, Wang R, et al. Latent TGF- β structure and activation. *Nature.* 2011; 474:343–351.

Skálová A, Stenman G, Simpson RHW, Hellquist H, Slouka D, Svoboda T, Bishop JA, Hunt JL, Nibu KI, Rinaldo A, Vander Poorten V, Devaney KO, Steiner P, Ferlito A. The Role of

Molecular Testing in the Differential Diagnosis of Salivary Gland Carcinomas. *Am J Surg Pathol*. 2018 Feb;42(2):e11-e27.

Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis*. 2002; 8:229–240.

Su J, Morgani SM, David CJ, Wang Q, Er EE, Huang YH, Basnet H, Zou Y, Shu W, Soni RK, Hendrickson RC, Hadjantonakis AK, Massagué J. TGF- β orchestrates fibrogenic and developmental EMTs via the RAS effector RREB1. *Nature*. 2020 Jan;577(7791):566-571.

Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*. 2021 Feb 4.

Suzuki A, Ogata K, Iwata J. Cell signaling regulation in salivary gland development. *Cell Mol Life Sci*. 2021 Jan 15. Epub ahead of print.

Takada Y, Ye X, Simon S. The integrins. *Genome Biol*. 2007;8(5):215.

Tauriello DVF, Sancho E, Batlle E. Overcoming TGF β -mediated immune evasion in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2022;22(1):25-44.

Taylor ZC, Kaya EA, Bunn JD, Guss ZD, Mitchell BJ, Fairbanks RK, Lamoreaux WT, Wagner AE, Peressini BJ, Lee CM. Overall and cause-specific survival for mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: Analysis of 2210 patients. *World J Clin Oncol*. 2020 Dec 24;11(12):1029-1044.

Teshima THN, Wells KL, Lourenço S V, Tucker A S. Apoptosis in Early Salivary Gland Duct Morphogenesis and Lumen Formation. *J. Dent. Res*. 2016; 95:277–83.

Thiagalingam S. Molecular detection of smad2/sm4 alterations in colorectal tumors. *Methods Mol Med*. 2001;50:149-65.

Todorovic V, Jurukovski V, Chen Y, Fontana L, Dabovic B, Rifkin DB. Latent TGF- β binding proteins. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2005; 37:38–41.

Tseleni-Balafouta S, Gakiopoulou H, Fanourakis G, Voutsinas G, Litsiou H, Sozopoulos E, Balafoutas D, Patsouris E. Fibrillin expression and localization in various types of carcinomas of the thyroid gland. *Mod Pathol.* 2006 May;19(5):695-700.

Tucker AS. Salivary gland development. *Semin Cell Dev Biol.* 2007; Apr;18(2):237-44. Epub 2007 Jan 25.

Valstar MH, De Ridder M, Van den Broek EC, et al. Salivary gland pleomorphic adenoma in the Netherlands: A nationwide observational study of primary tumor incidence, malignant transformation, recurrence, and risk factors for recurrence. *Oral Oncol.* 2017; 66:93–99.

Van Der Wal JE, Leverstein H, Snow GB, Kraaijenhagen HA, Van Der Waal I. Parotid gland tumors: Histologic reevaluation and reclassification of 478 cases. *Head Neck* 1998; 20:204–207.

Wan F, Peng L, Zhu C, Zhang X, Chen F, Liu T. Knockdown of Latent Transforming Growth Factor- β (TGF- β)-Binding Protein 2 (LTBP2) Inhibits Invasion and Tumorigenesis in Thyroid Carcinoma Cells. *Oncol Res.* 2017 Apr 14;25(4):503-510.

Wang J, Chen J, Zhang K, Zhao Y, Nör JE, Wu J. TGF- β 1 regulates the invasive and metastatic potential of mucoepidermoid carcinoma cells. *J Oral Pathol Med.* 2011 Nov;40(10):762-8.

Warner BJ, Blain SW, Seoane J, Massagué J. Myc Downregulation by Transforming Growth Factor β Required for Activation of the p15 Ink4b G 1 Arrest Pathway . *Mol. Cell. Biol.* 1999; 19:5913–5922.

Weiss A, Attisano L. The TGFbeta superfamily signaling pathway. *Wiley Interdiscip. Rev. Dev. Biol.* 2013; 2:47–63.

Westernoff TH, Jordan RC, Regezi JA, Ramos DM, Schmidt BL. Beta-6 Integrin, tenascin-C, and MMP-1 expression in salivary gland neoplasms. *Oral Oncol.* 2005 Feb;41(2):170-4.

Wipff PJ, Hinz B. Integrins and the activation of latent transforming growth factor β 1 - An intimate relationship. *Eur. J. Cell Biol.* 2008; 87:601–615.

Xu D, Li D, Lu Z, Dong X, Wang X. Type III TGF- β receptor inhibits cell proliferation and migration in salivary glands adenoid cystic carcinoma by suppressing NF- κ B signaling. *Oncol Rep.* 2016 Jan;35(1):267-74.

Yin LX, Ha PK. Genetic alterations in salivary gland cancers. *Cancer.* 2016; 122:1822–1831.

Zarbo RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. *Mod Pathol.* 2002 Mar;15(3):298-323.

Zhang X, Cairns M, Rose B, et al. Alterations in miRNA processing and expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland. *Int. J. Cancer* 2009; 124:2855– 2863.

Zhu S, Schuerch C, Hunt J. Review and updates of immunohistochemistry in selected salivary gland and head and neck tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2015 Jan;139(1):55-66.

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



**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **04/08/2020**, **aprovaram** a realização do projeto nº. **2912/20** intitulado: “Avaliação da expressão gênica associada à via de sinalização TGF-β em tumores de glândulas salivares.”

Pesquisadora Responsável: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo
Aluna: Ágatha Nagli de Mello Gomes (**Doutorado**)

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 05 de agosto de 2020.

Atenciosamente,



Luciana Facure Moredo
1ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa