

**A.C.CAMARGO CANCER CENTER
FUNDAÇÃO ANTÔNIO PRUDENTE**

**Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoenxertos
derivados de tumores de glândula salivar**

RAISA FERREIRA COSTA

Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção de Título de Doutor em Ciências

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Co-Orientador: Dr. Tiago Góss dos Santos

São Paulo 2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Ferreira Costa, Raísa .

Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoenxertos derivados de tumores de glândula salivar . / Raísa Ferreira Costa. São Paulo, 2025.

96f.

Tese de Doutorado - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo .

1. Linhagens celulares/Cell lines, 2. Xenoenxertos/Xenografts, 3. Neoplasia de glândulas salivares/Salivary gland neoplasms

CDU 616

Elaboração eletrônica pela Biblioteca A.C.Camargo - Fundação Antônio Prudente.
*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

Nome: Raisa Ferreira Costa

Título: Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoenxertos derivados de tumores de glândula salivar

Aprovado em: _____ / _____ / _____

Banca Examinadora

Orientador: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Coorientador: Tiago Góss dos Santos

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Membro da banca: Marilene Hohmuth Lopes

Instituição: Universidade de São Paulo

Membro da banca: Fernanda Viviane Mariano

Instituição: Universidade de Campinas

Membro da banca: Giovana Tardin Torrezan

Instituição: A.C.Camargo Cancer Center

Membro da banca: Mariana Camargo Maschietto

Instituição: Centro de Pesquisa do Hospital Infantil Boldrini

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), através de auxílio à Pesquisa - [12/04/2021- 04/2025]. [nº 2624/18CEUA 082/18].

DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais, Sônia e Emmanuel (in memoriam), cuja batalha do meu pai contra o câncer despertou em mim a motivação para entender a oncologia e buscar formas de enfrentá-la para ajudar os outros. Aos meus irmãos, Renato e Rafael, cuja incansável dedicação e amor incondicional me guiaram ao longo deste percurso. A vocês, que sempre acreditaram no meu potencial e me deram forças nos momentos mais difíceis, expresso minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de expressar minha profunda gratidão a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha orientadora, Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, pela confiança depositada neste projeto e pela sabedoria compartilhada ao longo de todo o processo. Sua orientação foi fundamental para o meu crescimento acadêmico e profissional.

À Dra. Christine Delporte, minha supervisora internacional, por me proporcionar a oportunidade de continuar este projeto, pela confiança e pelo suporte constante. Sua orientação foi essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

A Kátia, pela dedicação e assistência nos experimentos

Ao meu coorientador, Dr. Tiago Góss dos Santos, pela valiosa expertise em cultura celular e xenoenxertos, que foi crucial para o sucesso deste projeto.

Ao Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto, patologista, por sua colaboração na análise dos resultados e no diagnóstico.

Aos departamentos de Cabeça e Pescoço e Anatomia Patológica, pelo apoio imprescindível no desenvolvimento deste projeto.

À Pós-graduação, pela atenção e suporte ao longo deste período.

Aos meus colegas de grupo – Milena, Ana Luiza, Ágatha, Carolinne, Adriane, Allan e Paula – por todo o conhecimento compartilhado, apoio incondicional e pelas colaborações que tornaram este trabalho ainda mais enriquecedor.

À minha família, que sempre me apoiou, me incentivou e me deu forças para seguir em frente em todos os momentos. Ao meu namorado por estar ao meu lado em todos os momentos dessa jornada. Obrigada pelo carinho, paciência e pelas palavras de encorajamento que me deram força nos dias difíceis. A todos os amigos, que estiveram ao meu lado, oferecendo apoio, amizade e carinho, especialmente nos momentos de maior desafio.

À Capes e à Adenoid Cystic Carcinoma Research Foundation pelo apoio financeiro que possibilitou a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

*“A oncologia une ciência e humanidade.”
-P. Kalanithi*

RESUMO

Costa, RF. **Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoenxertos derivados de tumores de glândula salivar.** [Tese - Doutorado]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2025.

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Apesar dos avanços sólidos alcançados pelas pesquisas, ainda há uma necessidade de investigar biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e prognóstico dessas neoplasias e que expliquem sua evolução e progressão. Considerando que há poucos modelos celulares disponíveis para o estudo de tumores de glândula salivar humanos, o estabelecimento de modelos de cultura primária, esferoides e de xenoenxertos derivados de pacientes (PDX – *Patient-Derived Xenografts*) torna-se fundamental. Esses modelos permitem estudos aprofundados sobre o comportamento das células tumorais, a ativação de vias de sinalização celular e o teste de drogas-alvo. Assim, o objetivo deste estudo, foi estabelecer modelos de cultura primária, esferoides e modelos de xenoenxerto derivado do paciente (PDX) para tumores de glândula salivar. Os pacientes submetidos à cirurgia para excisão dos tumores adenoma pleomórfico (AP), carcinoma adenoide cístico (CAC) e carcinoma mucoepidermoide (CME) foram convidados a participar do estudo. Para a cultura primária, o tecido fresco proveniente de cirurgias realizadas no A.C.Camargo Cancer Center foi dissociado mecanicamente e os fragmentos foram plaqueados e mantidos em cultura. Ensaio de imunocitoquímica foram realizados para caracterização das culturas celulares. As células foram analisadas quanto às taxas de viabilidade celular, migração celular e capacidade de invasão. As culturas primárias estabelecidas de carcinoma adenoide cístico foram utilizadas para desenvolvimento de esferoides em matrigel, hidrogel e suspensão. Para o desenvolvimento dos xenoenxertos, os fragmentos foram implantados em camundongos. O crescimento do tumor foi monitorado periodicamente e, para a caracterização do tumor, foi realizada análise imunoistoquímica, comparando o tecido tumoral dos pacientes e o

tecido tumoral dos modelos de camundongos. Foram incluídos 13 pacientes (5 de adenoma pleomórfico, 5 de carcinoma mucoepidermoide e 3 de carcinoma adenoide cístico). Culturas primárias foram estabelecidas a partir de duas amostras de adenoma pleomórfico e três amostras de carcinoma adenoide cístico. A caracterização imunocitoquímica confirmou a expressão de marcadores epiteliais e mioepiteliais. Ensaios funcionais demonstraram que as células de CAC apresentam maior capacidade de invasão e migração celular em comparação com as células de AP. Foram desenvolvidos modelos esferoide (hidrogel, matrigel e suspensão) a partir das três culturas primárias de CAC. Maior número de esferoides foi observado nos modelos em hidrogel e matrigel em comparação com o modelo em suspensão, enquanto que o tamanho do esferoide foi maior no modelo em suspensão. O modelo PDX foi estabelecido apenas para uma amostra de adenoma pleomórfico, com manutenção das características histológicas semelhantes ao tumor original do paciente, confirmadas por análise imunoistoquímica. A continuidade da pesquisa para o desenvolvimento de modelos é crucial para o avanço de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas para pacientes com tumores de glândula salivar. Com os desafios enfrentados na criação de xenoenxertos, e do estabelecimento de um protocolo eficaz para o cultivo de células tumorais, destacamos a necessidade de explorar novas metodologias e tecnologias para aprimorar a modelagem *in vivo* e *in vitro* desses tumores.

Palavras-chave: tumores de glândula salivar; cultura celular; xenoenxerto; imunoistoquímica.

ABSTRACT

Costa, RF. **Establishment and characterization of cell lines and xenografts derived from salivary gland tumors.** [Thesis-Doctor degree]. São Paulo; Antônio Prudente Foundation; 2024.

Salivary gland tumors comprise a heterogeneous group of lesions, presenting diverse histological characteristics and clinical behavior. Despite solid advances achieved through research, there is still a need to investigate biomarkers that assist in the diagnosis and prognosis of these neoplasms, and that explain their evolution and progression. Considering the limited number of available cell models for the study of human salivary gland tumors, the establishment of primary culture models, spheroids, and patient-derived xenografts (PDX) becomes fundamental. These models allow in-depth studies on tumor cell behavior, activation of cellular signaling pathways, and targeted drug testing. The aim of this study was to establish primary culture models, spheroids, and PDX models for salivary gland tumors. Patients undergoing surgery for excision of pleomorphic adenoma (PA), adenoid cystic carcinoma (ACC), and mucoepidermoid carcinoma (MEC) were invited to participate in the study. For primary culture, fresh tissue obtained from surgeries at A.C.Camargo Cancer Center was mechanically dissociated, and the fragments were plated and maintained in culture. Immunocytochemistry assays were performed for cellular characterization. Cells were analyzed for viability, migration, and invasion capacity. Primary cultures were established from two pleomorphic adenoma samples and three adenoid cystic carcinoma samples. Immunocytochemical characterization confirmed the expression of epithelial and myoepithelial markers. Functional assays demonstrated that ACC cells exhibited greater invasion and migration capacity compared to PA cells. Spheroid models (in hydrogel, Matrigel, and suspension) were developed from the three ACC primary cultures. A higher number of spheroids was observed in hydrogel and Matrigel models compared to the suspension model, while spheroid size was larger in the suspension model. The PDX model was successfully established from only one pleomorphic adenoma sample, maintaining histological characteristics similar to the patient's original tumor, as confirmed by

immunohistochemical analysis. Continuing research to develop models is crucial for advancing more effective and personalized therapeutic strategies for patients with salivary gland tumors. Given the challenges in creating xenografts and establishing effective protocols for culturing tumor cells, we emphasize the need to explore new methodologies and technologies to improve in vivo and in vitro modeling of these tumors. **Keywords:** salivary gland tumors; cell culture; xenografts; immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Representação esquemática do desenvolvimento de modelos *in vivo* e *in vitro* de tumores de glândulas salivares. A partir de fragmentos de tumores coletados no momento cirúrgico é possível o estabelecimento de modelos experimentais de cultura primária e PDX (*Patient-Derived Xenografts*).....7

Figura 2 – Estabelecimento e caracterização dos modelos de tumores de glândula salivar através do desenvolvimento de culturas primárias e xenoenxertos. Os fragmentos coletados no momento cirúrgico são acondicionados em meio de cultura, dissociados mecanicamente e utilizados para a cultura de células e implante nos camundongos. Para caracterização dos modelos *in vitro* (cultura de célula) são realizados ensaios de imunocitoquímica e de comportamento biológico (proliferação, capacidade de invasão e migração celular) e para a caracterização dos modelos *in vivo* (transplantado para camundongos imunodeficientes) são realizados ensaios de imunohistoquímica.....14

Figura 3 – Representação esquemática do procedimento do implante tumoral em camundongos. A) Anestesia dos animais; B) Colocação dos fragmentos tumorais na cânula; C) Implante dos fragmentos no camundongo; D) Crescimento tumoral na região dorsal do camundongo; E) Remoção cirúrgica do tumor; F) Medição do fragmento retirado do camundongo.....15

Figura 4 – Esquema representativo do desenvolvimento e caracterização de modelos esferoide em carcinoma adenoide cístico. Os modelos desenvolvidos em suspensão, hidrogel e matrigel são caracterizados por imunofluorescência e sequenciamento de RNA.....20

Figura 5 – Caracterização do modelo de xenoenxerto de adenoma pleomórfico por imunohistoquímica. Amostra de tecido retirada do tumor do paciente em comparação com os xenoenxertos derivados em diferentes passagens (PDX1,

PDX2 e PDX3). Na coloração por hematoxilina e eosina (HE) da amostra do tumor do paciente AP2 (painel superior esquerdo), observa-se a arquitetura do adenoma pleomórfico, com matriz abundante. Nas seções dos xenoenxertos (PDX1, PDX2, PDX3), observa-se manutenção da arquitetura do xenoenxerto durante as passagens. A análise imunoistoquímica revelou expressão variada de marcadores de células epiteliais e mioepiteliais: AML (citoplasmática) em células mioepiteliais; vimentina (citoplasmática) no estroma e nas células mioepiteliais; AE1/AE3 (citoplasmática) marcando o componente epitelial; CK14 (citoplasmática) em células basais/mioepiteliais e p63 (marcação nuclear) em células mioepiteliais.....27

Figura 6 – Estabelecimento do modelo celular de adenoma pleomórfico. Em A, aspectos histológicos da amostra de adenoma pleomórfico corada por hematoxilina e eosina (HE). B, células de adenoma pleomórfico em cultura demonstrando um padrão morfológico diverso composto por células de padrão fusiforme e estrelado.....28

Figura 7 – Caracterização morfológica e imunofenotípica de células de adenoma pleomórfico (AP2) cultivadas *in vitro*. Células derivadas de adenoma pleomórfico (AP2), cultivadas em monocamada, apresentando morfologia fusiforme e estrelada, compatível com fenótipo mioepitelial. A análise por imunocitoquímica revelou expressão nuclear de p63, indicando perfil de células basais/mioepiteliais; expressão citoplasmática de CK14, reforçando o perfil de células mioepiteliais e basais; expressão nuclear de Ki-67, indicando atividade proliferativa; expressão citoplasmática de vimentina, expressa em células com características mesenquimais/mioepiteliais; e expressão citoplasmática de AML, indicando perfil mioepitelial.....29

Figura 8 – Imagem representativa da avaliação das células de adenoma pleomórfico (AP2) com relação à viabilidade (A), migração (B) e invasão celular (C). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. Em A, a linha preta representa a média dos dados coletados com barras de desvio padrão.....30

Figura 9 - Análise estatística das células de adenoma pleomorfo (AP1) nos ensaios de proliferação e migração. Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. Em A, representa a quantidade de células vivas, partindo de 10^4 células no dia 0. Em B, representa a cicatrização da ferida, partindo de 100% no dia 0. ns: *non-significant*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$30

Figura 10 - Análise estatística dos ensaios de viabilidade e migração celular das células de adenoma pleomorfo (AP2). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. Em A, observa-se o número de células vivas, partindo de 3×10^4 células no tempo 0. Em B, observa-se a taxa de cicatrização da ferida, partindo de 100% no dia 0. ns: *non-significant*; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$31

Figura 11 – Estabelecimento do modelo celular do carcinoma adenoide cístico. A, Aspectos histológicos de uma amostra de carcinoma adenoide cístico em coloração HE; B, fragmento de tecido em cultura e monocamada celular mostrando células com aspecto morfológico fusiforme e estrelado se desprendendo do explante.....32

Figura 12 – Caracterização morfológica e imunofenotípica de células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2 e ACC3) cultivadas *in vitro*. Células derivadas de carcinoma adenoide cístico, cultivadas em monocamada, apresentando morfologia fusiforme e estrelada, compatível com fenótipo mioepitelial. A análise por imunocitoquímica revelou expressão nuclear de p63, indicando perfil de células basais/mioepiteliais; expressão citoplasmática de CK14 e AE1/AE3, reforçando o perfil de células mioepiteliais e basais; expressão de membrana/citoplasmática de c-kit, indicando o perfil de células basais; expressão nuclear de Ki-67, indicando atividade proliferativa; expressão citoplasmática de vimentina, expressa em células com características mesenquimais/mioepiteliais; e expressão citoplasmática de AML, indicando perfil mioepitelial.....32

Figura 13 – Imagem representativa do ensaio de viabilidade celular em células de carcinoma adenoide cístico ((1) ACC1, (2) ACC2 e (3) ACC3, respectivamente). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. A linha preta representa a média dos dados coletados com barras de desvio padrão.....34

Figura 14 – Análise estatística do ensaio de viabilidade celular das células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2 e ACC3). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. O gráfico representa o número de células vivas, partindo de 3×10^4 células no tempo 0. ns: non-significant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$34

Figura 15 – Imagem representativa do ensaio de migração celular (A) e invasão celular (B) em células de carcinoma adenoide cístico (ACC3). As imagens mostram células em diferentes tempos. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 20x.....35

Figura 16 - Análise estatística do ensaio de migração celular das células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2 e ACC3). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. O gráfico representa a cicatrização da ferida, partindo de 100% no tempo 0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$36

Figura 17 – Contagem de esferoides em células de carcinoma adenoide cístico cultivadas em culturas 3D de Suspensão, Hidrogel e Matrigel. ns $p > 0.05$37

Figura 18– Imagem representativa da morfologia dos esferoides formados a partir de células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2, ACC3) sob diferentes condições de cultura: Suspensão, Matrigel e Hidrogel.....38

Figura 19 – Área dos esferoides derivados de células de carcinoma adenoide cístico sob diferentes condições de cultura. Os gráficos apresentam a comparação entre o dia 2 e o dia 4 de cultivo. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$40

Figura 20 – Imagem ilustrativa da tentativa de estabelecimento do modelo celular de carcinoma mucoepidermoide. O fragmento da amostra de carcinoma mucoepidermoide foi cultivado e, após alguns dias da expansão da monocamada de células, houve crescimento predominante de fibroblastos.....41

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Lista dos anticorpos utilizados para a caracterização dos modelos em tumores de glândula salivar: soro primário, clone, fornecedor e título.....17

Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores de glândula salivar.....24

Tabela 3 - Descrição dos tumores implantados nos camundongos para o desenvolvimento dos modelos PDX e armazenamento em cultura.....25

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- AP:** Adenoma pleomórfico (do inglês Pleomorphic Adenoma)
- CME:** Carcinoma Mucoepidermoide (do inglês Mucoepidermoid Carcinoma)
- CAC:** Carcinoma Adenoide Cístico (do inglês Adenoid Cystic Carcinoma)
- PLAG1:** Gene do Adenoma Pleomórfico 1 (do inglês Pleomorphic Adenoma gene 1)
- HMGA2:** Grupo AT-Hook de alta mobilidade (do inglês High Mobility Group AT-Hook 2)
- CK7:** Citoceratina 7 (do inglês Cytokeratin 7)
- CA-EX-AP:** Carcinoma ex-adenoma pleomórfico (do inglês Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma)
- CRTC1,3-MAML2:** Coativador Transcricional Regulador de CREB 1,3 - Mastermind como Coativador Transcricional 2 (do inglês CREB-regulated transcription coactivator - mastermind-like coactivator Transcricional 2)
- EGF/EGFR:** Fator de crescimento Epidérmico/ Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (do inglês Epidermal growth factor / Epidermal growth factor receptor)
- PI3K/AKT:** Fosfoinosítídeo 3-quinase/Proteína Quinase B (do inglês The phosphatidylinositol3' -kinase/ Protein kinase B)
- BCL-2:** Linfoma de células B 2 (do inglês B-cell lymphoma)
- CD117:** Cluster de diferenciação 117 (do inglês Cluster of differentiation 117)
- PDX:** Xenoenxertos derivados de pacientes (do inglês Patient derived xenografts)
- NSG:** camundongos NOD Scid Gamma
- DMEM:** Meio de Águia Modificado por Dulbecco (do inglês Dulbecco's Modified EagleMedium)
- PBS:** Solução Salina Tamponada com Fosfato (do inglês Phosphate Buffered Saline)
- DAB:** 3,3' – Diaminobenzidina (do inglês Diaminobenzidine)
- DMSO:** Dimetilsulfóxido (do inglês Dimethyl sulfoxide)
- DNA:** Ácido desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic acid)
- RNA:** Ácido ribonucleico (do inglês Ribonucleic acid)

APOA-1: Apolipoproteína A-I (do inglês apolipoprotein A-1)

HP: Haptoglobina (do inglês Haptoglobin)

SYCP1: Proteína do complexo sinaptonêmico 1 (do inglês Synaptonemal 1 complex protein)

SLC4A1: Proteína transportadora de ânions da banda 3 (do inglês Band 3 anion transport protein)

AP1M1: Subunidade μ 1 do complexo AP-1 (do inglês μ 1 subunit of the AP1 complex)

HBB: Subunidade beta da hemoglobina (do inglês Hemoglobin beta subunit)

DCD: Dermcidina (do inglês Dermcidin)

LncRNA: RNA longo não codificante (do inglês Long noncoding RNAs)

sEcad: E-caderina solúvel (do inglês shedded E-cadherin)

HER-2: Receptor do Fator de Crescimento Epitelial Humano 2 (do inglês Human Epidermal growth factor Receptor-type 2)

cAMP: Monofosfato de adenosina cíclico (do inglês Adenosine 3',5'-cyclic monophosphate)

MAPK/ERK: Proteína quinase ativada por mitógeno/quinase relacionada ao sinal extracelular (do inglês Mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase)

MMP-2: Metaloproteinases 2 (do inglês Metalloproteinase 2)

COMP: Proteína da Matriz Oligomérica da Cartilagem (do inglês Cartilage Oligomeric MatrixProtein)

EGR1: Resposta de Crescimento Inicial-1 (do inglês Early growth response protein 1)

CLDN7: Claudina 7 (do inglês Claudin 7)

EMT: Transição Epitélio-Mesenquimal (do inglês Epithelial–mesenchymal transition)

MTT: (do inglês 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl) -2,5-diphenyl-2h-tetrazolium·bromide)

α -SMA: Actina alfa do músculo liso (do inglês Alpha Smooth Muscle Actin)

HBSS: Solução salina equilibrada de Hank (do inglês Hank's Balanced Salt Solution)

HDAC: Histona desacetilase (do inglês Histone deacetylases)

FFPE: Fixadas em formalina e embebidas em parafina (do inglês Formalin-fixed

paraffin-embedded)

MSI: Instabilidade de microssatélites (do inglês Microsatellite instability)

TRG: Taxa de resposta global (do inglês Overall response rate)

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	1
1.2 Revisão de literatura.....	2
1.2.1 Glândulas salivares.....	2
1.2.3 Tumores de glândulas salivares.....	3
1.2.3 Modelos experimentais.....	6
1.2.4 Cultura celular primária 2D e 3D.....	7
1.2.5 Xenoenxertos derivados de pacientes-PDX.....	9
2 JUSTIFICATIVA.....	11
3 OBJETIVOS.....	12
3.1 Objetivos gerais.....	12
3.2 Objetivos específicos.....	12
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	13
4.1 Casuística.....	13
4.2 Desenvolvimento dos xenoenxertos.....	14
4.2.1 Caracterização dos models PDX.....	15
4.3 Culturas primárias.....	16
4.3.1 Caracterização das culturas.....	16
4.3.1.1 Imunocitoquímica.....	16
4.3.1.2 Ensaio de proliferação celular.....	18
4.3.1.3 Ensaio de migração celular.....	18
4.3.1.4 Ensaio de invasão celular.....	18
4.4 Desenvolvimento de esferoides	19
4.5 Análise estatística.....	21
5. RESULTADOS.....	22
5.1 Casuística.....	22

5.2 Xenoenxertos.....	25
5.3 Culturas primárias.....	26
5.3.1 Adenoma pleomórfico.....	26
5.3.2 Carcinoma adenóide cístico.....	31
5.3.2.1 Desenvolvimento de esferoides.....	36
5.3.3 Carcinoma mucoepidermoide.....	40
6 DISCUSSÃO.....	42
6.1 Estabelecimento de culturas primárias e imunocitoquímica.....	42
6.1.1 Adenoma pleomórfico.....	42
6.1.2 Carcinoma adenoide cístico.....	45
6.2 Estabelecimento de xenoenxertos e imunoistoquímica.....	47
6.3 Desenvolvimento de Esferoides.....	50
6.3 Carcinoma mucoepidermoide.....	51
7 CONCLUSÃO.....	53
8 REFERÊNCIAS.....	54
ANEXOS.....	64
Anexo A- Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP.....	64
Anexo B- Documento com a publicação do resumo do projeto de doutorado no livro <i>Genética à serviço da sociedade</i>	65
Anexo C- Documento com a publicação do artigo de revisão no <i>Head and NeckPathology</i>	66
Anexo D – Documento com a publicação do artigo de revisão no <i>Journal of HerbalMedicine</i> com parceria com a Dra. Francine Cadoná.....	67
Anexo E – Documento da aprovação do doutorado sanduíche pelo	

edital CAPES/PDSE 2024.....	68
Anexo F – Documento com a parceria na Universidade Libre de Bruxelles com a Dra.Christine Delporte, no projeto de organoides de carcinoma adenoide cístico.....	69
Anexo G – Documento de declaração de estágio prático e observacional no Laboratório de Histologia, Macroscopia, Citologia e imunoquímicas no A.C.Camargo Cancer Center.....	70
Anexo H – Documentos de declaração de Monitorias de disciplinas. Oncogenética, Bioética e Métodos e Estratégias em Biologia Molecular e suas Aplicações na Pesquisa do Câncer.....	71
Anexo I – Documento de declaração de Monitoria de Aluno da Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo.....	72

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de glândulas salivares representam um grupo heterogêneo de neoplasias que ocorrem nas glândulas salivares maiores e menores. Esses tumores variam amplamente em termo de comportamento biológico, desde lesões benignas até malignas. Além disso, a raridade desses tumores e a diversidade de subtipos histológicos dificultam o desenvolvimento de tratamentos padronizados e eficazes, além da falta de existência de linhagens celulares comercialmente disponíveis.¹⁻⁸ Assim, o estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoenxertos de tumores de glândulas salivares são áreas cruciais da pesquisa oncológica, possibilitando uma melhor compreensão da biologia tumoral e o desenvolvimento de novas terapias.^{5,9-12}

Entre os diversos tipos de tumores que afetam as glândulas salivares, destacam-se o adenoma pleomórfico, o carcinoma mucoepidermoide e o carcinoma adenoide cístico, cada um apresentando desafios únicos e características distintas. O adenoma pleomórfico (AP), é o tumor benigno mais comum das glândulas salivares (60%), possuindo uma natureza altamente heterogênea, refletida em sua diversidade morfológica, estrutural e comportamento biológico. A criação de modelos *in vitro* e *in vivo* desse tumor, permite a investigação detalhada de seus componentes celulares, variações histomorfológicas e moleculares, facilitando a identificação de biomarcadores relevantes para diagnóstico, prognóstico e transformação maligna.¹³⁻¹⁸

O carcinoma mucoepidermoide e o carcinoma adenoide cístico, os tipos malignos mais frequentes (15% e 10%, respectivamente), apresentam variabilidade histológica e comportamento clínico imprevisível, com tendência a metástases. O carcinoma adenoide cístico apresenta um desafio para o diagnóstico, além do tratamento mais agressivo, que causa maior impacto ao paciente em comparação ao carcinoma mucoepidermoide, que geralmente apresenta casos de grau baixo ou intermediário. O desenvolvimento de linhagens celulares, esferoides e xenoenxertos para estes carcinomas mimetiza o seu comportamento, ajudando a entender a complexidade morfológica e estrutural, preservando as alterações genéticas e características do tumor original o que possibilita avançar na descoberta de

novos alvos terapêuticos. Um diagnóstico correto e uma classificação histológica adequada resultam em um tratamento mais eficaz e um prognóstico melhorado.¹⁹⁻²³

Nesse contexto, a criação e análise de linhagens celulares, esferoides e xenoenxertos fornece uma plataforma robusta para estudos comportamentais e moleculares. Esses modelos permitem entender as alterações genéticas e desenvolver estratégias terapêuticas, contribuindo para o avanço do conhecimento e tratamento dos tumores das glândulas salivares.^{9,10,24-26}

Assim, o objetivo deste trabalho é estabelecer e caracterizar linhagens celulares, esferoides e modelos de xenoenxertos de adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico e, desta forma, esperamos contribuir para a melhoria do prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes afetados por esses tipos raros e complexos de câncer de glândulas salivares.

1.2 Revisão de literatura

1.2.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares são órgãos pertencentes ao complexo orofacial, compostas por um conjunto de glândulas exócrinas especializadas na produção e secreção de saliva.²⁷⁻²⁸ A saliva protege a cavidade oral e os dentes, além de facilitar a deglutição.²⁷⁻²⁸ As glândulas salivares são classificadas em glândulas maiores (glândulas parótida, sublingual e submandibular) e as glândulas menores distribuídas pela cavidade oral. As glândulas são envoltas pelo estroma e formadas por um sistema de ductos e ácinos. As células acinares produzem a saliva, os ductos preparam a saliva e as células mioepiteliais presentes dentro da membrana basal, facilitam a secreção da saliva.²⁷

Diversos fatores, como a exposição à radiação, uso prolongado de produtos químicos (como cigarro e álcool), doenças autoimunes (Síndrome de Sjögren), infecções virais (como Epstein-Barr) e câncer, podem comprometer a

função salivar, impactando negativamente a fala, o paladar e a função alimentar.^{4,29,30} Em relação ao câncer das glândulas salivares, embora não haja fatores de risco específicos tão bem definidos quanto para outros tipos de câncer, a exposição prolongada a certos agentes químicos e à radiação é conhecida por aumentar o risco dessas neoplasias.²⁹ O carcinoma mucoepidermoide (CME) é a malignidade mais comum das glândulas salivares associada à exposição à radiação. Por outro lado, o carcinoma de células escamosas está relacionado ao consumo de tabaco e álcool. Condições autoimunes, como a síndrome de Sjögren, podem predispor um indivíduo a desenvolver malignidades nas glândulas salivares, como linfoma.³¹

1.2.2 Tumores de glândulas salivares

Os tumores de glândulas salivares, sendo pouco frequentes, representam apenas 3 a 6% dos tumores de cabeça e pescoço.^{3,32,33} A incidência varia de 0.4 a 13.5 casos por 100.000 habitantes, dependendo do sexo e da idade.^{3,32} Esses tumores são extremamente heterogêneos em termos de histologia, comportamento e origem.³ A glândula parótida é a mais comumente afetada, seguida pelas glândulas submandibulares e glândulas menores do palato.^{3,4,34} Os tumores mais prevalentes incluem o adenoma pleomórfico (AP), o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o carcinoma adenoide cístico (CAC).^{27,35}

Tumores benignos representam 70% de todos os tumores de glândula salivar, geralmente formando uma massa nodular encapsulada, geralmente indolor. Dormência e perda da função motora são sintomas associados a tumores mais agressivos, sendo a dor observada mais raramente e associada à transformação maligna. Além disso, a presença de cápsula incompleta ou ausente dificulta a diferenciação entre tumores benignos e malignos, aumentando o risco de recorrência e potencial transformação maligna destacando a importância de um monitoramento rigoroso e contínuo.^{3,32,36,37}

A incidência anual estimada dos tumores malignos de glândula salivar é de 1 caso por 100,000 habitantes, representando cerca de 21-46% dos casos.

Os tumores malignos são geralmente de alto grau, sintomáticos, alta taxa de proliferação e capacidade metastática. O comportamento metastático afeta o nervo facial, além de atingir os linfonodos cervicais, pulmões, fígado e ossos. Usualmente a abordagem terapêutica requer ressecção cirúrgica e em alguns casos, a radioterapia também é utilizada.^{27,38-40} A radioterapia é recomendada nos casos de estágio avançado do tumor, tumores de alto grau, invasão perineural ou linfovascular, margens de ressecção próximas ou positivas, extensão extra-parotídea ou envolvimento de linfonodos. Esses fatores indicam a necessidade de uma abordagem mais agressiva para o tratamento, visando controlar a progressão da doença e melhorar o prognóstico do paciente.²⁰ A taxa de sobrevivência de pacientes é de 71% em 5 anos, dependendo do tipo de tumor, local de origem, agressividade e estágio. A migração para tecidos adjacentes, região perineural e nervo aumenta a porcentagem de falha no tratamento.²⁷ No entanto, casos de tumores irresssecáveis são frequentemente considerados incuráveis, e a quimioterapia, embora utilizada, demonstra eficácia variável com resultados contraditórios.^{38,40}

O adenoma pleomórfico é a neoplasia mais comum, representando 70% dos crescimentos anormais das glândulas salivares, com predileção nas glândulas parótidas.^{13,41} Esse tumor tem histologia de células bifásicas, composta por células epiteliais e mioepiteliais dispersas em uma matriz com diferenciação variada.⁴² A translocação do gene do adenoma pleomórfico 1 (*PLAG1*) é específica desse tumor, representando 60 a 80% dos casos, além outros genes como grupo AT-Hook 2 de alta mobilidade (*HGMA2*) (10 a 30%) e de outros marcadores imunohistoquímicos como citoceratina 7 (CK7), p63 e vimentina que auxiliam no diagnóstico destes tumores.^{15,18,43-45} Além disso, a abordagem terapêutica inclui a excisão cirúrgica e o monitoramento de longo prazo para detecção precoce de recorrência e possíveis transformações malignas, como o carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CA-ex-AP).^{46,47}

O carcinoma mucoepidermoide representa cerca de 15% de tumores de glândulas salivares e ocorre predominantemente nas glândulas parótidas, formado por células mucosas, células intermediárias e células epidermóides. Para a determinação do grau histológico são consideradas características como a arquitetura cística, taxa de mitose, invasão perineural, necrose e grau

de atipia citológica.²⁰ Nos tumores de baixo grau, predominam as células mucosas e as lesões são mais císticas. Nos tumores de alto grau, as células epidermoides predominam e as lesões tendem a ser mais sólidas. Também podem ser observadas lesões necróticas e invasão do tecido neural e ósseo adjacente.^{19,20} Proteínas de fusão derivadas de rearranjo cromossômico constituem um importante fator de diagnóstico e prognóstico como *CRTC1,3::MAML2* (Coativador Transcricional Regulador de CREB 1,3-Mastermind como coativador transcricional 2) (30 a 40% dos casos), além dos marcadores imunohistoquímicos como o Ki-67 na avaliação da proliferação celular e importantes vias de sinalização como Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) e o Fosfoinosítídeo 3-quinase/Proteína Quinase B (*PI3K/AKT*) na progressão tumoral.^{18,43,48} A abordagem terapêutica inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia. Porém, a eficácia é relativa em diferentes estágios da doença e do grau histológico. Tumores de grau histológico intermediário ainda apresentam um prognóstico incerto, o que torna desafiador definir se a abordagem terapêutica deve ser mais agressiva, como nos casos de alto grau, ou menos intensa, como nos tumores de baixo grau.^{20,49}

O carcinoma adenoide cístico representa 10% de tumores de glândula salivar, com uma incidência anual de 3-4.5 casos por 100,000 habitantes.^{50,51} Histopatologicamente, o carcinoma adenoide cístico (CAC) é caracterizado pela proliferação de células ductais e mioepiteliais em padrões tubulares, cribriformes ou sólidos. Além disso, o CAC é conhecido por sua invasão perineural e envolvimento do nervo facial, resultando em dor e paralisia, com alta incidência de recorrências locais e metástases à distância.²² Os tratamentos recomendados incluem excisão cirúrgica e radioterapia.⁵² Apesar dessas opções de tratamento, os tumores recidivados são frequentemente incuráveis. Alterações moleculares, como a translocação resultante da fusão do gene *MYB::NFIB* (70% dos casos) ou mutações na via *Notch* (10 a 20%) e em adição a morfologia das células luminiais e abluminiais dispostas em túbulos, são fatores auxiliares no diagnóstico. A importância do c-Kit/CD117 (cluster de diferenciação 117) na diferenciação e agressividade tumoral também contribui para a compreensão desses tumores.^{1,13,53-55} Assim, a complexidade desses tumores e a falta de terapias eficazes reforçam a necessidade de pesquisas adicionais e o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas

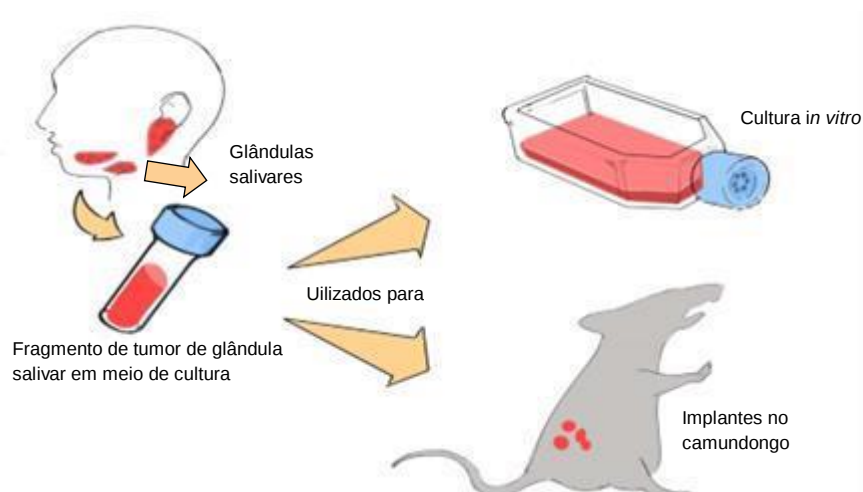
personalizadas. A utilização de modelos experimentais é crucial para melhorar o prognóstico e a qualidade de vida dos pacientes afetados.

1.2.3 Modelos experimentais

Os tumores de glândulas salivares são reconhecidos por sua histologia heterogênea, marcada por variações na expressão gênica e nas vias moleculares envolvidas. Essa complexidade dificulta a padronização de modelos clínicos eficazes, tornando o desenvolvimento de abordagens terapêuticas personalizadas um desafio.^{1,3}

A abordagem terapêutica inicial geralmente envolve ressecção cirúrgica seguida de radioterapia, sendo esta última essencial para casos de alto risco.^{56,57} No entanto, para casos metastáticos, a eficácia da quimioterapia é limitada, evidenciando a necessidade urgente de novas estratégias terapêuticas baseadas em modelos experimentais mais precisos e representativos.^{2,9} Devido à raridade desses tumores e consequente escassez de dados clínicos, torna-se desafiadora a avaliação de novas abordagens terapêuticas.^{1,58} Para superar essas limitações, os modelos de *Patient-Derived Xenografts* (PDX) têm se destacado. Esses modelos consistem na implantação de fragmentos tumorais humanos em camundongos imunodeficientes, permitindo que o tumor mantenha suas características histológicas e genéticas originais.^{10,24} Além dos PDXs, as culturas celulares primárias provenientes de tumores de glândulas salivares têm sido uma ferramenta crucial. Estas culturas permitem estudar o comportamento das células tumorais *in vitro*, analisar mutações genéticas e avaliar a resposta a diferentes agentes terapêuticos em um ambiente controlado (Figura 1).^{5,59}

O desenvolvimento de modelos experimentais, aliado aos avanços moleculares, proporciona uma base sólida para o desenvolvimento futuro de terapias direcionadas. Esse progresso tem o potencial de, futuramente, melhorar a qualidade de vida dos pacientes, ao possibilitar a identificação e validação de drogas-alvo específicas para o tratamento de tumores das glândulas salivares.⁹



Fonte: Autoria própria

Figura 1 - Representação esquemática do desenvolvimento de modelos *in vivo* e *in vitro* de tumores de glândulas salivares. A partir de fragmentos de tumores coletados no momento cirúrgico é possível o estabelecimento de modelos experimentais de cultura primária e PDX (*Patient-Derived Xenografts*).

1.2.4 Cultura celular primária 2D e 3D

Os testes em cultura de células *in vitro* representam uma ferramenta essencial para o estudo da mutagênese e carcinogênese, oferecendo vantagens significativas como facilidade, rapidez, segurança e boa correlação com resultados de estudos *in vivo*.^{60,61}

No contexto dos tumores das glândulas salivares, onde linhagens celulares comerciais não estão disponíveis, diversas pesquisas têm se dedicado ao estabelecimento de linhagens celulares a partir de espécimes cirúrgicos frescos para entender o comportamento tumoral e viabilizar estudos iniciais para futuras terapias. Por exemplo, Lee et al.⁶², Warner et al.⁶ e Zhang et al.⁷ contribuíram significativamente para o desenvolvimento de linhagens celulares específicas de tumores de glândula salivar como carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico. Estudos como os de Lourenço et al.^{63,64} focaram particularmente no carcinoma adenóide cístico, explorando características morfológicas, marcadores imunofenotípicos e o comportamento

tumoral em cultura primária. Recentemente, Takada et al.⁵ também utilizaram métodos de cultura celular para investigar o carcinoma adenoide cístico, permitindo análises detalhadas da ultraestrutura tumoral, expressão de marcadores de pluripotência e resposta a drogas antitumorais *in vitro*.

Os modelos *in vitro* variam em complexidade, desde modelos bidimensionais (2D) até tridimensionais (3D). Os componentes 3D são estratificados e mimetizam os compartimentos das glândulas salivares, funcionando como materiais de enxerto adequados, uma vez que a morfologia, fisiologia e fisiopatologia recapitem a arquitetura e assinatura genética *in vivo*. Além disso, a avaliação funcional pode ser melhor investigada em modelos de cultura 3D.^{65,66} Atualmente, extensas pesquisas estão sendo realizadas sobre modelos para aplicações clínicas, a fim de permitir o desenvolvimento de abordagens de medicina personalizada. Organoides orais, por exemplo, têm sido explorados como uma estratégia para restaurar e manter a secreção salivar normal, ajudando a preservar a homeostase oral funcional.^{65,66} Os organoides de glândulas salivares possuem estruturas semelhantes a ácinos e ductos, oferecendo uma solução inovadora para a xerostomia, que é a causa de várias morbidades, além da capacidade de restaurar a função das glândulas danificadas por radiação.⁶⁶⁻⁷⁰

Os organoides geralmente são cultivados em Matrigel ou equivalentes, que exibem uma composição semelhante ao tecido e diferenciação celular, mimetizando o ambiente extracelular. No entanto, o Matrigel é produzido a partir da purificação de extratos da matriz extracelular do tumor Engelbreth–Holm–Swarm (EHS) de camundongos o que traz algumas desvantagens, como o custo elevado e a menor capacidade de personalização. Além disso, por ser derivado de fontes animais, pode apresentar variação entre lotes, o que pode influenciar a reprodutibilidade dos experimentos.⁶⁶ Hidrogéis, por sua vez, são materiais à base de água que oferecem uma série de vantagens nos modelos de organoides, incluindo maior controle sobre as propriedades físicas e químicas, personalização para culturas celulares específicas, fornecimento de sinais bioquímicos e biomecânicos específicos às células, menor risco de contaminação por patógenos e biocompatibilidade.⁶⁷⁻⁷⁰ Exemplos de biomoléculas que formam os polímeros solúveis em água usados para a produção de hidrogéis incluem a quitosana, colágeno, ácido hialurônico e

fibronectina. Essas biomoléculas podem ser modificadas para se adequar melhor aos requisitos específicos de cultivo celular.⁶⁷⁻⁷⁰

Poucos modelos de esferoides e organoides de carcinoma adenóide cístico (CAC) foram estabelecidos, utilizando Matrigel ou Cultrex.⁷¹⁻⁷⁵ Portanto, o estabelecimento e a utilização de modelos de cultura primária e esferoides de células tumorais das glândulas salivares neste estudo, permitirá avançar na compreensão do comportamento celular desses tumores, na identificação de potenciais alvos terapêuticos e na avaliação de novas estratégias de tratamento.

1.2.5 Xenoenxertos derivados de pacientes - PDX

A utilização do modelo de *Patient-Derived Xenografts* (PDX) representa um avanço significativo na pesquisa translacional dos tumores de glândulas salivares. Este modelo envolve a implantação de fragmentos tumorais derivados de pacientes em camundongos imunodeficientes, permitindo que os tumores cresçam e se desenvolvam preservando as características genéticas e fenotípicas dos tumores originais.^{76,77} Hoge et al.⁷⁸ demonstraram que o genoma dos modelos PDX preserva 90% das características genéticas dos tumores originais, o que fortalece sua relevância na pesquisa translacional. Além disso, a criação de novas linhagens de camundongos imunodeficientes, como NOD Scid Gamma (NSG) por Shultz et al.⁷⁹, tem contribuído para melhorar a fidelidade e aplicabilidade desses modelos.

Contudo, os modelos PDX apresentam algumas desvantagens significativas que devem ser consideradas, como uma grande variabilidade em termos de sucesso de crescimento (entre 30-50%) e tempo, podendo levar até 12 meses para se desenvolver.⁸⁰ Por exemplo, Keysar et al.⁸¹ realizaram enxertia de carcinoma de células acinares em camundongos e identificaram alterações genômicas e de expressão gênica associadas com recorrências tardias e metástases. Além disso, Pearson et al.⁸² observaram mudanças

epigenéticas em carcinoma de células epidermóides e carcinoma adenoide cístico nos modelos PDX, especialmente quando ocorre a substituição por estroma murino. Com o aumento do número de passagens e do tempo, também foi notado um aumento no pleomorfismo nuclear e alterações histopatológicas, além de uma diminuição no número de células imunológicas e tecido do estroma por passagem, permitindo que o tumor cresça mais rapidamente e apresente um padrão mais agressivo nas amostras.

Apesar dessas limitações, os modelos PDX continuam sendo uma ferramenta crucial para estudar a biologia tumoral, identificar biomarcadores relevantes e avaliar a eficácia de novas terapias para carcinomas de glândulas salivares.^{76,84,85} Esses modelos proporcionam um ambiente experimental que reflete as características dos tumores humanos, oferecendo oportunidades de estudo que podem ser traduzidos para o desenvolvimento de tratamentos mais eficazes e personalizados para pacientes com esses tipos de câncer.⁸¹

2 JUSTIFICATIVA

Os tumores de glândula salivar, como o carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide cístico e adenoma pleomórfico, representam uma pequena fração dos tumores de cabeça e pescoço, porém são complexos devido à sua grande heterogeneidade, manifestando uma ampla gama de lesões distintas. Isso confere um desafio significativo tanto no diagnóstico quanto no desenvolvimento de tratamentos eficazes para essas neoplasias.

A abordagem primária para o tratamento dessas neoplasias é a cirurgia, frequentemente seguida por radioterapia em casos de alto risco. Contudo, o papel da quimioterapia ainda é controverso, devido à limitação de opções eficazes para tumores irresssecáveis. Num contexto ideal, as terapias personalizadas e as terapias-alvo apresentam oportunidades terapêuticas promissoras, ressaltando a importância crucial de identificar alterações moleculares específicas e compreender o seu papel na progressão tumoral.

Para avançar nessa área, é essencial o desenvolvimento de modelos pré-clínicos robustos, como xenoenxertos, culturas primárias e esferoides. Esses modelos replicam com maior precisão as características dos tumores humanos, possibilitando um estudo detalhado de suas propriedades biológicas e respostas terapêuticas. Além de proporcionar um ambiente controlado para investigar perfis de expressão gênica, estes modelos têm potencial para gerar amostras suficientes para partilha entre investigadores e pesquisadores, acelerando o progresso na compreensão e tratamento desses tumores.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos gerais

O estabelecimento e caracterização de modelos *in vitro* e *in vivo* derivados de tumores de glândula salivar

3.2 Objetivos específicos

3.2.1 Estabelecimento de culturas primárias derivados de tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico)

3.2.2 Caracterização das culturas primárias por imunocitoquímica

3.2.3 Caracterização das culturas com relação ao comportamento biológico (taxas de proliferação, capacidade de invasão, migração celular)

3.2.4 Estabelecimento de xenoenxertos derivados de tumores de glândula salivar (adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico)

3.2.5 Caracterização dos xenoenxertos por imunoistoquímica

3.2.6 Estabelecimento de esferoides derivados de carcinoma adenoide cístico em modelos de suspensão, hidrogel e matrigel

3.2.7 Caraterização e comparação dos modelos de esferoides (suspensão, hidrogel e matrigel) com relação à quantidade e tamanho

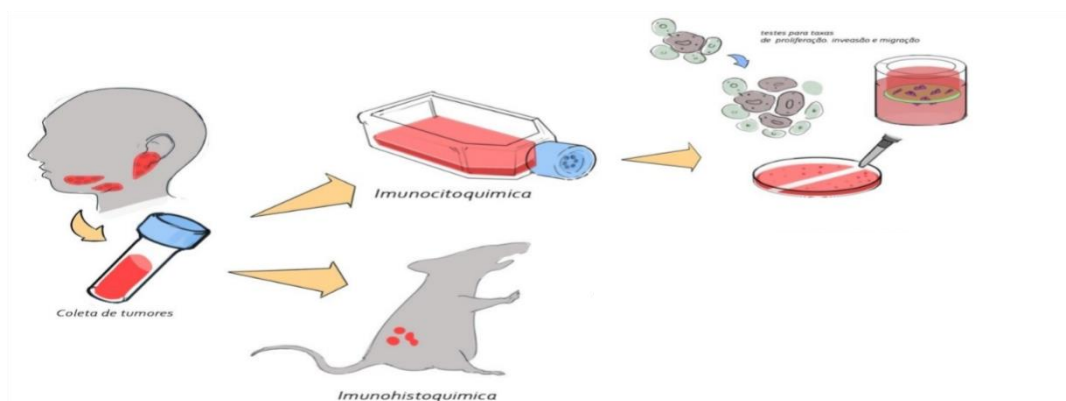
4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Casuística

Os pacientes com tumores de glândula salivares dos subtipos histológicos mais frequentes, com cirurgia programada no A.C.Camargo Cancer Center, foram convidados a participar do estudo após a leitura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Foram incluídos pacientes que assinaram o TCLE e que não tenham se submetido a terapias prévias (quimioterapia ou radioterapia). Foram incluídos 13 pacientes (5 de adenoma pleomórfico, 5 de carcinoma mucoepidermoide e 3 de carcinoma adenoide cístico).

Após o procedimento cirúrgico, fragmentos do tumor foram separados por um patologista e acondicionados em tubos com meio de cultura Meio de Eagle Modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco #41965-839). Esses fragmentos foram utilizados para as análises *in vitro* e *in vivo* descritas posteriormente (Figura 2).

Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada caso foram coletados dos prontuários arquivados no SAME do A.C.Camargo Cancer Center. A realização deste estudo foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (protocolo número 2624/18).



Fonte: Autoria própria

Figura 2 - Estabelecimento e caracterização dos modelos de tumores de glândula salivar através do desenvolvimento de culturas primárias e xenoenxertos. Os fragmentos coletados no momento cirúrgico são acondicionados em meio de cultura, dissociados mecanicamente e utilizados para a cultura de células e implante nos camundongos. Para caracterização dos modelos *in vitro* (cultura de célula) são realizados ensaios de imunocitoquímica e de comportamento biológico (proliferação, capacidade de invasão e migração celular) e para a caracterização dos modelos *in vivo* (transplantado para camundongos imunodeficientes) são realizados ensaios de imunohistoquímica.

4.2 Desenvolvimento dos xenoenxertos

Foram utilizados camundongos imunodeficientes NOD Scid Gamma - NSG (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, EUA) com idade média entre 6 e 12 semanas para os experimentos de PDX (Patient derived xenograft). Estes animais são criados e fornecidos pelo Biotério do A.C.Camargo Cancer Center. Os procedimentos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (“Plataforma de estudo de tumores raros e menos comuns baseados em xenoenxertos derivados de pacientes – CEUA 082/18”). Fragmentos do tumor (medindo entre 1 e 3 mm) obtidos dos pacientes no momento cirúrgico foram implantados subcutaneamente no dorso dos camundongos NSG através de uma cânula, após anestesia com injeção intraperitoneal de Cetamina (Ketamin-S, Cristália) e Xilazina (Ronpun, Bayer) na concentração de 100 mg/kg e 10mg/kg, respectivamente. Um a cinco fragmentos tumorais foram implantados em três animais com auxílio de uma agulha *Cancer Implant Needle* 11G (Cadence Science). Os animais foram monitorados periodicamente para a observação do crescimento tumoral. Quando foi observado crescimento tumoral com tamanho aproximado de 1 cm³, os camundongos foram eutanasiados por aprofundamento de anestesia, o tumor removido, e implantado em novos animais para realização das três passagens. Parte do material foi criopreservada por vitrificação, um método de

congelamento ultrarrápido que impede a formação de cristais de gelo, preservando melhor a estrutura celular e a viabilidade do tecido. Posteriormente, o material foi processado e submetido à avaliação histológica. O procedimento experimental pode ser observado na Figura 3.

Todos os animais foram mantidos no Biotério da Instituição, distribuídos em gaiolas com sistema de fecho com filtro (5 animais por gaiola, no máximo), e recebendo água e ração *ad libitum* durante todo o processo experimental.



Fonte: Autoria própria

Figura 3 - Representação esquemática do procedimento do implante tumoral em camundongos. A) Anestesia dos animais; B) Colocação dos fragmentos tumorais na cânula; C) Implante dos fragmentos no camundongo; D) Crescimento tumoral na região dorsal do camundongo; E) Remoção cirúrgica do tumor; F) Medição do fragmento retirado do camundongo.

4.2.1 Caracterização dos modelos PDX

Para a caracterização do modelo PDX, foram realizados ensaios imunohistoquímicos. Resumidamente, os tecidos parafinados dos tumores cultivados nos animais foram seccionados, desparafinizados, reidratados e

submetidos à recuperação antigênica. As secções são incubadas em peróxido de hidrogênio aquoso a 3% por 15 min para extinguir a atividade da peroxidase endógena, e com a solução Protein Block por 20 min em temperatura ambiente para eliminar a ligação inespecífica de reagentes, seguido por 1 hora de incubação com os anticorpos específicos de acordo com o tipo histológico do tumor. O painel de anticorpos utilizado para a caracterização do xenoenxerto está descrito na Tabela 1.

O complexo antígeno-anticorpo é visualizado por meio do sistema de detecção Novolink (Leica). A revelação é feita utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (DAB) e a contra-coloração utilizando-se a hematoxilina. Os cortes são então desidratados e montados com uma lamínula de vidro e meio de montagem à base de xileno.

4.3 Culturas primárias

Para o estabelecimento das culturas primárias, as amostras de tecido tumoral, obtidas dos pacientes no momento cirúrgico, foram dissociadas mecanicamente com o auxílio de um bisturi. O material é plaqueado em placas de 100mm. As células foram mantidas em meio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) acrescido de 10% de soro fetal bovino, 1% de L-glutamina e 1% de solução de antibióticos/antimicótico (penicilina 10,000 U/mL, estreptomicina 10,000 µg/mL, e 25 µg/mL de anfotericina B), e incubados em estufa úmida a 37° C e 5% de CO₂.

4.3.1 Caracterização das culturas

4.3.1.1 Imunocitoquímica

Para a caracterização das culturas foram realizados ensaios de imunocitoquímica. Resumidamente, 1×10^4 células foram cultivadas em placas

de 6 poços com lamínula de vidro por 48 horas. As células foram então fixadas em solução de paraformaldeído 4% por 4 minutos. A seguir as células foram permeabilizadas em solução de Triton X100 1% por 5 minutos, seguida por incubação por 1 hora com o anticorpo específico. O título dos anticorpos, seus clones e fornecedor estão descritos na Tabela 1.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção Novolink (Leica). A revelação foi feita utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (DAB) e a contra-coloração utilizando-se a hematoxilina. As lamínulas foram posteriormente retiradas da placa de 6 poços e montadas em lâmina contendo meio de montagem aquoso.

Tabela 1 - Lista dos anticorpos utilizados para a caracterização dos modelos em tumores de glândula salivar: soro primário, clone, fornecedor e título.

Soro primário	Clone	Fonte	Título	Marcação	Tipo celular
p63	NCL-p63	Leica	1:80	Núcleo	Células basais
CK14	SP53	Cell marque	Pronto para uso	Citoplasma	Células basais e epiteliais
Ki-67	MIB-1	Dako	Pronto para uso	Núcleo	Células em divisão
Pan-Keratin	AE1/AE3/PCK26	Roche	Pronto para uso	Citoplasma	Células epiteliais
Vimentina	V9	Roche	Pronto para uso	Citoplasma	Células mesenquimais
AML	1A4	Roche	Pronto para uso	Citoplasma	Células mioepiteliais ou musculares lisas
Citoqueratina	AE1/AE3	Dako	Pronto para uso	Citoplasma	Células epiteliais
c-Kit	EP10	Roche	Pronto para uso	Membrana e citoplasma	Células-tronco

Fonte: Autoria própria

4.3.1.2 Ensaio de viabilidade celular

As células (3×10^4) foram plaqueadas em placas de seis poços e as análises realizadas em 24, 48, 72 e 96 horas. Após o período de incubação, o meio foi retirado, as células lavadas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS), tripsinizadas e coradas com 100 μ l de *Trypan Blue* para a contagem em câmara de Neubauer. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.3.1.3 Ensaio de migração celular

As células foram plaqueadas em placas de 12 poços (1×10^4 células por poço) e cultivadas até atingirem a confluência total, sendo mantidas em meio sem soro. Com auxílio de uma ponteira estéril de 200 μ L, foi realizado um risco no centro da lamínula para retirar as células e criar um espaço que será ocupado pelas células migratórias. A migração celular foi avaliada nos tempos de 0, 24, 48h quando as células são fotografadas. O cálculo da área migrada foi realizado com auxílio software ImageJ. As porcentagens da cicatrização foram calculadas com base na área da ferida com relação ao período 0. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.3.1.4 Ensaio de invasão celular

Foi utilizado o sistema de câmara Transwell, em que as membranas com poros de 8 μ m são revestidas com uma solução composta por meio de cultura e Matrigel na concentração de 300 μ g/mL, em uma placa de 24 poços, onde um poço apresentava soro e outro sem soro na parte inferior. Após a solidificação do Matrigel, as células foram plaqueadas (1×10^5 células por poço) e, após um período de incubação de 24 horas a 37°C em uma atmosfera úmida contendo 5% de CO₂, as células não invasoras da câmara superior foram removidas, enquanto as células que atravessaram a membrana foram lavadas

com PBS, fixadas com metanol absoluto e coradas com Hematoxilina de Harris. As membranas secas ao ar e colocadas em lâmina de microscopia foram fotografadas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

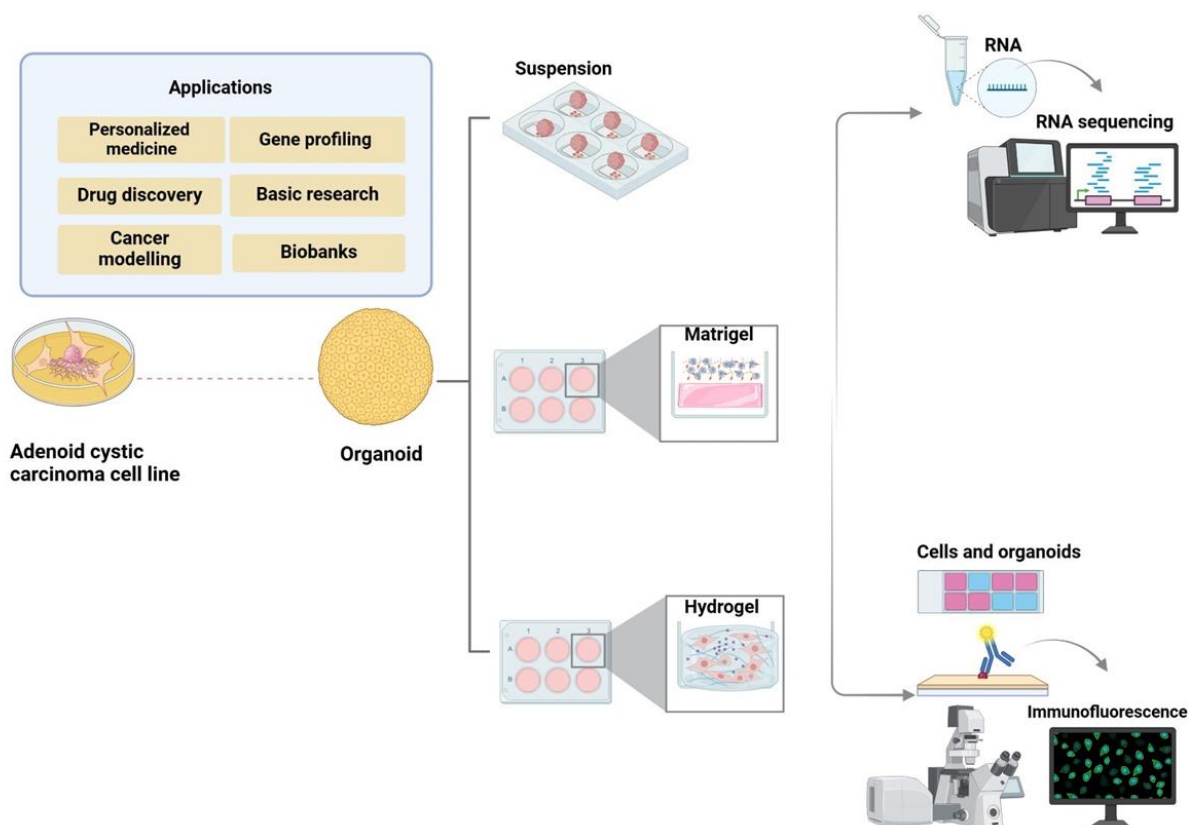
4.4 Desenvolvimento de esferoides

Para as células de carcinoma adenoide cístico foram desenvolvidos modelos de cultura em esferoides (hidrogel, matrigel e suspensão) (Figura 4). Essa etapa do projeto foi desenvolvida no âmbito do Programa de Doutorado Sanduíche da CAPES sob a supervisão da Dra Christine Delporte no laboratório de Bioquímica Fisiopatológica e Nutricional (LBFN) da Universidade Livre de Bruxelas.

Para a cultura de esferoides em suspensão, as células de carcinoma adenoide cístico foram semeadas em DMEM a uma densidade de 1×10^5 células/cm² em placas de adesão ultrabaixa de 6 poços (Corning, #3471) e incubadas em estufa de cultura celular com 5% de CO₂ a 37°C. Após 2 e 4 dias de incubação, o número de esferoides foi contado em microscópio óptico invertido com aumento de 20X, equipado com câmera conectada a um computador com o software Motic Plus para captura de imagens.

Para a cultura de esferoides em géis, as células foram semeadas em DMEM a uma densidade de 1×10^5 células/cm² em placas de 12 poços (VWR, #734-2324), misturadas com 50 µL de Matrigel (não revestido) (Corning, Cat#354234) ou hidrogel de HA-Tyr-SF (feito com 2,5% (p/v) de ácido hialurônico conjugado com tiramina (HA-Tyr) e 4% (p/v) de solução de fibroína de seda (SF), preparada em água deionizada e misturada na proporção de volume 1:1, conforme descrito por Ziadlou et al., 2021. As células foram incubadas em estufa de cultura celular com 5% de CO₂ a 37°C por 4 dias. Os géis foram destacados e lavados três vezes com PBS frio 10 mM, por centrifugação e ressuspensão a 500 g por 8 minutos a 4°C. O pellet resultante foi ressuspensão em PBS 10 mM, e 100 µL dos esferoides foram transferidos para placas de 96 poços (VWR, #734-2327) para contagem da mesma forma que a suspensão. Detalhamento das etapas metodológicas do projeto pode ser visualizado na Figura 4.

O tamanho dos organoides foi determinado medindo suas áreas com base na circunferência dos organoides, obtidas a partir da análise de 4 imagens por condição, utilizando o software ImageJ.



Fonte: Autoria própria

Figura 4 – Esquema representativo do desenvolvimento e caracterização de modelos esféricos em carcinoma adenoide cístico. Os modelos desenvolvidos em suspensão, hidrogel e matrigel são caracterizados por imunofluorescência e seqüenciamento de RNA.

4.5 Análise estatística

Os dados foram representados como média $\pm$ erro padrão da média (E.P.M) de 3 experimentos independentes. A análise estatística foi iniciada com o teste de normalidade de Shapiro-Wilk. Em seguida, os dados foram avaliados utilizando ANOVA unidirecional paramétrica ou não paramétrica ou teste de Friedman, conforme apropriado. Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software GraphPad Prism (versão 10.1.1).

5 RESULTADOS

5.1 Casuística

Os pacientes foram prospectados com o auxílio da equipe de Enfermeiras de Pesquisa através de busca ativa de agendamentos do ambulatório do Departamento de Cabeça e Pescoço. De novembro de 2019 a setembro de 2024 foram prospectados um total de 62 pacientes. Desses 62 casos, houve a exclusão de casos em que o paciente só fez a punção na nossa instituição, punção com resultado normal ou outros tumores de glândula salivar e tumores pequenos (não sendo possível a coleta de fragmento para o estudo). Dessa forma, um total de 18 pacientes foram incluídos no estudo: nove pacientes com adenoma pleomórfico, cinco pacientes com carcinoma mucoepidermoide e quatro pacientes com carcinoma adenoide cístico.

Dos nove adenomas inicialmente identificados, três foram excluídos após o laudo anatomopatológico final revelar outro tipo de tumor glandular. Em cinco dos seis casos foi possível coletar e implantar fragmentos tumorais nos camundongos e um foi criopreservado. Em três desses casos, não houve crescimento tumoral nos animais, resultando na eutanásia destes. Em outro caso, o fragmento tumoral era muito pequeno, sendo implantado em apenas um camundongo que não sobreviveu ao procedimento cirúrgico. Em um único caso, houve crescimento tumoral significativo, o que permitiu a realização de ensaios para caracterização do modelo de xenotransplante (PDX) e cultivo celular, além de sequenciamento para análise das alterações genéticas (detalhadas posteriormente). Duas culturas celulares foram estabelecidas, denominadas de AP1 e AP2.

Dos cinco casos de carcinoma mucoepidermoide, três não apresentaram crescimento tumoral nos camundongos. Duas dessas três amostras foram cultivadas *in vitro*, mas, ao longo das passagens, houve crescimento predominante de fibroblastos na cultura. As outras duas amostras foram implantadas nos camundongos que estão sendo acompanhados.

Dos quatro casos de carcinoma adenoide cístico inicialmente

identificados, um foi excluído após o laudo anatomopatológico final revelar outro tipo de tumor glandular. Nos outros três casos, não se observou crescimento tumoral nos camundongos ao longo de um ano, resultando na eutanásia dos animais. Contudo, todas as amostras foram cultivadas *in vitro* sendo denominadas ACC1, ACC2 e ACC3.

Dentre os pacientes incluídos no estudo, predominou o tumor na glândula parótida, com margens livres e ausência de envolvimento dos linfonodos. O sexo feminino foi mais frequentemente afetado, com idade variando de 29 a 73 anos. Invasão perineural foi observada apenas nas amostras de carcinoma adenoide cístico, o que é característico desses tumores. O grau histológico predominante nos carcinomas mucoepidermóides, foi o grau intermediário (conforme mostrado na Tabela 2). Detalhes adicionais sobre as amostras implantadas nos camundongos estão disponíveis na Tabela 3.

Além dos aspectos clínicos e experimentais, foi estabelecido um banco de dados na plataforma RedCap para armazenamento e análise das variáveis relevantes, incluindo tipo de tumor, gênero, raça, idade ao diagnóstico, grau histológico, localização do tumor, embolização vascular, invasão perineural, comprometimento dos linfonodos, recidiva, data e natureza da recidiva, metástase, data e localização das metástases, estado atual do paciente, tipo de tratamento, data da cirurgia e última atualização disponível.

Tabela 2 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores de glândula salivar.

Características	Categoria	Adenoma pleomórfico	Carcinoma adenoide cístico	Carcinoma mucoepidermoide
Idade (em anos)	< = 40	01	01	03
	> 40	05	02	02
Gênero	Feminino	05	01	03
	Masculino	01	02	02
Local do tumor	Parótida	06	02	00
	Submandibular	00	01	00
	Glândulas menores	00	00	05
Embolia vascular	Sim	00	00	01
	Não	06	03	04
Invasão perineural	Sim	00	03	01
	Não	06	00	04
Linfonodo comprometido	Sim	00	00	01
	Não	06	03	04
Grau histológico	Baixo	00	00	02
	Intermediário	00	00	03
	Alto	00	00	00
Metástase	Sim	00	01	00
	Não	06	02	05
Recidiva	Sim	00	00	00
	Não	06	03	05

Fonte: Autoria própria

Tabela 3 - Descrição dos tumores implantados nos camundongos e processados para cultivo primário.

Amostra	Tumor original	Data do implante no camundongo	Crescimento tumoral	Tempo para o crescimento	Cultura celular
AP1	Adenoma pleomórfico	13/12/2019	Não	-	Sim (P6)
AP2	Adenoma pleomórfico	19/12/2019	Sim	7 meses	Sim (P3)
AP6	Adenoma pleomórfico	29/10/2021	Não	-	Sim*
AP8	Adenoma pleomórfico	04/11/2021	Não	-	Sim*
AP9	Adenoma pleomórfico	04/11/2021	Óbito	-	Sim*
ACC1	Carcinoma adenoide cístico	09/02/2022	Não	-	Sim (P5)
ACC2	Carcinoma adenoide cístico	18/08/2022	Não	-	Sim (P6)
ACC3	Carcinoma adenoide cístico	27/09/2022	Não	-	Sim (P11)
MEC1	Carcinoma mucoepidermoide	02/10/2020	Não	-	Sim
MEC2	Carcinoma mucoepidermoide	08/02/2023	Não	-	Sim
MEC3	Carcinoma mucoepidermoide	19/05/2023	Não	-	Sim*
MEC4	Carcinoma mucoepidermoide	11/04/2024	Acompanhamento (9 meses)	-	Sim*
MEC5	Carcinoma mucoepidermoide	05/04/2024	Acompanhamento (9 meses)	-	Sim*

Fonte: Autoria própria

Legenda: P: Passagem; *Vitrificado.

5.2 Xenoenxertos

Dos fragmentos humanos tumorais dos 5 casos de adenoma pleomórfico implantados nos camundongos imunodeficientes, apenas um caso de adenoma pleomórfico (AP2), representando uma taxa de 20% de sucesso, desenvolveu um modelo PDX. O exame histopatológico do tumor original confirmou o diagnóstico de adenoma pleomórfico, evidenciando uma lesão bem delimitada na parótida direita, medindo 2,5 x 2,5 cm, composta por uma mistura de componentes epiteliais e mesenquimais em uma matriz mixoide. O tumor era de uma paciente do sexo feminino, 36 anos, e apresentava margens cirúrgicas livres, sem invasão perineural ou linfovascular. Os linfonodos intraparotídeos analisados estavam livres de

neoplasia.

O PDX se desenvolveu após sete meses do implante, alcançando três passagens. Sendo a segunda passagem com 2 meses após o implante e a terceira passagem 3 meses após o implante. O material obtido dos camundongos foi submetido à avaliação por imunoistoquímica para caracterização. Foi utilizado um painel de proteínas para a identificação das células epiteliais e mioepiteliais, conforme ilustrado na Figura 5. Foi observada a expressão de actina de músculo liso, vimentina, p63, citoceratina 14 e pan-citoceratina, caracterizando componentes mioepiteliais. Expressão de CK7 não foi observada, demonstrando ausência de estruturas ductais bem diferenciadas (dado não apresentado).

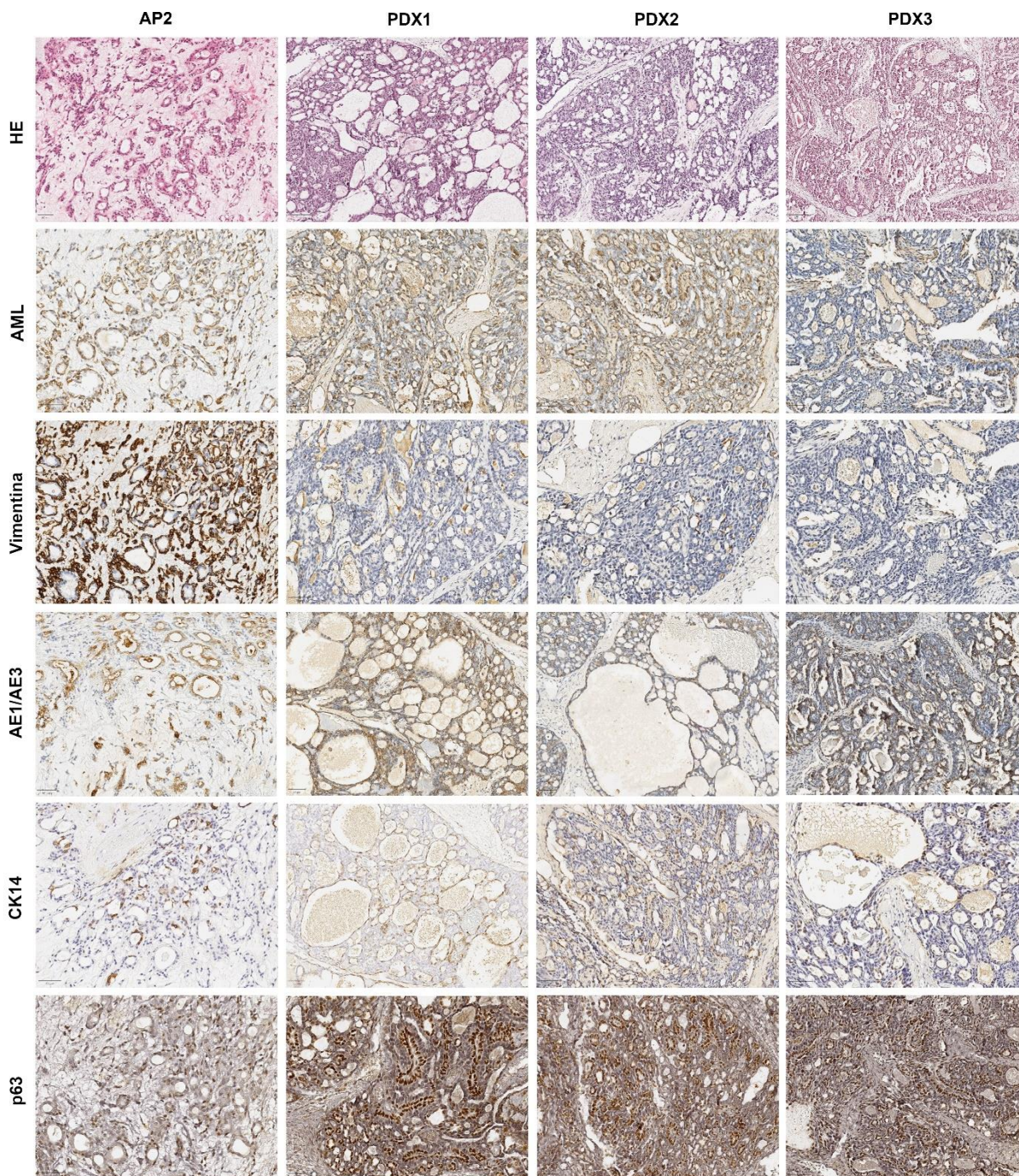
Não houve crescimento nos camundongos implantados com fragmentos dos três casos de carcinoma adenoide cístico e em três casos de carcinoma mucoepidermoide (2 casos estão em acompanhamento faz 9 meses).

5.3 Culturas primárias

5.3.1 Adenoma pleomórfico

Para todos os tipos de tumor, os fragmentos de tecido foram plaqueados e incubados em estufa úmida a 37°C com 5% de CO₂, resultando no crescimento de uma monocamada celular a partir dos explantes em 4-7 dias. As células de adenoma pleomórfico (AP1 e AP2) apresentaram morfologia variada, incluindo padrões fusiformes e estrelados (Figura 6).

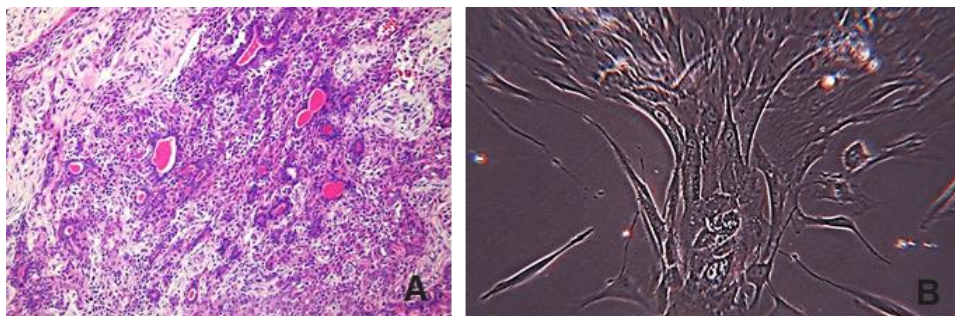
Nos adenomas pleomórficos (AP1 e AP2), foi observada a expressão de actina de músculo liso, vimentina, p63, e citoceratina 14 caracterizando o componente mioepitelial (Figura 7).



Fonte: Autoria própria

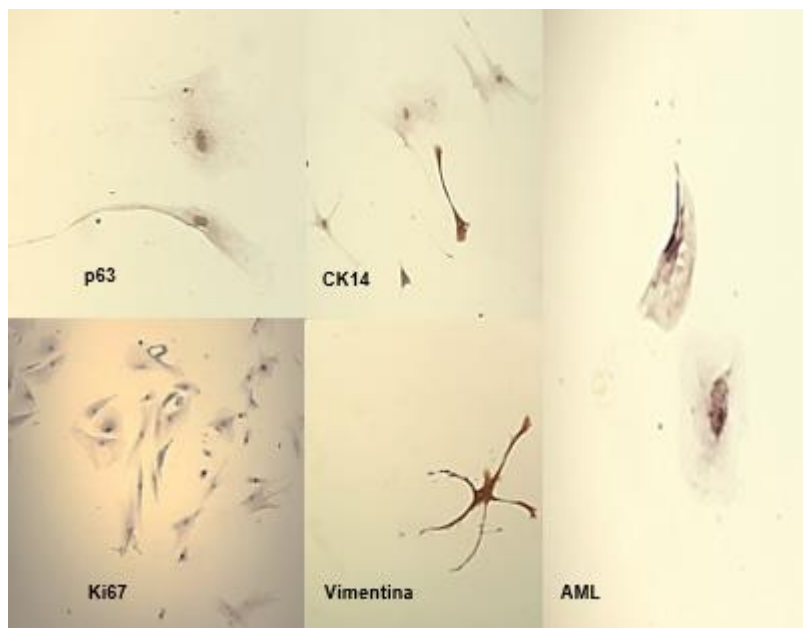
Figura 5– Caracterização do modelo de xenoenxerto de adenoma pleomórfico por imunoistoquímica. Amostra de tecido retirada do tumor do paciente em comparação com os xenoenxertos derivados em diferentes passagens (PDX1, PDX2 e PDX3). Na coloração por hematoxilina e eosina (HE) da amostra do tumor do paciente AP2 (painel superior esquerdo), observa-se a arquitetura do adenoma pleomórfico, com matriz abundante. Nas seções dos xenoenxertos (PDX1, PDX2, PDX3), observa-se manutenção da arquitetura do xenoenxerto durante as passagens. A análise imunoistoquímica revelou

expressão variada de marcadores de células epiteliais e mioepiteliais: **AML** (citoplasmática) em células mioepiteliais; **vimentina** (citoplasmática) no estroma e nas células mioepiteliais; **AE1/AE3** (citoplasmática) marcando o componente epitelial; **CK14** (citoplasmática) em células basais/mioepiteliais e **p63** (marcação nuclear) em células mioepiteliais.



Fonte: Autoria própria

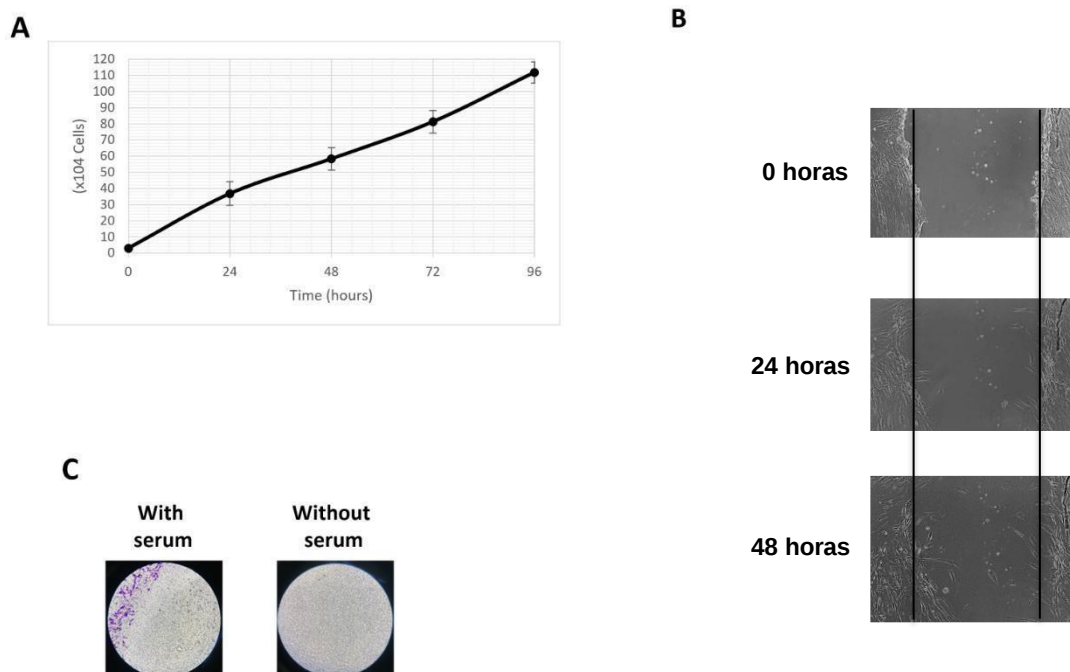
Figura 6 - Estabelecimento do modelo celular de adenoma pleomórfico. Em A, aspectos histológicos da amostra de adenoma pleomórfico corada por hematoxilina e eosina (HE). B, células de adenoma pleomórfico em cultura demonstrando um padrão morfológico diverso composto por células de padrão fusiforme e estrelado.



Fonte: Autoria própria

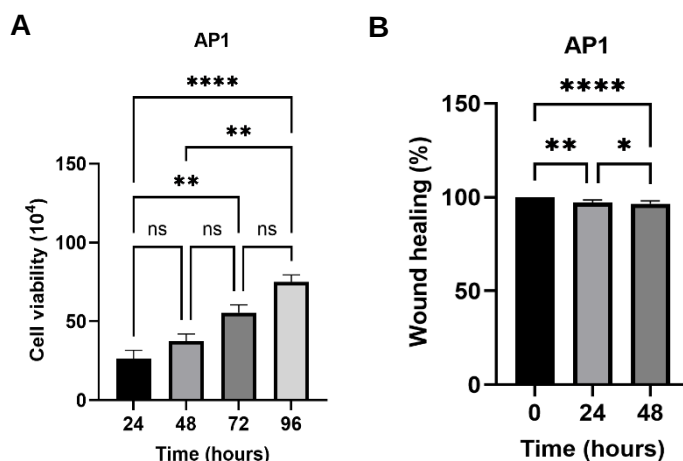
Figura 7 - Caracterização morfológica e imunofenotípica de células de adenoma pleomórfico (AP2) cultivadas *in vitro*. Células derivadas de adenoma pleomórfico (AP2), cultivadas em monocamada, apresentando morfologia fusiforme e estrelada, compatível com fenótipo mioepitelial. A análise por imunocitoquímica revelou expressão nuclear de p63, indicando perfil de células basais/mioepiteliais; expressão citoplasmática de CK14, reforçando o perfil de células mioepiteliais e basais; expressão nuclear de Ki-67, indicando atividade proliferativa; expressão citoplasmática de vimentina, expressa em células com características mesenquimais/mioepiteliais; e expressão citoplasmática de AML, indicando perfil mioepitelial.

Experimentos subsequentes investigaram a proliferação, migração e invasão das células AP1 e AP2, mostrando a viabilidade ao longo do tempo (75 e $111,8 \times 10^4$ células, respectivamente), e baixa taxa de migração e invasão. A taxa de fechamento da ferida foi de 20% para ambas as linhagens de AP. A Figura 8 mostra resultado representativo da análise funcional de células de adenoma pleomórfico. As Figuras 9 e 10 mostram a análise estatística da triplicata de cada ensaio de AP1 e AP2, respectivamente. Para os ensaios de invasão, não foi realizada a análise estatística, porque não foi possível a contagem de células.



Fonte: Autoria própria

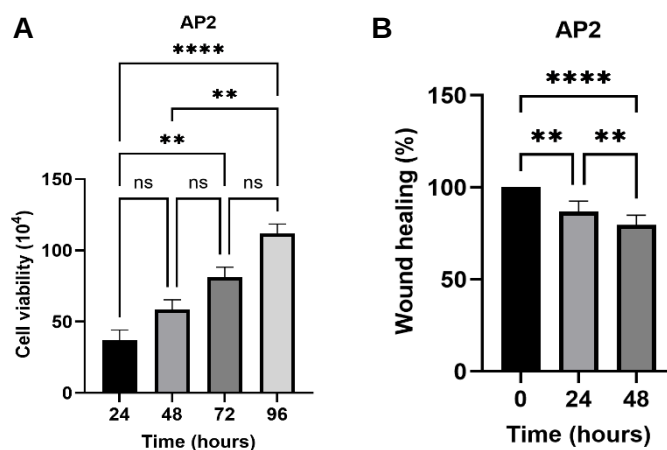
Figura 8 - Imagem representativa da avaliação das células de adenoma pleomórfico (AP2) com relação à viabilidade (A), migração (B) e invasão celular (C). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. Em A, a linha preta representa a média dos dados coletados com barras de desvio padrão.



Fonte: Autoria própria

Figura 9 - Análise estatística dos ensaios de viabilidade e migração celular das células de adenoma pleomórfico (AP1). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. Em A, observa-se

o número de células vivas, partindo de 3×10^4 células no tempo 0. Em B, observa-se a taxa de cicatrização da ferida, partindo de 100% no dia 0. ns: *non-significant*; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

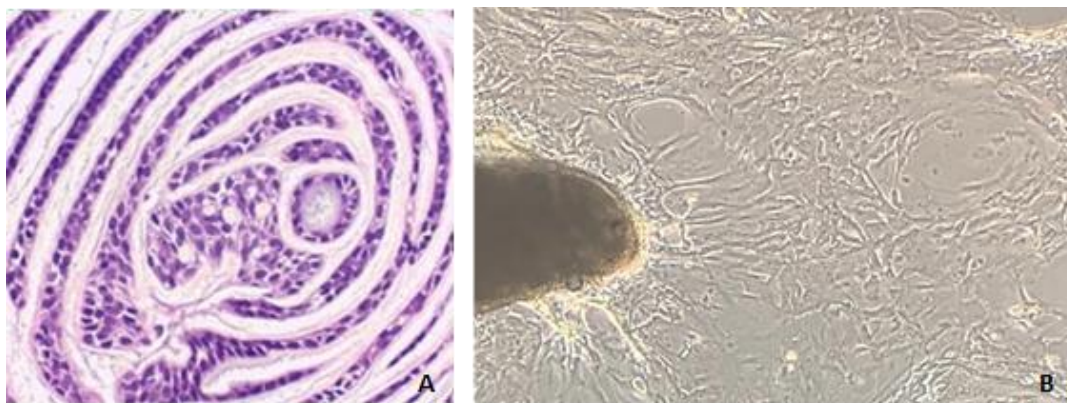


Fonte: Autoria própria

Figura 10 - Análise estatística dos ensaios de viabilidade e migração celular das células de adenoma pleomórfico (AP2). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. Em A, observa-se o número de células vivas, partindo de 3×10^4 células no tempo 0. Em B, observa-se a taxa de cicatrização da ferida, partindo de 100% no dia 0. ns: *non-significant*; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5.3.2 Carcinoma adenoide cístico

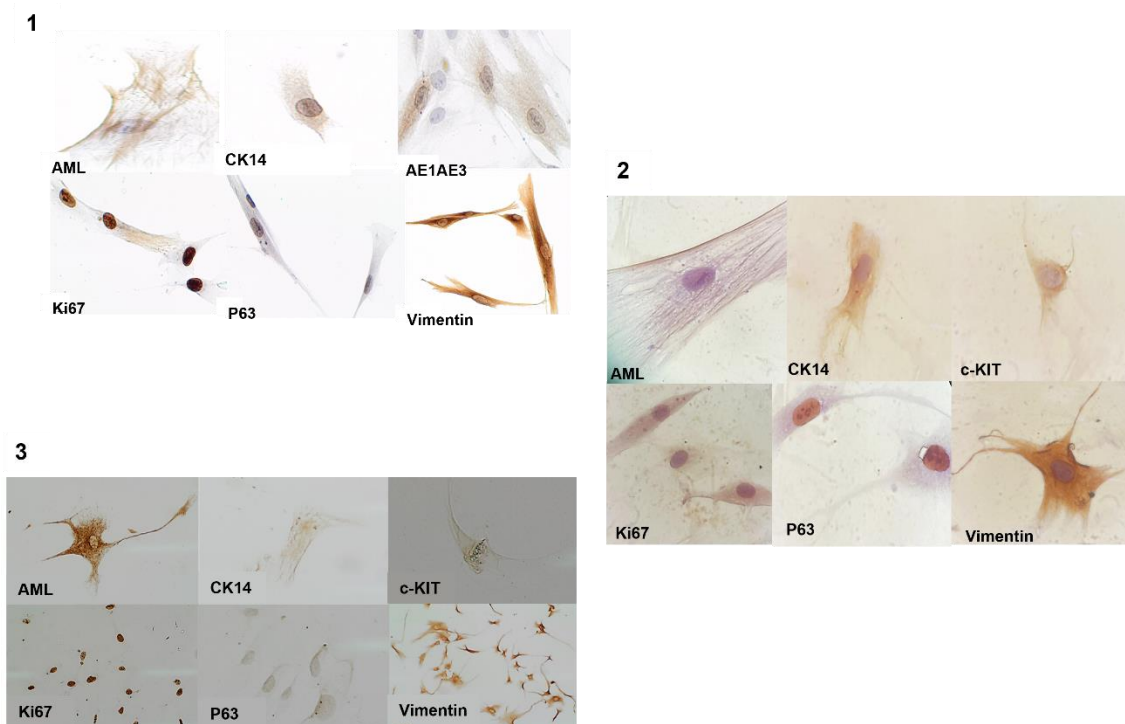
As células de carcinoma adenoide cístico também apresentaram morfologia variada, incluindo padrões fusiforme e estrelado, a partir dos explantes colocados em cultura, após 4 a 7 dias de cultivo (Figura 11).



Fonte: Autoria própria

Figura 11 - Estabelecimento do modelo celular do carcinoma adenoide cístico. A, Aspectos histológicos de uma amostra de carcinoma adenoide cístico em coloração HE; B, fragmento de tecido em cultura e monocamada celular mostrando células com aspecto morfológico fusiforme e estrelado se desprendendo do explante.

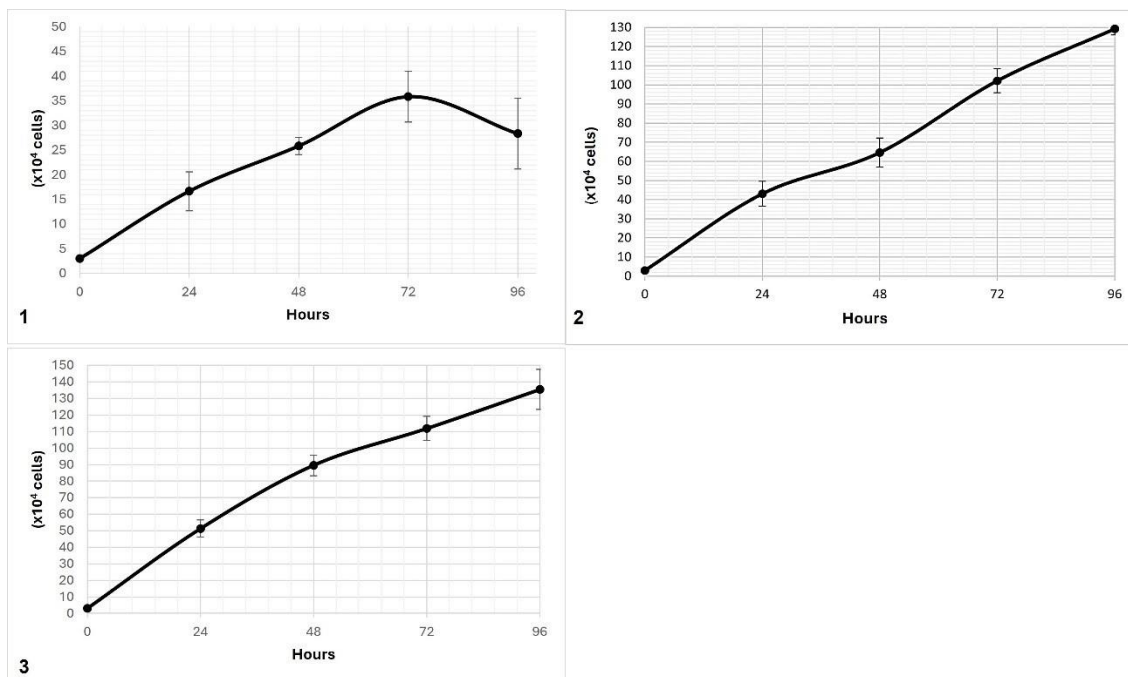
Para as células de carcinoma adenoide cístico, observou-se a expressão de actina de músculo liso, vimentina, p63, AE1AE3 e citoceratina 14 caracterizando o componente mioepitelial (Figura 12). A expressão de c-Kit, caracterizando o componente epitelial do carcinoma adenoide cístico, também foi observada, enquanto o Ki-67 indicou atividade proliferativa.



Fonte: Autoria própria

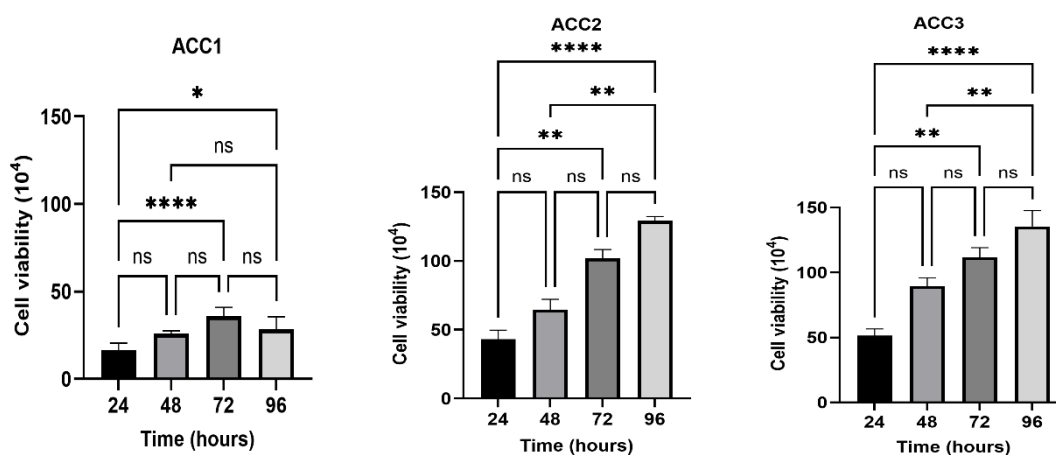
Figura 12 - Caracterização morfológica e imunofenotípica de células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2 e ACC3) cultivadas *in vitro*. Células derivadas de carcinoma adenoide cístico, cultivadas em monocamada, apresentando morfologia fusiforme e estrelada, compatível com fenótipo mioepitelial. A análise por imunocitoquímica revelou expressão nuclear de p63, indicando perfil de células basais/mioepiteliais; expressão citoplasmática de CK14 e AE1/AE3, reforçando o perfil de células mioepiteliais e basais; expressão de membrana/citoplasmática de c-kit, indicando o perfil de células basais; expressão nuclear de Ki-67, indicando atividade proliferativa; expressão citoplasmática de vimentina, expressa em células com características mesenquimais/mioepiteliais; e expressão citoplasmática de AML, indicando perfil mioepitelial.

Diferentes taxas de viabilidade celular foram observadas nas 3 linhagens ao longo do tempo (Figuras 13 e 14). Esses ensaios foram realizados em passagens iniciais (P2 a P3) e revelaram alta viabilidade em dois carcinomas (ACC2 e ACC3) do tipo histológico cribriforme e sólido ($129,16$ e $135,41 \times 10^4$ células, respectivamente), apresentando manutenção da viabilidade por 96h. Em contraste, o modelo ACC de padrão histológico tubular (ACC1) exibiu viabilidade celular menor ($28,33 \times 10^4$) ao longo das 96 horas de cultivo.



Fonte: Autoria própria

Figura 13 - Imagem representativa do ensaio de viabilidade celular em células de carcinoma adenoide cístico ((1) ACC1, (2) ACC2 e (3) ACC3, respectivamente). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. A linha preta representa a média dos dados coletados com barras de desvio padrão.



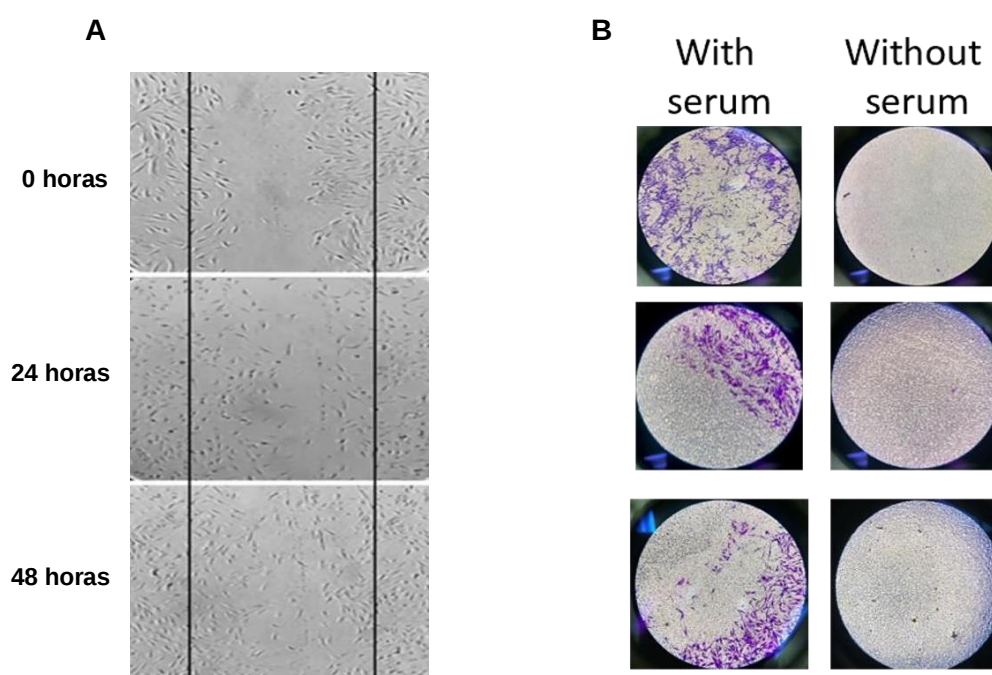
Fonte: Autoria própria

Figura 14 - Análise estatística do ensaio de viabilidade celular das células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2 e ACC3). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. O gráfico representa o número de células vivas, partindo de 3x10⁴ células no

tempo 0. ns: non-significant; *: $p < 0,05$; **: $p < 0,01$; ****: $p < 0,0001$.

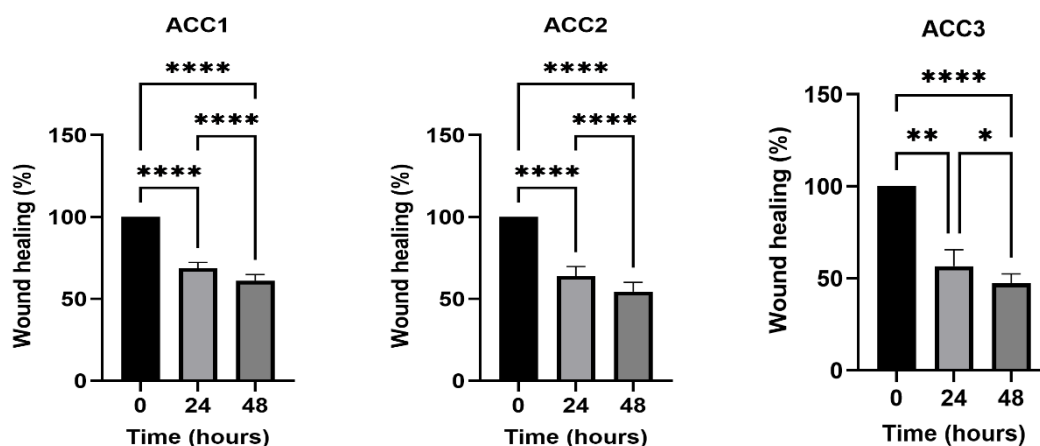
O ensaio de migração celular demonstrou taxa de migração variável nos três modelos celulares. No primeiro modelo (ACC1), a taxa de fechamento da ferida foi de 40%, no segundo (ACC2) foi de 50%, e no terceiro foi de 60%, em 48 horas. A Figura 15 mostra resultado representativo da análise funcional de células de carcinoma adenoide cístico. A Figura 16 mostra a análise estatística da triplicata de cada ensaio de ACC1, ACC2 e ACC3, respectivamente.

Com relação à capacidade de invasão, na presença de soro, apresentou invasividade em 24 horas (Figura 15). Para os ensaios de invasão, não foi realizada a análise estatística, porque não foi possível a contagem de células.



Fonte: Autoria própria

Figura 15 - Imagem representativa do ensaio de migração celular (A) e invasão celular (B) em células de carcinoma adenoide cístico (ACC3). As imagens mostram células em diferentes tempos. Imagens obtidas ao microscópio invertido com objetiva de 20x.



Fonte: Autoria própria

Figura 16 - Análise estatística do ensaio de migração celular das células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2 e ACC3). Estes dados representam o resultado de três experimentos independentes, com triplicata técnica. O gráfico representa a cicatrização da ferida, partindo de 100% no tempo 0. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; **** $p < 0,0001$.

5.3.2.1 Desenvolvimento de esferoides

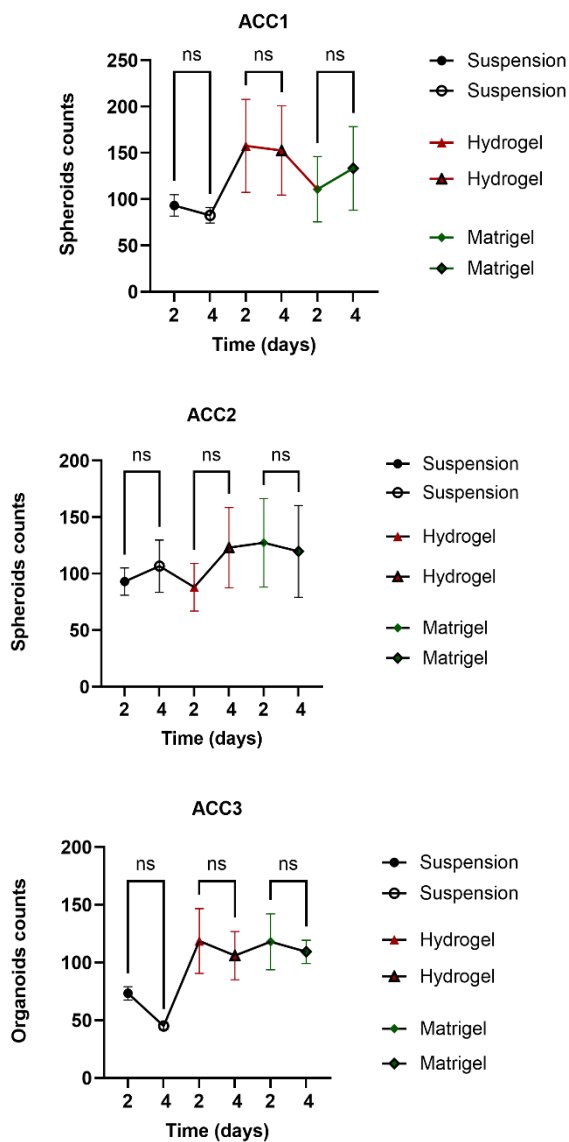
As células de carcinoma adenoide cístico cultivadas (ACC1, ACC2 e ACC3) foram utilizadas para o estabelecimento de modelos esferoides. Ao longo do período de análise de 4 dias, foram observadas diferenças no número de esferoides formados sob condições tridimensionais (3D). No dia 0, 1×10^5 células foram semeadas. Em suspensão, as células ACC1 formaram 80 esferoides no dia 2, diminuindo para 76 organoides no dia 4. Em Matrigel, as células ACC1 formaram 132 esferoides no dia 2, aumentando para 180 esferoides no dia 4. Em hidrogel, o número médio de esferoides formados pelas células ACC1 foi de 208 no dia 4.

Para as células ACC2, o número de esferoides em suspensão aumentou de 95 no dia 2 para 120 no dia 4. Em Matrigel, o número de esferoides foi de 168 no dia 2 e diminuiu ligeiramente para 160 no dia 4. Nas culturas de hidrogel, o número de esferoides aumentou de 72 no dia 2 para 120 no dia 4.

As células ACC3 apresentaram padrões diferentes, com 70 esferoides nas culturas em suspensão no dia 2, diminuindo para 45 no dia 4. Nas culturas

de Matrigel, as células ACC3 formaram 132 esferoides no dia 2 e 120 esferoides no dia 4. Nas culturas de hidrogel, as células ACC3 formaram 96 esferoides no dia 2, diminuindo ligeiramente para 92 no dia 4.

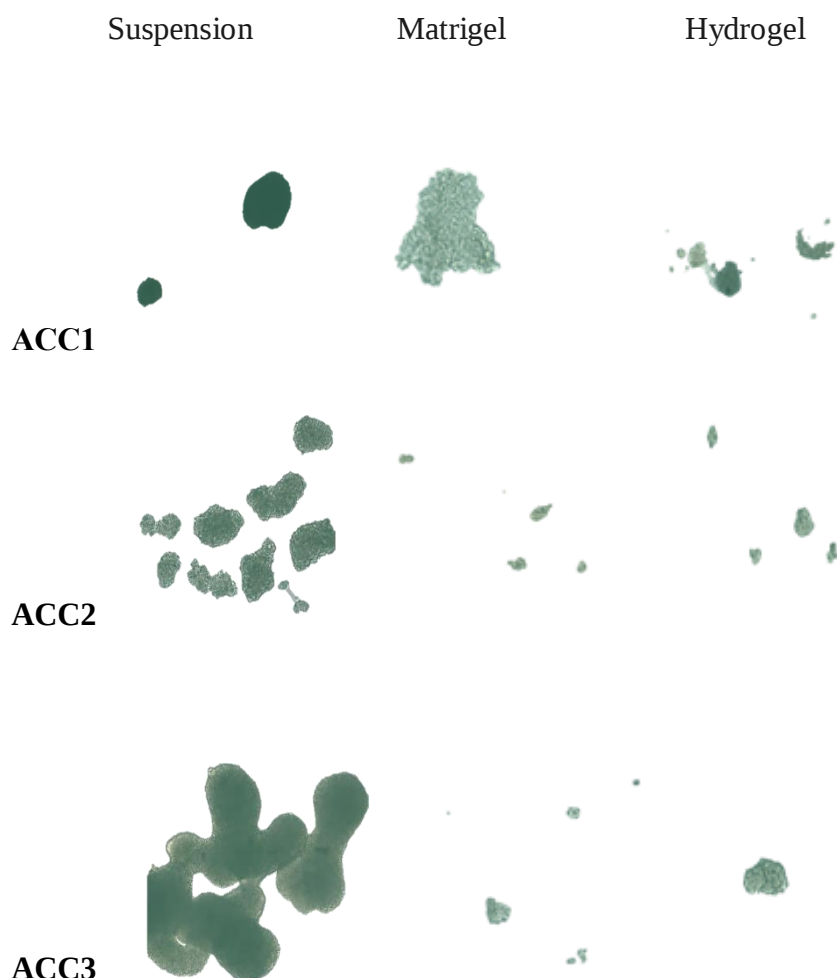
Gráfico representativo da contagem de esferoides formados a partir das células ACC1, ACC2 e ACC3 pode ser observado na Figura 17.



Fonte: Autoria própria

Figura 17 - Contagem de esferoides em células de carcinoma adenoide cístico cultivadas em culturas 3D de Suspensão, Hidrogel e Matrigel. ns $p > 0.05$.

Na Figura 18 podemos observar a morfologia dos esferoides formados nas diferentes condições experimentais.



Fonte: Autoria própria

Figura 18 – Imagem representativa da morfologia dos esferoides formados a partir de células de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2, ACC3) sob diferentes condições de cultura: Suspensão, Matrigel e Hidrogel.

Para avaliar o tamanho dos esferoides nos dias 2 e 4, determinamos suas áreas com base na sua circunferência. A análise foi realizada utilizando o software ImageJ, com a captura e processamento de quatro imagens por condição.

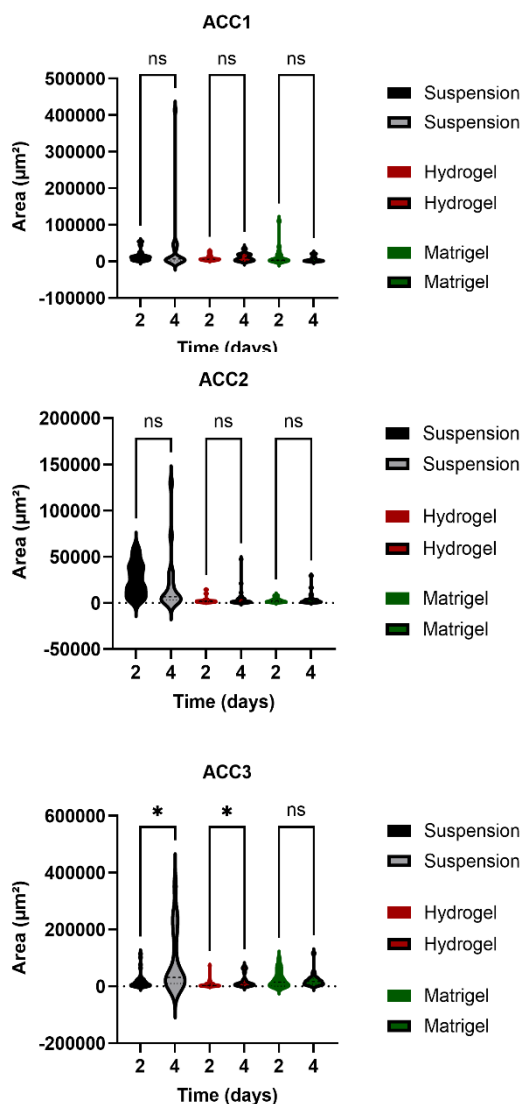
Para ACC1 em culturas de suspensão, as áreas dos esferoides no dia 2 variaram de 981 μm^2 a 54.784 μm^2 . No dia 4, as áreas dos esferoides variaram

de 881 μm^2 a 414.078 μm^2 , indicando um crescimento moderado em comparação com o controle inicial. Em culturas de hidrogel, as áreas dos esferoides de ACC1 no dia 2 variaram de 2.475 μm^2 a 28.033 μm^2 . No dia 4, o intervalo foi de 1.363 μm^2 a 34.367 μm^2 . Em culturas de Matrigel, as áreas dos esferoides de ACC1 no dia 2 variaram de 711 μm^2 a 110.652 μm^2 . No dia 4, o intervalo foi de 880 μm^2 a 21.829 μm^2 .

Para ACC2 em culturas de suspensão, as áreas dos esferoides no dia 2 variaram de 1.959 μm^2 a 59.719 μm^2 . No dia 4, as áreas dos esferoides variaram de 389 μm^2 a 129.604 μm^2 , indicando um crescimento moderado em comparação com o controle inicial. Em culturas de hidrogel, as áreas dos esferoides de ACC2 no dia 2 variaram de 420 μm^2 a 14.460 μm^2 . No dia 4, o intervalo foi de 430 μm^2 a 21.206 μm^2 . Em culturas de Matrigel, as áreas dos esferoides de ACC2 no dia 2 variaram de 731 μm^2 a 8.512 μm^2 . No dia 4, o intervalo foi de 389 μm^2 a 29.331 μm^2 .

Para ACC3 em culturas de suspensão, as áreas dos esferoides no dia 2 variaram de 272 μm^2 a 114.732 μm^2 . No dia 4, as áreas dos esferoides variaram de 3.104 μm^2 a 352.825 μm^2 , indicando um crescimento moderado em comparação com o controle inicial. Em culturas de hidrogel, as áreas dos esferoides de ACC3 no dia 2 variaram de 402 μm^2 a 73.155 μm^2 . No dia 4, o intervalo foi de 2.056 μm^2 a 69.355 μm^2 . Em culturas de Matrigel, as áreas dos esferoides de ACC3 no dia 2 variaram de 592 μm^2 a 96.669 μm^2 . No dia 4, o intervalo foi de 963 μm^2 a 116.246 μm^2 .

Esses resultados ilustram a variação no tamanho dos esferoides e nos padrões de crescimento em diferentes condições de cultura 3D para as células de carcinoma adenoide cístico. De todas as linhagens celulares, ACC3 foi a única que apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre o dia 2 e o dia 4, tanto nas culturas de suspensão quanto nas de hidrogel (Figura 19).



Fonte: Autoria própria

Figura 19 - Área dos esferoides derivados de células de carcinoma adenoide cístico sob diferentes condições de cultura. Os gráficos apresentam a comparação entre o dia 2 e o dia 4 de cultivo. ns $p > 0,05$; * $p < 0,05$.

5.3.3 Carcinoma mucoepidermoide

Não foi possível estabelecer um protocolo para o cultivo das células de carcinoma mucoepidermoide. Foram feitas tentativas com 2 amostras, utilizando meio DMEM e meio RPMI com ou sem fatores de crescimento

adicionais. Contudo, após os primeiros dias de cultivo, o crescimento de fibroblastos predominou em detrimento das células epidermóides. Tentativas de eliminar os fibroblastos com geneticina e solução salina equilibrada de Hank (HBSS) não foram bem-sucedidas, resultando na interrupção dos experimentos de cultura (Figura 20). A eliminação dos fibroblastos é essencial, pois eles apresentam uma taxa de proliferação superior às células epiteliais, podendo comprometer a cultura e os resultados experimentais.



Fonte: Autoria própria

Figura 20 – Imagem ilustrativa da tentativa de estabelecimento do modelo celular de carcinoma mucoepidermoide. O fragmento da amostra de carcinoma mucoepidermoide foi cultivado e, após alguns dias da expansão da monocamada de células, houve crescimento predominante de fibroblastos.

6 DISCUSSÃO

Nesse estudo, foi possível estabelecer e caracterizar um modelo de adenoma pleomórfico através de técnicas de imunoistoquímica e imunocitoquímica. Para o carcinoma adenoide cístico foi possível estabelecer modelos de culturas primárias, caracterizando por imunocitoquímica e ensaios biológicos, uma vez que não houve crescimento nos camundongos. Até o momento, não conseguimos estabelecer um modelo de carcinoma mucoepidermoide. É importante ressaltar que a casuística deste estudo foi limitada, devido à raridade desses tumores. Os dados demográficos, clínicos e patológicos coletados foram cruciais para o melhor entendimento das características das células e do modelo de xenotransplante (PDX).

Cada tipo tumoral apresenta particularidades histológicas, refletindo um amplo espectro de lesões que ainda são debatidas quanto à diferenciação histológica e classificação. As abordagens utilizando técnicas de imunoistoquímica/imunocitoquímica e ensaios biológicos são amplamente utilizadas para a caracterização dos modelos, sendo fundamentais para diferenciar as células neoplásicas em tumores com comportamentos variados.^{86,87}

6.1 Estabelecimento de culturas primárias e imunocitoquímica

6.1.1 Adenoma pleomórfico

As culturas primárias de adenoma pleomórfico apresentaram uma diversidade morfológica significativa, refletindo a complexidade histológica observada nos tumores originais. As células mantiveram características epiteliais e mioepiteliais, essenciais para representar adequadamente a heterogeneidade do tumor *in vitro*. Dentre as diversas análises, na imunocitoquímica, foi observada a expressão de biomarcadores epiteliais e mioepiteliais, sendo a morfologia característica do adenoma pleomórfico.

Para a caracterização dos modelos, utilizamos marcadores que são amplamente utilizados, tanto na rotina diagnóstica desses tumores quanto em pesquisas na literatura, como as moléculas de adesão celular e de citoesqueleto como: actina de músculo liso, Ki-67 como marcador de proliferação celular e comumente relacionado à agressividade tumoral⁸⁸, as citoqueratinas são usadas principalmente para diferenciar casos metastáticos e identificar células basais-luminais⁸⁹, p63 como marcador de diferenciação mioepitelial e vimentina.^{90,92} Nosso estudo corrobora o de Falcão et al.⁴⁰, que estabeleceu e caracterizou uma linhagem celular de adenoma pleomórfico *in vitro* e *in vivo* demonstrando a expressão de marcadores epiteliais e mioepiteliais, como vimentina que é importante para migração e adesão celular, S-100, que influencia a migração, proliferação e diferenciação, citoqueratinas e actina de músculo liso ambos os responsáveis por processos do citoesqueleto que resistem ao estresse mecânico e contribuem para a migração. Além disso, Ravi et al.⁹³ identificaram que as células mioepiteliais geralmente apresentam expressão de actina de músculo liso, sendo um marcador comumente utilizado para identificar essas células. E segundo Ben-izhak et al.⁹⁴, o Ki-67, é um marcador bem estabelecido de proliferação celular e é comumente relacionado à agressividade tumoral, no entanto, apresentando baixa expressão em nosso estudo, por se tratar de um tumor benigno da glândula salivar.

Além da imunocitoquímica, que permite a visualização de proteínas específicas nas células tumorais, realizamos ensaios de viabilidade, migração e invasão para avaliar o comportamento biológico desses tumores. Os resultados desses ensaios revelaram uma alta viabilidade celular ao longo das 96 horas do experimento, sendo observada baixa taxa de migração e invasão, sugerindo um comportamento menos agressivo desse tumor. A alta viabilidade característica pode parecer inconsistente com a natureza benigna desse tumor. No entanto, esse tipo de tumor é altamente heterogêneo, podendo apresentar múltiplas recidivas e potencial para transformação maligna.⁹⁴

Diversos estudos têm investigado a expressão de RNAs e proteínas associadas à transformação maligna do adenoma pleomórfico. De Lima-Souza et al.⁹⁵ identificaram sete proteínas (APOA1, AP1M1, SYCP1, DCD, HBB, HP e SLC4A1) como potenciais biomarcadores na progressão tumoral. Entre elas, HP, AP1M1 e HBB foram mais abundantes nos adenomas pleomórficos

residuais, enquanto APOA1 se destacou na transição para carcinoma ex-adenoma pleomórfico (Ca-ex-AP). Já SLC4A1 e SYCP1 apresentaram menor expressão nessa transição, e DCD mostrou maior abundância no Ca-ex-AP com diferenciação mioepitelial.

Além disso, Xu et al.⁹⁶ e Bartkowiak et al.⁹⁷ sugerem que o *lncRNA ENST00000603829* pode estar envolvido na proliferação e invasão celular, desempenhando um papel relevante na progressão para Ca-ex-AP. O *knockdown* do *lncRNA ENST00000603829* inibiu a invasão e proliferação celular, promovendo a apoptose e a não transformação maligna de adenoma pleomórfico. Bartkowiak et al.⁹⁷ também observaram que a superexpressão de p16Ink4a pode estar relacionada à proliferação do AP e sua subsequente transformação maligna. Maruyama et al.⁹⁸ sugeriram que a sinalização do perlecan atua como um potenciador do crescimento, favorecendo a proliferação do AP, mas, paradoxalmente, inibindo sua migração e invasão celular.

O ensaio de migração, mostrou uma baixa taxa de células que migraram, representando apenas 20% de cicatrização. Navarini et al.⁹⁹ relataram um aumento na taxa de migração em células de adenoma pleomórfico tratadas com fator de crescimento epidérmico (EGF), e que a expressão de EGF e seu receptor EGFR estava associada à morfologia e capacidade de migração das células mioepiteliais. O tratamento com EGF fez com que a morfologia celular mudasse de estrelada para fusiforme, semelhante à morfologia observada em células mioepiteliais benignas que circundam células epiteliais malignas em estruturas semelhantes à do carcinoma ex-adenoma pleomórfico *in situ*.⁹⁹ A indução da transição epitélio-mesênquima (EMT) leva ao aumento dos níveis de metaloproteinase 2 (MMP-2), contribuindo para a degradação da membrana basal e favorecendo a migração celular e progressão tumoral.

O ensaio de invasão neste estudo mostrou uma baixa taxa de invasão celular, indicando a natureza benigna do tumor. No entanto, o adenoma pleomórfico maligno apresenta uma alta taxa de invasão celular, além de invasão capsular, um fator crucial para sua recorrência. Yao et al.¹⁰⁰ estudaram perfis de expressão de RNA em glândula salivar para associar genes com invasão de cápsula. Eles demonstraram que a organização da

matriz extracelular e a via de sinalização *PI3K-Akt* podem desempenhar papéis fundamentais na tumorigênese do AP. A proteína da matriz oligomérica da cartilagem (COMP) apresentou correlação com a invasão capsular do AP sugerindo um potencial como fator prognóstico.

Em resumo, os resultados deste estudo enfatizam a viabilidade e a importância de utilizar culturas celulares para estudar a biologia e as características moleculares do adenoma pleomórfico. O estabelecimento desses modelos *in vitro* possibilita o aprofundamento da compreensão da patogênese, oferecendo oportunidades para o desenvolvimento de terapias direcionadas e prognóstico mais preciso.

6.1.2 Carcinoma adenoide cístico

Neste estudo, estabelecemos culturas primárias de três amostras distintas de carcinoma adenoide cístico, exibindo variações em relação perfil de agressividade e padrões de crescimento. Em adição, ao longo das passagens em cultura, foi observada manutenção consistente da viabilidade e morfologia das células tumorais.

As características dos tumores incluídos no estudo também são semelhantes às descritas na literatura, pois a glândula mais frequentemente afetada foi a parótida, principalmente em adultos, na faixa etária acima de 40 anos, e distribuída uniformemente por sexo.⁵⁰ Porém, nosso estudo diferiu da literatura porque a glândula menor apresentou um comportamento menos agressivo que os demais subgrupos. Além disso, na literatura, informa que os homens têm maior probabilidade de serem diagnosticados com tumores malignos e mais agressivos do que nas mulheres, conforme relatado por Israel et al.¹⁰¹ em seu trabalho. No entanto, no nosso estudo, o padrão sólido foi observado em paciente do gênero feminino.

Para a caracterização detalhada dos modelos estabelecidos, utilizamos marcadores amplamente reconhecidos na literatura científica. Além das mesmas usadas no adenoma pleomórfico, houve a adição do CD117/c-Kit, cuja superexpressão está associada a casos agressivos, invasão perineural, metástases à distância, além de um prognóstico mais desfavorável.¹⁰²

As células demonstraram expressão de actina de músculo liso, vimentina, p63, citoqueratina 14, c-Kit e Ki-67, apresentando a morfologia característica do carcinoma adenoide cístico e de tumores de natureza agressiva, independentemente do tipo histológico de cada paciente. No entanto, Freiburger et al.¹⁰³ descreveram que o carcinoma adenoide cístico de células fusiformes e padrão pseudoangiomatóide, apresentava expressão difusa de p40, ausência de CD117 e expressão focal de Ki-67. O padrão de expressão do c-Kit varia de acordo com o subtipo histológico. A maioria dos estudos reporta uma marcação forte de c-Kit no subtipo histológico sólido ou aqueles mais associados com malignidade e progressão tumoral em estádios III-IV, invasão perineural, recorrência local regional e metástase à distância, além de um prognóstico pior e baixa sobrevida.¹⁰⁴

Nos ensaios biológicos de viabilidade, migração e invasão realizados em carcinomas adenoides cístico, foi observada uma alta taxa de viabilidade celular. Os modelos de ACC apresentaram diferenças com relação ao número de células viáveis, o que poderia refletir a heterogeneidade observada entre os pacientes e possivelmente influenciar o prognóstico dos pacientes e impactar na seleção de terapias adequadas. Esses ensaios revelaram alta taxa de viabilidade celular em dois carcinomas (ACC2 e ACC3) do tipo histológico cribriforme e sólido, respectivamente, manutenção proliferativa e viabilidade por 96h, enquanto o terceiro paciente do tipo histológico tubular exibiu baixa atividade proliferativa. O ensaio de migração celular mostrou uma alta taxa de migração. No modelo ACC1, a taxa de cicatrização foi de 40%, enquanto no ACC2 foi de 50%, e no ACC3 foi de 60%, em 48 horas, demonstrando alta capacidade de invasão dessas células.

Estudos, como o de Ji et al.¹⁰⁵, investigaram a influência de marcadores como Claudin 7 (CLDN7) na sua correlação com a progressão do CAC, particularmente através da promoção de Transição Epitélio-Mesênquima (EMT) e ativação da via Wnt/ β -catenina. A perda de E-caderina, indicativa de EMT, e a expressão aumentada de marcadores mesenquimais como N-caderina e vimentina conferem um fenótipo móvel às células tumorais.¹⁰⁶ Ren et al.¹⁰⁷ também destacaram que a superexpressão de EGFR induz EMT e aumenta o potencial metastático das células tumorais. A expressão de EGFR foi associada ao aumento da viabilidade celular, migração e invasão em carcinomas

adenoides cístico.

Alguns biomarcadores, como o c-Kit, já foram relatados como alvos promissores em estratégias terapêuticas. Tang et al.¹⁰⁸ sugeriram que o tratamento com Imatinibe – o inibidor do c-Kit – é capaz de modular a migração e invasão de células do carcinoma. No entanto, a eficácia dessa abordagem no carcinoma adenoide cístico ainda é controversa, pois, embora alta expressão de c-Kit no CAC tenha sido bem estabelecida, esses estudos foram amplamente decepcionantes, com uma taxa de resposta global (TRG) abaixo de 5% e sem melhora significativa na sobrevida dos pacientes.^{109,110}

Em resumo, este estudo possibilitou o estabelecimento de culturas primárias de carcinoma adenoide cístico, com características únicas de agressividade e crescimento. A utilização de marcadores proteicos específicos foi essencial para a caracterização detalhada desses modelos, oferecendo uma abordagem promissora para estudos desse tumor.

6.2 Estabelecimento de xenoenxertos e imunoistoquímica

Neste estudo, obtivemos sucesso no estabelecimento de modelo de xenoenxerto para adenoma pleomórfico, utilizando implantes de fragmentos tumorais no dorso de camundongos imunodeficientes. O adenoma pleomórfico apresenta diversidade celular e morfológica e, embora seja um tumor benigno, seu crescimento como PDX pode estar relacionado à presença de subpopulações celulares com maior capacidade proliferativa permitindo sua progressão mesmo na ausência de características típicas de malignidade.

Observamos um crescimento tumoral consistente após 7 meses do implante, seguido por análise de imunoistoquímica para caracterizar a expressão de marcadores específicos. A comparação da expressão proteica entre tecido de pacientes e amostras de PDX (Patient-Derived Xenograft) revelou a preservação dos marcadores e da arquitetura histológica típica do tumor original, incluindo áreas de estroma mixóide, células epiteliais e mioepiteliais.

No entanto, observamos uma diminuição na expressão de vimentina nos

PDXs, assim como a ausência de formação de glândulas bem diferenciadas, denotado pela ausência de expressão de marcadores como CK7. Estudos da expressão de CK7 em neoplasias de glândulas salivares são raros e, portanto, o uso desse padrão de expressão desse anticorpo em tumores de glândulas salivares tem atualmente pouco valor diagnóstico. Meer et al. (2007) demonstraram expressão de CK7 em neoplasias benignas e malignas das glândulas salivares e, mais específica e intensamente, nas células luminiais dos ductos salivares, enquanto as células acinares, basais e mioepiteliais se coram com menos intensidade ou não se coram de todo.¹⁰¹

No adenoma pleomórfico, o CK7 é reconhecido por sua expressão difusa em células epiteliais ductais¹¹¹, e sua co-expressão com *Notch* em estruturas ductais indica a ativação da via β -catenina na diferenciação celular.¹¹² Estudos anteriores também sugerem que a via *Notch* pode desempenhar um papel na diferenciação e no potencial metastático de tumores malignos, como o carcinoma adenoide cístico e o ameloblastoma maligno.^{113,114} A transformação maligna no adenoma pleomórfico é rara.^{113,114}

Katabi et al.⁴⁰ e Avadhani et al.¹¹³ demonstraram que a sensibilidade da imunocoloração *PLAG1* na predição de AP é muito alta e que *PLAG1* negativo pode ser útil para excluir um diagnóstico de AP. Ren et al.¹⁰⁶ observaram crescimento *in vitro* e *in vivo* de adenoma pleomórfico em camundongos *nude*, preservando a organização e função estrutural das glândulas, confirmando a positividade das mesmas proteínas, como actina de músculo liso (AML), proteína S-100 e calponina. Shen et al.¹¹⁴ indicaram em seu estudo que o biomarcador CD44 induz proliferação, invasão e evasão de apoptose, além de alterações fenotípicas *in vitro* e tumorigênese *in vivo* em modelos PDX de adenoma pleomórfico. Em adição, a partir de um tumor derivado de um paciente, Falcão et al.⁴⁰ estabeleceram e caracterizaram uma linhagem celular AP expressando importantes marcadores epiteliais e mioepiteliais, como vimentina, S-100, citoqueratina e AML. Esses marcadores também foram observados no tumor parental, e foram detectadas metaloproteinases e seus inibidores. Essas células representavam uma população mista de células epiteliais e mioepiteliais neoplásicas, mantendo as características fenotípicas do tumor parental.⁴⁰

O sucesso no estabelecimento de modelos de xenoenxerto e

confirmação imunoistoquímica para adenoma pleomorfo fornece uma base para investigações futuras, permitindo um melhor entendimento dos mecanismos moleculares envolvidos na progressão do adenoma pleomórfico.

Apesar dos esforços, os xenoenxertos de carcinoma adenoide cístico não resultaram em crescimento tumoral em nenhuma das três amostras estudadas. Diversos fatores podem contribuir para essa dificuldade, como o desafio de replicar o microambiente tumoral específico do carcinoma adenoide cístico devido ao seu crescimento lento e a propensão para invasão perineural, além dos próprios desafios de se desenvolver xenoenxertos. Essa falha no crescimento de xenoenxerto de carcinoma adenoide cístico traz como alternativa o uso de modelos como de engenharia de tecidos ou organoides. No entanto, Guimarães et al.¹¹⁵ e Takada et al.⁵, estabeleceram com sucesso um modelo de xenoenxerto ortotópico de CAC, recapitulando as características histológicas e moleculares do tumor CAC original. Além disso, Guimarães et al.¹¹⁵ estratificou pacientes com carcinoma adenoide cístico apresentando resposta aprimorada aos inibidores de histona desacetilase (HDAC).

Schuch et al.⁸³ realizaram uma revisão sistemática sobre modelos de xenotransplantes derivados de pacientes (PDX) em tumores de cabeça e pescoço. Dos 63 artigos incluídos na revisão sistemática, 11 utilizaram modelos a partir de biópsias de tumores de glândula salivar, sendo a maioria focado no carcinoma adenoide cístico (CAC). Os tumores foram, em sua maioria, implantados na região do dorso (86,3%) dos animais e os modelos mais utilizados foram camundongo NSG e o camundongo nude.

Apesar das técnicas imunoistoquímicas serem bastante utilizadas para caracterizar a expressão dos marcadores e diferenciar tumores benignos e malignos, a escassez de modelos animais e *in vitro*, a raridade de lesões precursoras e associações hereditárias, bem como a heterogeneidade destes tumores, afetam a acurácia dos achados moleculares disponíveis. Dessa forma, estudos são necessários para a identificação de marcadores diagnósticos, prognósticos e preditivos para esses tumores, que, associados à análise histopatológica e dados clínicos permitam um manejo mais direcionado desses tumores.^{9,116}

6.3 Desenvolvimento de esferoides

Neste estudo foi possível desenvolver e caracterizar esferoides derivados de três modelos celulares de carcinoma adenoide cístico (ACC1, ACC2, ACC3). Essa etapa do estudo foi realizada em colaboração com a Dra. Christine Delporte da Universidade Livre de Bruxelas, através do Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior da CAPES. O grupo da Dra Delporte possui vasta experiência em glândulas salivares normais, e recentemente, estabeleceram e caracterizaram modelos de organoides utilizando métodos bioquímicos, funcionais, moleculares e biológicos celulares. Este modelo utiliza um hidrogel personalizado desenvolvido para o cultivo dos organoides, seguindo um protocolo estabelecido para garantir a consistência dos procedimentos (dados não publicados). Poucos modelos de esferoides e organoides de carcinoma adenóide cístico (CAC) foram estabelecidos, utilizando Matrigel ou Cultrex.⁷¹⁻⁷⁵

Os modelos estabelecidos em nosso estudo apresentaram morfologia similar às culturas primárias de ACC, com estruturas ramificadas, e expressaram marcadores específicos de células tumorais (CAC), validando sua fidelidade ao tumor original. Os esferoides foram formados por células tumorais e variaram em tamanho quando cultivados em Matrigel, Hidrogel ou em suspensão, com células viáveis e apoptóticas coexistindo, imitando a heterogeneidade tumoral *in vivo*.

As células de ACC demonstraram boa viabilidade nas condições de cultura 3D, destacando o potencial dos esferoides como modelo para estudar comportamento tumoral e resposta a medicamentos. A medição das áreas dos esferoides mostrou variação no crescimento dos três modelos (ACC1, ACC2 e ACC3). A imunofluorescência foi usada para identificar marcadores como Ezrin, PIP, CLIP2, Aquaporina 1, 3 e 5, para entender a biologia do CAC (dados não apresentados).

Além disso, comparações com estudos de organoides de outros tipos de câncer, como carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço, mostraram que organoides podem prever respostas a tratamentos e fornecer informações valiosas sobre o comportamento tumoral. As duas estratégias principais para a construção dos esferoides de glândulas salivares reforçam a

relevância dos esferoides para estudar aspectos como invasão tumoral, heterogeneidade celular e resposta a tratamentos.

Em conclusão, os esferoides desenvolvidos neste estudo representam uma ferramenta promissora para entender melhor o CAC e desenvolver terapias mais eficazes.

6.4 Carcinoma mucoepidermoide

Até o momento, não conseguimos estabelecer um protocolo eficaz para o cultivo de células de carcinoma mucoepidermoide. Foram realizadas tentativas com duas amostras, porém, logo nos primeiros dias de cultivo, foi observado um crescimento predominante de fibroblastos em detrimento das células epidermoides. Estratégias para eliminar fibroblastos, como o uso de geneticina (G418) e solução salina equilibrada de Hank (HBSS), não foram bem-sucedidas, levando à interrupção dos experimentos de cultura.

A combinação de geneticina e HBSS tem sido amplamente utilizada para a eliminação seletiva de fibroblastos e o enriquecimento de culturas de células epiteliais. A geneticina, um antibiótico aminoglicosídeo, age inibindo a síntese proteica e promovendo a morte celular, sendo mais tóxica para fibroblastos do que para células epiteliais. Já o HBSS é uma solução tampão essencial para manter a osmolaridade e o pH celular, frequentemente empregada para remoção de resíduos celulares e fatores de crescimento que favorecem fibroblastos. Estudos anteriores sugerem que a aplicação combinada de HBSS com outras abordagens, como choque térmico ou digestão enzimática, pode auxiliar na redução da contaminação por fibroblastos.^{87,88} No entanto, em nossas tentativas, essa estratégia não foi suficiente para permitir o crescimento das células epidermoides.

Além da dificuldade em estabelecer culturas celulares, também não houve desenvolvimento de xenoenxertos (PDX) para esse tipo tumoral. Assim, a ausência de crescimento celular viável tanto *in vitro* quanto *in vivo* reforça os desafios inerentes ao estudo do carcinoma mucoepidermoide e dos tumores de glândula salivar em geral. O baixo número de casos, a ausência de crescimento tumoral em xenoenxertos, a dificuldade em estabelecer culturas celulares devido ao rápido crescimento proliferativo dos fibroblastos em carcinoma

mucoepidermoide, e a falta de análise estatística devido ao reduzido número de casos disponíveis representam limitações deste estudo. Essas dificuldades reforçam a necessidade de novas abordagens para a modelagem desses tumores para o qual alternativas experimentais precisam ser mais exploradas.

A continuidade da pesquisa nesses modelos é crucial para o avanço de estratégias terapêuticas mais eficazes e personalizadas para pacientes com carcinoma adenoide cístico e carcinoma mucoepidermoide. Com os desafios enfrentados na criação de xenoenxertos, e do estabelecimento de um protocolo eficaz para o cultivo de células tumorais, destacamos a necessidade de explorar novas metodologias e tecnologias para aprimorar a modelagem *in vivo* e *in vitro* desses tumores.

7 CONCLUSÃO

Em conclusão, conseguimos estabelecer modelos celulares e de xenoenxerto derivados de adenoma pleomórfico, sendo realizada a caracterização por imunocitoquímica, imunoistoquímica, além dos ensaios de comportamento biológico.

No caso do carcinoma adenoide cístico, também conseguimos estabelecer e caracterizar as culturas primárias por imunocitoquímica e ensaios de comportamento biológico, no entanto nenhuma das linhagens desenvolveu crescimento em xenoenxerto. Em adição, apresentamos o estabelecimento de esferoides em suspensão, matrigel e hidrogel, exibindo crescimento e áreas heterogêneas.

Em relação ao carcinoma mucoepidermoide, não conseguimos estabelecer o crescimento celular. Além disso, não houve desenvolvimento de xenoenxerto para esse tipo tumoral.

8 REFERÊNCIAS

- 1 Costa RF, de Oliveira CA, Gomes ÁNM, Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM. Molecular Aspects of Mucoepidermoid Carcinoma and Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Gland. *Head Neck Pathol* 2024 Apr 24;18(1):34.
- 2 Costa RF, Cadoná FC. Capsaicin ameliorates chemotherapy response via cancer hallmarks modulation: an overview of its synergic potential. *J Herbal Med* 2024 June; 45 (2024): 1008
- 3 El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. In WHO Classification of Tumours. 4th ed. France; 2017 p. 347.
- 4 Kordzińska-Cisek I, Cisek P, Grzybowska-Szatowska L. The Role of Prognostic Factors in Salivary Gland Tumors Treated by Surgery and Adjuvant Radio- or Chemoradiotherapy - A Single Institution Experience. *Cancer Manag Res* 2020 Feb 11; 12:1047-1067.
- 5 Takada K, Aizawa Y, Sano D, Okuda R, Sekine K, Ueno Y. et al. Establishment of PDX-derived salivary adenoid cystic carcinoma cell lines using organoid culture method. *IntJ Cancer* 2021 Jan 1;148(1):193-202.
- 6 Warner KA, Adams A, Bernardi L, Nor C, Finkel KA, Zhang Z. et al. Characterization of tumorigenic cell lines from the recurrence and lymph node metastasis of a human salivary mucoepidermoid carcinoma. *Oral Oncol* 2013 Nov;49(11):1059-66.
- 7 Zhang L, Li L, Wang Y, Liu Y, Li C. MC3 Mucoepidermoid carcinoma cell line enriched cancer stem-like cells following chemotherapy. *Oncol Lett* 2014 May;7(5):1569- 1575.
- 8 Skálová A, Hycza MD, Leivo I. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Salivary Glands. *Head Neck Pathol* 2022 Mar;16(1):40-53.
- 9 Alfieri S, Granata R, Bergamini C, Resteghini C, Bossi P, Licitra LF. et al. Systemic therapy in metastatic salivary gland carcinomas: A pathology-driven paradigm? *Oral Oncol* 2017 Mar; 66:58-63.
- 10 Pauli C, Hopkins BD, Prandi D, Shaw R, Fedrizzi T, Sboner A. et al. Personalized *In Vitro* and *In Vivo* Cancer Models to Guide Precision Medicine. *Cancer Discov* 2017 May;7(5):462-477.
- 11 Li J, Mitani Y, Rao PH, Perlaky L, Liu B, Weber RS, El-Naggar AK. Establishment and genomic characterization of primary salivary duct carcinoma cell line. *Oral Oncol* 2017 Jun; 69:108-114.

- 12 Warner KA, Herzog AE, Sahara S, Nör F, Castilho RM, Demirci H, Chepeha DB, Polverini PJ, Nör JE. Establishment and characterization of cMYB-expressing human salivary adenoid cystic carcinoma cell lines (UM-HACC-14, UM-HACC-6) and matching patient-derived xenograft model (UM-PDX-HACC-14). *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2024 Oct;138(4):516-531.
- 13 Bokhari MR, Greene J. *Pleomorphic Adenoma*. Treasure Island, 2020.
- 14 Kalwaniya DS, Meena R, Kumar D, Tolat A, Arya SV. A Review of the Current Literature on Pleomorphic Adenoma. *Cureus* 2023 Jul 22; 15 (7): e42311.
- 15 Toper MH, Sarioglu S. Molecular Pathology of Salivary Gland Neoplasms: Diagnostic, Prognostic, and Predictive Perspective. *Adv Anat Pathol* 2021 Mar; 28(2): 81-93.
- 16 Lopes MLDS, 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 Otorhinolaryngol* 2017 Jan;274(1):543-551.
- 17 Rajbhar R, Margam S, Fernandes G. Oral cavity salivary gland pleomorphic adenoma: a histomorphological case series. *Ann Diagn Pathol* 2024 Aug; 71:152306.
- 18 de Lima-Souza RA, Vieira GS, Kimura TC, Scarini JF, Lavareze L, Maciel TF, Gonçalves MWA, Egal ESA, Altemani A, Mariano FV. Insights into the molecular alterations of PLAG1 and HMGA2 associated with malignant phenotype acquisition in pleomorphic adenoma. *Crit Rev Oncol Hematol* 2024 Dec; 204:104494.
- 19 Byrd SA, Spector ME, Carey TE, Bradford CR, McHugh JB. Predictors of recurrence and survival for head and neck mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 2013 Sep;149(3):402-8.
- 20 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.
- 21 Lorini L, Ardighieri L, Bozzola A, Romani C, Bignotti E, Buglione M. et al. Prognosis and management of recurrent and/or metastatic head and neck adenoid cystic carcinoma. *OralOncol* 2021 Apr; 115:105213.
- 22 de Moraes EF, de Farias Moraes HG, de Almeida Freitas R, Coletta RD. Prognostic Significance of Histopathological Parameters for Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *Dent J (Basel)* 2023 Nov 9;11(11):262.
- 23 Lavareze L, Scarini JF, de Lima-Souza RA, Kimura TC, Gondak RO, Egal ESA, Altemani A, Mariano FV. Clinicopathological and survival profile of patients with salivary gland myoepithelial carcinoma: A systematic review. *J Oral Pathol Med* 2023 Feb;52(2):101-108.

24 Hidalgo M, Amant F, Biankin AV, Budinská E, Byrne AT, Caldas C. et al. Patient- derived xenograft models: an emerging platform for translational cancer research. *Cancer Discov* 2014 Sep;4(9):998-1013.

25 Liu Y, Wu W, Cai C, Zhang H, Shen H, Han Y. Patient-derived xenograft models in cancer therapy: technologies and applications. *Signal Transduct Target Ther* 2023 Apr 12;8(1):160.

26 Hudu SA, Alshrari AS, Syahida A, Sekawi Z. Cell Culture, Technology: Enhancing the Culture of Diagnosing Human Diseases. *J Clin Diagn Res* 2016 Mar;10(3):DE01-5.

27 Porcheri C, Meisel CT, Mitsiadis TA. Molecular and Cellular Modelling of Salivary Gland Tumors Open New Landscapes in Diagnosis and Treatment. *Cancers (Basel)* 2020 Oct24;12(11):3107.

28 Ghannam MG, Singh P. Anatomy, Head and Neck, Salivary Glands. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–.

29 Pan SY, de Groh M, Morrison H. A Case-Control Study of Risk Factors for Salivary Gland Cancer in Canada. *J Cancer Epidemiol* 2017 Jan 4; 2017:4909214.

30 Khurshid Z, Zafar MS, Khan RS, Najeeb S, Slowey PD, Rehman IU. Role of SalivaryBiomarkers in Oral Cancer Detection. *Adv Clin Chem* 2018; 86:23-70.

31 Young A, Okuyemi OT. Malignant Salivary Gland Tumors. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2025 Jan–

32 Key S, Chia C, Hasan Z, Sundaresan P, Dwivedi RC, Riffat F. Systematic review of prognostic factors in carcinoma ex pleomorphic adenoma. *Oral Oncol* 2022 Oct; 133:106052.

33 Mukaigawa T, Hayashi R, Hashimoto K, Ugumori T, Hato N, Fujii S. Programmed death ligand-1 expression is associated with poor disease-free survival in salivary gland carcinomas. *J Surg Oncol* 2016 Jul;114(1):36-43.

34 Lima SS, Soares AF, de Amorim RF, Freitas R de A. Epidemiologic profile of salivarygland neoplasms: analysis of 245 cases. *Braz J Otorhinolaryngol* 2005 May-Jun;71(3):335- 40.

35 Jones AV, Craig GT, Speight PM, Franklin CD. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. *Oral Oncol* 2008 Apr;44(4):407-17.

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

37 Reddy V, Wadhwan V, Aggarwal P, Sharma P, Reddy M. A benign salivary

gland tumor of minor salivary gland mimicking an epithelial malignancy. *Contemp Clin Dent*. 2015 Apr-Jun;6(2):247-9.

38 Pang J, Houlton JJ. Management of Malignant Salivary Gland Conditions. *Surg Clin North Am* 2022 Apr;102(2):325-333.

39 Young A, Okuyemi O. Benign Salivary Gland Tumors. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022; 1-38.

40 Falcão AS, Kataoka MS, Ribeiro NA, Diniz JA, Jr Alves SM, Jr Ribeiro AL. et al. A novel cell line derived from pleomorphic adenoma expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and shows numeric chromosomal anomalies. *PloS one* 2014 Aug; 9(8): e105231.

41 Alsanie I, Rajab S, Cottom H, Adegun O, Agarwal R, Jay A, Graham L, James J, Barrett AW, van Heerden W, de Vito M, Canesso A, Adisa AO, Akinshipo AO, Ajayi OF, Nwoga MC, Okwuosa CU, Omitola OG, Orikpete EV, Soluk-Tekkesin M, Bello IO, Qannam A, Gonzalez W, Pérez-de-Oliveira ME, Santos-Silva AR, Vargas PA, Toh EW, Khurram SA. Distribution and Frequency of Salivary Gland Tumours: An International Multicenter Study. *Head Neck Pathol* 2022 Dec;16(4):1043-1054.

42 Katabi N, Xu B, Jungbluth AA, Zhang L, Shao SY, Lane J. et al. PLAG1 immunohistochemistry is a sensitive marker for pleomorphic adenoma: a comparative study with PLAG1 genetic abnormalities. *Histopathol* 2018 Jan;72(2):285-293.

43 Meyer MT, Watermann C, Dreyer T, Ergün S, Karnati S. 2021 Update on Diagnostic Markers and Translocation in Salivary Gland Tumors. *I J Mol Sci* 2021 Jun 24; 22(13):6771.

44 Antony J, Gopalan V, Smith RA, Lam AK. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a comprehensive review of clinical, pathological and molecular data. *Head Neck Pathol* 2012 Mar;6(1):1-9.

45 Kligerman MP, Jin M, Ayoub N, Megwalu UC. Comparison of Parotidectomy with Observation for Treatment of Pleomorphic Adenoma in Adults. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* 2020 Nov 1;146(11):1027-1034.

46 Jee KJ, Persson M, Heikinheimo K, Passador-Santos F, Aro K, Knuutila S. et al. Genomic profiles and CRTC1-MAML2 fusion distinguish different subtypes of mucoepidermoid carcinoma. *Mod Pathol* 2013 Feb;26(2):213-22.

47 Ullah A, Khan J, Waheed A, Karki NR, Goodbee M, Yasinzai AQK. et al. Mucoepidermoid Carcinoma of the Salivary Gland: Demographics and Comparative Analysis in U.S. Children and Adults with Future Perspective of Management. *Cancers (Basel)* 2022 Dec 30;15(1):250.

48 Nakano S, Okumura Y, Murase T, Nagao T, Kusafuka K, Urano M, Yamamoto H, Kano S, Tsukahara K, Okami K, Kawakita D, Nagao T, Hanai N,

Iwai H, Kawata R, Tada Y, Nibu KI, Inagaki H. Salivary mucoepidermoid carcinoma: histological variants, grading systems, CRTC1/3-MAML2 fusions, and clinicopathological features. *Histopathology* 2022 Mar;80(4):729-735.

49 Cipriani NA, Lusardi JJ, McElherne J, Pearson AT, Olivas AD, Fitzpatrick C, Lingen MW, Blair EA. Mucoepidermoid Carcinoma: A Comparison of Histologic Grading Systems and Relationship to MAML2 Rearrangement and Prognosis. *Am J Surg Pathol* 2019 Jul;43(7):885-897.

50 van Weert S, Lissenberg-Witte BI, Bloemena E, Leemans CR. Mucoepidermoid carcinoma of the head and neck: CRTC1/3 MAML 2 translocation and its prognosticators. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2022 May;279(5):2573-2581.

51 Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, Vander Poorten V, Triantafyllou A, Hunt JL. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--An update. *Oral Oncol* 2015 Jul;51(7):652-61.

52 Van Der Wal JE, Becking AG, Snow GB, Van Der Waal I. Distant metastases of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands and the value of diagnostic examinations during follow-up. *Head Neck* 2002 Aug; 24: 779–783.

53 Sahara S, Herzog AE, Nör JE. Systemic therapies for salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Am J Cancer Res* 2021 Sep 15;11(9):4092-4110.

54 Brayer KJ, Frerich CA, Kang H, Ness SA. Recurrent Fusions in MYB and MYBL1 Define a Common, Transcription Factor-Driven Oncogenic Pathway in Salivary Gland Adenoid Cystic Carcinoma. *Cancer Discov* 2016 Feb;6(2):176-87.

55 Cantù G. Adenoid cystic carcinoma. An indolent but aggressive tumour. Part A: from aetiopathogenesis to diagnosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2021 Jun; 41(3):206-214.

56 West RB, Kong C, Clarke N, Gilks T, Lipsick JS, Cao H. et al. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. *Am J Surg Pathol* 2011 Jan;35(1):92-9.

57 Dillon PM, Petroni GR, Horton BJ, Moskaluk CA, Fracasso PM, Douvas MG. et al. A Phase II Study of Dovitinib in Patients with Recurrent or Metastatic Adenoid Cystic Carcinoma. *Clin Cancer Res* 2017 Aug 1;23(15):4138-4145.

58 van Herpen C, Vander Poorten V, Skalova A, Terhaard C, Maroldi R, van Engen A. et al. Salivary gland cancer: ESMO-European Reference Network on Rare Adult Solid Cancers (EURACAN) Clinical Practice Guideline for diagnosis, treatment and follow-up. *ESMO Open* 2022 Dec;7(6):100602.

59 Faur AC, Buzaş R, Lăzărescu AE, Ghenciu LA. Current Developments in Diagnosis of Salivary Gland Tumors: From Structure to Artificial Intelligence.

Life 2024 Jun 5; 14(6):727.

60 Jubelin C, Muñoz-Garcia J, Griscom L, Cochonneau D, Ollivier E, Heymann MF. et al. Three-dimensional in vitro culture models in oncology research. *Cell Biosci* 2022;12(1):155.

61 Katt ME, Placone AL, Wong AD, Xu ZS, Searson PC. In Vitro Tumor Models: Advantages, Disadvantages, Variables, and Selecting the Right Platform. *Front BioengBiotechnol.* 2016; 4:12.

62 Lee EJ, Kim J, Lee SA, Kim EJ, Chun YC, Ryu MH. et al. Characterization of newly established oral cancer cell lines derived from six squamous cell carcinoma and two mucoepidermoid carcinoma cells. *Exp Mol Med* 2005 Oct 31;37(5):379-90.

63 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 invitro investigation of the effects of extracellular matrix on the expression of these adhesion molecules. *J Oral Pathol Med* 2004 Oct;33(9):574-80.

64 Lourenço SV, Lima DMC. 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.

65 Hajiabbas M, D'Agostino C, Simińska-Stanny J, Tran SD, Shavandi A, Delporte C. Bioengineering in salivary gland regeneration. *J Biomed Sci* 2022 Jun 6;29(1):35.

66 Bierbaumer L, Schwarze UY, Gruber R, Neuhaus W. Cell culture models of oral mucosal barriers: A review with a focus on applications, culture conditions and barrier properties. *Tissue Barriers* 2018; 6:1479568.

67 Jensen C, Teng Y. Is It Time to Start Transitioning From 2D to 3D Cell Culture? *Front Mol Biosci* 2020; 7:33.

68 Lee SY, Koo IS, Hwang HJ, Lee DW. In Vitro three-dimensional (3D) cell culture tools for spheroid and organoid models. *SLAS Discov* 2023; 28:119-137.

69 Zanten Jv, Jorritsma-Smit A, Westra H, Baanstra M, Bruin-Jellema Ad, Allersma D, Gareb B, Coppes RP. Optimization of the Production Process of Clinical-Grade Human Salivary Gland Organoid-Derived Cell Therapy for the Treatment of Radiation-Induced Xerostomia in Head and Neck Cancer. *Pharmaceutics* 2024; 16(3):435.

70 Wang B, Gan J, Liu Z, Hui Z, Wei J, Gu X, Mu Y, Zang G. An organoid library of salivary gland tumors reveals subtype-specific characteristics and biomarkers. *J Exp Clin Cancer Res* 2022 Dec 17;41(1):350.

- 71 Munguia-Lopez JG; Pillai S; Zhang Y; Gantz A; Camasao DB; Nazhat SN; Kinsella JM; Tran SD. Expansion of functional human salivary acinar cell spheroids with reversible thermo-ionically crosslinked 3D hydrogels. *BioRxiv* 2024.
- 72 Heo JH, Kang D, Seo SJ, Jin Y. Engineering the Extracellular Matrix for Organoid Culture. *Int J Stem Cells* 2022 Feb 28;15(1):60-69.
- 73 Kim S, Min S, Choi YS, Jo SH, Jung JH, Han K, Kim J, An S, Ji YW, Kim YG, Cho SW. Tissue extracellular matrix hydrogels as alternatives to Matrigel for culturing gastrointestinal organoids. *Nat Commun* 2022 Mar 30;13(1):1692.
- 74 Gan Z, Qin X, Liu H, Liu J, Qin J. Recent advances in defined hydrogels in organoid research. *Bioact Mater* 2023 Jun 13; 28:386-401.
- 75 Schaafsma P, Kracht L, Baanstra M, Jellema-de Bruin AL, Coppes RP. Role of immediate early genes in the development of salivary gland organoids in polyisocyanopeptide hydrogels. *Front Mol Biosci* 2023 Feb 2;10:1100541.
- 76 Cardoso BD, Castanheira EMS, Lanceros-Méndez S, Cardoso VF. Recent Advances on Cell Culture Platforms for In Vitro Drug Screening and Cell Therapies: From Conventionalto Microfluidic Strategies. *Adv Healthc Mater* 2023 Jul;12(18): e2202936.
- 77 Rose SC, Larsen M, Xie Y, Sharfstein ST. Salivary Gland Bioengineering. *Bioeng* 2024 Dec 26; 11(1):28.
- 78 Fujii E, Kato A, Suzuki M. Patient-derived xenograft (PDX) models: characteristics and points to consider for the process of establishment. *J Toxicol Pathol* 2020 Jul ;33(3):153-160.
- 79 Kersten K, de Visser KE, van Miltenburg MH, Jonkers J. Genetically engineered mouse models in oncology research and cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2017 Feb;9(2):137-153.
- 80 Hoge ACH, Getz M, Zimmer A, Ko M, Raz L, Beroukhim R. et al. DNA- based copynumber analysis confirms genomic evolution of PDX models. *NPJ Precis Oncol* 2022 Apr 28;6(1):30.
- 81 Shultz LD, Lyons BL, Burzenski LM, Gott B, Chen X, Chaleff S. et al. Human lymphoid and myeloid cell development in NOD/LtSz-scid IL2R gamma null mice engraftedwith mobilized human hemopoietic stem cells. *J Immunol* 2005 May 15;174(10):6477-89.
- 82 Amaral R, Zimmermann M, Ma AH, Zhang H, Swiech K, Pan CX. A Simple Three- Dimensional In Vitro Culture Mimicking the In Vivo-Like Cell Behavior of Bladder Patient-Derived Xenograft Models. *Cancers (Basel)* 2020 May 21;12(5):1304.
- 83 Keysar SB, Eagles JR, Miller B, Jackson BC, Chowdhury FN, Reisinger J. et

al. Salivary Gland Cancer Patient-Derived Xenografts Enable Characterization of Cancer Stem Cells and New Gene Events Associated with Tumor Progression. *Clin Cancer Res* 2018 Jun 15;24(12):2935-2943.

84 Schuch LF, Silveira FM, Wagner VP, Borgato GB, Rocha GZ, Castilho RM, Vargas PA, Martins MD. Head and neck cancer patient-derived xenograft models - A systematic review. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2020 Nov;155:103087

85 Aparicio S, Hidalgo M, Kung AL. Examining the utility of patient-derived xenograft mouse models. *Nat Rev Cancer* 2015 May;15(5):311-6.

86 Morton CL, Houghton PJ. Establishment of human tumor xenografts in immunodeficient mice. *Nat Protoc* 2007;2(2):247-50.

87 Sobiepanek A, Kowalska P, Soszyńska M, Ścieżyńska A. Implementation of Geneticin in the in vitro cell culture and in vivo studies. *Rev Res Cancer Treat* 2020; 6: 79-87.

88 Grevys A, Nilsen J, Sand KMK, Daba MB, Øynebråten I, Bern M, McAdam MB. A human endothelial cell-based recycling assay for screening of FcRn targeted molecules. *Nat Commun* 2018; 9: 621.

89 Jabbarzadeh M, Hamblin MR, Pournaghi-Azar F, Vakili Saatloo M, Kouhsoltani M, Vahed N. Ki-67 expression as a diagnostic biomarker in odontogenic cysts and tumors: A systematic review and meta-analysis. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects* 2021 Feb 13; 15(1):66-75.

90 Gao XL, Wu JS, Cao MX, Gao SY, Cen X, Jiang YP. et al. Cytokeratin-14 contributes to collective invasion of salivary adenoid cystic carcinoma. *PLoS One* 2017 Feb 2; 12(2): e0171341.

91 Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BV. Myoepithelial cells (MEC) of the salivary glands in health and tumors. *J Clin Diagn Res* 2015 Mar;9(3): ZE14–ZE18.

92 Shah AA, Mulla AF, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. *J Oral Maxillofac Pathol* 2016 Sep-Dec; 20 (3): 480-490.

93 Ravi M, Boaz K, Natarajan S, Lewis A, Prasad M, Yellapurkar S. Expression of α - smooth muscle actin in benign and malignant salivary gland tumors: Na immunohistochemical study. *Indian J Pathol Microbiol* 2018 Oct- Dec;61(4):479-484.

94 Ben-Izhak O, Akrish S, Nagler RM. Ki67 and salivary cancer. *Cancer Invest* 2008 Dec;26(10):1015-23.

96 de Lima-Souza RA, Scarini JF, Lavareze L, Emerick C, Crescencio LR, Domingues RR, Paes Leme AF, Mariz BALA, Bastos DC, Machado RA, Tincani AJ, Del Negro A, Chone CT, Kowalski LP, Egal ESA, Altemani A, Mariano FV. Discovery proteomics reveals potential protein signature associated with

malignant phenotype acquisition in pleomorphic adenoma. *Oral Dis.* 2023 Apr;29(3):1017-1027.

96 Xu Y, Sun X, Chen J, Xu J, Wei J. Knockdown of lncRNA ENST00000603829 Inhibits the Proliferation and Invasion of Salivary Gland Pleomorphic Adenoma through Regulating Cyclin D1. *Appl Bionics Biomech* 2022 Apr 27; 2022:8805305.

97 Bartkowiak E, Piwowarczyk K, Bodnar M, Kosikowski P, Chou J, Woźniak A. et al. Expression of p16^{Ink4a} protein in pleomorphic adenoma and carcinoma ex pleomorphic adenoma proves diversity of tumour biology and predicts clinical course. *J Clin Pathol* 2022 Sep;75(9):605-611.

98 Maruyama S, Yamazaki M, Abé T, Cheng J, Saku T, Tanuma JI. Hypoxia-Induced Biosynthesis of the Extracellular Matrix Molecules, Perlecan and Fibronectin, Promotes the Growth of Pleomorphic Adenoma Cells In Vitro Models. *Biomed* 2023 Nov 6;11(11):2981.

99 Navarini NF, Araújo VC, Brown AL, Passador-Santos F, Souza IF, Napimoga MH. et al. The EGF signaling pathway influences cell migration and the secretion of metalloproteinases by myoepithelial cells in pleomorphic adenoma. *Tumour Biol* 2015 Jan; 36:205-11.

100 Yao X, Guan H, Lin Y, Li Y, Ou Y, Yan M. et al. Expression of cartilage oligomeric matrix protein (COMP) associates with capsular invasion in salivary gland pleomorphic adenoma. *J Oral Pathol Med* 2022 Mar;51(3):290-300.

102 Israel Y, Rachmiel A, Ziv G, Nagler R. Benign and Malignant Salivary Gland Tumors Clinical and Demographic Characteristics. *Anticancer Res* 2016 Aug;36(8):4151-4.

103 Tang YL, Fan YL, Jiang J, Li KD, Zheng M, Chen W. et al. C-kit induces epithelial- mesenchymal transition and contributes to salivary adenoid cystic cancer progression. *Oncotarget* 2014 Mar 30;5(6):1491-501.

104 Freiburger SN, Brada M, Fritz C, Höller S, Vogetseder A, Horcic M. et al. SalvGlandDx - a comprehensive salivary gland neoplasm specific next generation sequencing panel to facilitate diagnosis and identify therapeutic targets. *Neoplasia*. 2021 May;23(5):473-487.

105 Ji H, Ding X, Zhang W, Zheng Y, Du H, Zheng Y. et al. Claudin-7 Inhibits Proliferation and Metastasis in Salivary Adenoid Cystic Carcinoma Through Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell Transplant* 2020 Jan-Dec; 29:963689720943583.

106 da Silva FJ, Carvalho de Azevedo J Jr, Ralph ACL, Pinheiro JJV, Freitas VM, Calcagno DQ. Salivary glands adenoid cystic carcinoma: a molecular profile update and potential implications. *Front Oncol* 2023 Jul 5;13:1191218.

107 Ren G., Zhang Y, Wang J, Liu H, Dong F. Effect of Xylosyltransferase-I Silencing on Implanting Growth of Salivary Pleomorphic Adenoma. *Med Sci*

Monit 2018 Jun 5; 24: 3772-3781.

108 Pfeffer MR, Talmi Y, Catane R, Symon Z, Yosepovitch A. phase II study of Imatinib for advanced adenoid cystic carcinoma of head and neck salivary glands. *Oral Oncol* 2007; 43: 33–36.

109 Hotte SJ, Winkquist, EW, Lamont E, MacKenzie M, Vokes E, Chen EX. Imatinib Mesylate in Patients with Adenoid Cystic Cancers of the Salivary Glands Expressing c-kit: A Princess Margaret Hospital Phase II Consortium Study. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 585–590.

110 Meer S, Altini M. CK7+/CK20- immunoexpression profile is typical of salivary gland neoplasia. *Histopathol* 2007 Jul;51(1):26-32.

111 Takamine K, Ueda Y, Nakano K, Ochiai T, Sugita Y, Kubo K. et al. Notch as a Possible Cell Differentiation Factor in Pleomorphic Adenomas. *Int J Med Sci* 2015 Sep 5; 12(10):759-763.

133 Ding LC, She L, Zheng DL, Huang QL, Wang JF, Zheng FF. et al. Notch-4 contributes to the metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. *Oncol Rep* 2010 Aug; 24:363–368.

112 Nakano K, Siar CH, Tsujigiwa H, Nagatsuka H, Nagai N, Kawakami T. Notch signaling in benign and malignant ameloblastic neoplasms. *Eur J Med Res* 2008 Oct 27; 13:476–480.

113 Avadhani V, Cohen C, Siddiqui MT. Plag1: An immunohistochemical marker with limited utility in separating pleomorphic adenoma from other basaloid salivary gland tumors. *Acta Cytol* 2016; 60:240–245.

114 Shen S, Lu H, Liu L, Wang Y, Zhang C, Yang W. et al. The role of CD44 in Tumor- initiating Cells of Salivary Gland Pleomorphic Adenoma: more than a surface biomarker. *Oral Dis* 2020 Apr; 26: 547-557

115 Guimarães LD, Webber LP, Gaio EJ, Junior DS, Gonçalves P, Wick MJ. et al. Using PDX animal models to identify and stratify adenoid cystic carcinoma patients presenting an enhanced response to HDAC inhibitors. *Am J Cancer Res* 2023 Jan 15;13(1):143-160.

116 Garralda E, Paz K, López-Casas PP, Jones S, Katz A, Kann LM. et al. Integrated next-generation sequencing and avatar mouse models for personalized cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2014 May 1;20(9):2476-84.

ANEXOS

Anexo A – Documento com a aprovação do projeto no comitê de ética em pesquisa.



A.C. Camargo Cancer Center
Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa

COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

São Paulo, 03 de maio de 2021.

À
Cláudia Malheiros Coutinho Camillo.
Aluno: Raísa Ferreira da Costa (Doutorado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 2624/18D
“Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoinxertos derivados de tumores de glândula salivar.”

A Vice-coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em **03/05/2021**, **aprovou “ad referendum”** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático: “Perfis discriminantes nos tumores de glândula salivar: um estudo epidemiológico, proteômico e estabelecimento de modelos experimentais do adenoma pleomórfico, carcinoma adenoide cístico e carcinoma mucoepidermóide”, registrado neste CEP sob nº. 2624/18. O projeto afiliado em referência será Doutorado da aluna: Raísa Ferreira da Costa, sob orientação da Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo.

Atenciosamente,

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



Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br
Escaneie a imagem para verificar a autenticidade do documento
Hash SHA256 do PDF original #6a4dff5b2d92f6ab00142b1c96027e61c345c47e62bd16f0275dcb3075599527
<https://painel.autentique.com.br/documentos/f9af3340135ba9fd24a0d0a905c7e8da9df6336e2c7c1df6>



Anexo B – Documento com a publicação do resumo do projeto de doutorado no livro *Genética à serviço da sociedade*.

I CONBRAGEM
I CONGRESSO BRASILEIRO DE GENÉTICA MULTIDISCIPLINAR
BIOMARCADORES E O DIAGNÓSTICO DOS TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES
BIOMARKERS AND DIAGNOSIS OF SALIVARY GLAND TUMORS

Raísa Ferreira Costa¹, Cláudia Malheiros Coutinho Camillo¹

¹A.C.CAMARGO CANCER CENTER, São Paulo-Brasil.

RESUMO

Introdução: Os tumores de glândulas salivares representam tumores raros de cabeça e pescoço e apesar dos avanços sólidos alcançados pelas pesquisas, ainda há uma necessidade intensa de investigar biomarcadores que auxiliem no diagnóstico e prognóstico das neoplasias das glândulas salivares e que expliquem a sua evolução e progressão. **Objetivos:** O presente estudo de revisão narrativa objetivou abordar mecanismos possíveis envolvidos na gênese dos tumores, usando como base o uso de biomarcadores para o tratamento e diagnóstico dos tumores de glândulas salivares. **Metodologia:** Foi realizado um levantamento na literatura, no período de 2011 a 2020, em diferentes bases de dados, SciELO, da U.S. National Library of Medicine e do National Institutes Health (PubMed) e das bases de dados Web of Science. Como estratégia de busca, foram utilizados os seguintes termos: "Salivary gland tumors" and "Biomarkers" selecionados em consulta com o Medical Subject Headings (MeSH). 10 artigos foram selecionados para esta revisão. **Resultados e Discussão:** Dentre os tumores de glândulas salivar, os adenomas pleomórficos representam os tumores mais frequentes. Alguns estudos sugerem que a origem do tumor é derivada do aumento da proliferação de células ductais na glândula salivar, secundariamente devido a uma lesão no epitélio em consequência de processo inflamatório. No carcinoma mucoepidermoide, a presença de proteínas de fusão, derivadas de rearranjos cromossômicos, constituem um importante fator de diagnóstico e prognóstico, como por exemplo CRTC1-MAML2 que está relacionada à proliferação e diferenciação celular. Já o carcinoma adenoide cístico apresenta uma translocação resultando em uma fusão dos genes MYB-NFIB que contribui para a proliferação, diferenciação celular e metástase. Esses tumores são compostos por células luminais e aluminais dispostas em padrões morfológicos característicos que auxiliam no diagnóstico e também apresentam associação com o prognóstico. **Conclusões:** Assim, a avaliação de alterações na expressão proteica e alterações genéticas possibilita o melhor entendimento da biologia tumoral e o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas para esses tumores.

Palavras-Chave Tumores de glândula salivar; Diagnóstico; Biomarcadores; Proliferação; Diferenciação celular.

Anexo C – Documento com a publicação do artigo de revisão no *Head and Neck Pathology*.

Head and Neck Pathology (2024) 18:34
https://doi.org/10.1007/s12105-024-01629-2

REVIEW



Molecular Aspects of Mucoepidermoid Carcinoma and Adenoid Cystic Carcinoma of the Salivary Gland

Raísa Ferreira Costa¹ · Carolinne Alves de Oliveira¹ · Ágatha Nagli de Mello Gomes¹ · Sílvia Vanessa Lourenço² · Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo¹

Received: 8 January 2024 / Accepted: 12 February 2024
© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2024

Abstract

Background Salivary gland tumors (SGTs) are rare and highly heterogeneous lesions, making diagnosis a challenging activity. In addition, the small number of studies and samples evaluated hinders the determination of prognosis and diagnosis. Despite the solid advances achieved by research, there is still an intense need to investigate biomarkers for diagnosis, prognosis and that explain the evolution and progression of SGTs.

Methods We performed a comprehensive literature review of the molecular alterations focusing on the most frequent malignant SGTs: mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma.

Results Due to the importance of biomarkers in the tumorigenic process, this review aimed to address the mechanisms involved and to describe molecular and biomarker pathways to better understand some aspects of the pathophysiology of salivary gland tumorigenesis.

Conclusions Molecular analysis is essential not only to improve the diagnosis and prognosis of the tumors but also to identify novel driver pathways in the precision medicine scenario.

Keywords Salivary gland neoplasms · Mucoepidermoid carcinoma · Adenoid cystic carcinoma · Tumor biomarkers · Genetics · microRNAs

Abbreviations

MEC	Mucoepidermoid Carcinoma	PD-L1	Programmed cell death - ligand1
ACC	Adenoid cystic carcinoma	EGFR	Epidermal growth factor receptor
HGT	High-grade transformation	HCN2	hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-activated
IHC	Immunohistochemistry	H3K9me3	histone H3 lysine 9 trimethylation
NGS	Next Generation Sequencing	H3K9ac	histone H3 lysine 9 acetylation
SDC	Salivary Duct carcinoma	lncRNA	long non-coding RNA
miRNAs	MicroRNAs	SGC	Salivary gland carcinoma
CK	Cytokeratins	CASP	Caspases
CDKs	Cyclin-dependent kinases	BCL2	B cell Lymphoma 2
EMT	Epithelial-Mesenchymal Transition	PTEN	Phosphatase and tensin homologue
MDM2	Murine double minute 2	OS	overall survival
		ORR	objective response rates
		RFS	recurrence free survival
		PDX	patient derived xenograft

✉ Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo
ccamilo@accamargo.org.br

¹ International Research Center, A.C.Camargo Cancer Center, Rua Taguá, 440 – Primeiro andar, São Paulo 01508-010, Brazil

² Department of General Pathology, Dental School, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

Published online: 24 April 2024

Springer

Anexo D – Documento com a publicação do artigo de revisão no *Journal of Herbal Medicine* com parceria com a Dra. Francine Cadoná.

Journal of Herbal Medicine 45 (2024) 100882

Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Herbal Medicine

journal homepage: www.elsevier.com/locate/hermed

Research Paper

Capsaicin Ameliorates Chemotherapy Response via Cancer Hallmarks Modulation: An Overview of its Synergic Potential

R.F. Costa^a, F.C. Cadoná^{b,*}

^a International Research Center, A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil
^b Post-graduate Program in Health and Life Sciences, Franciscan University, Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Capsaicin
 Anticancer activity
 Cancer signalling pathways
 Chemotherapy improvement
 Natural product

ABSTRACT

Introduction: Cancer is a disease caused by genetic changes and disordered cell growth with high incidences over the years. Conventional treatments such as chemotherapy act on cells that are in constant cell division; however, frequently, they are not selective to cancer cells and can damage healthy cells. For this reason, side effects such as nausea, dizziness, hair loss, weight loss, and fatigue are reported by patients. Moreover, some cancers present resistance to chemotherapy treatment. Therefore, studies focusing on functional and natural products, especially those rich in bioactive compounds, such as capsaicin, could be used as chemotherapy adjuvant to improve treatment response and decrease side effects.

Methods: In this scenario, we conducted a review of 75 articles regarding the anticancer activity and chemotherapy response improvement of capsaicin via cancer hallmark modulation.

Results: In this scenario, we reviewed the anticancer activity and chemotherapy response improvement of capsaicin via cancer hallmark modulation. This natural bioactive molecule ameliorates the chemotherapy response by several cancer pathway regulations.

Conclusions: This review was able to show that capsaicin has a remarkable effect as an adjuvant to improve chemotherapy and reduce side effects.

Introduction

Cancer is a disease with a high impact, ranking second among the main causes of death according to the World Health Organisation (Howlader et al., 2012). According to the National Cancer Institute (2018), 640,000 new cases of cancer are estimated each year in the 2018–2019 biennium (Instituto Nacional do Câncer, 2018). The most common cancers are prostate, lung, female breast and colon, and rectal cancers. However, cancers of the cervix, stomach, and oesophagus still have high incidence rates.

Cancer represents a significant concern for global public health, presenting itself as a substantial challenge on an international scale. The advent of technology and the increasing consumption of industrialised products, associated with a sedentary lifestyle and a diet low in antioxidants, are associated with the increase in the incidence of neoplasms (Stek and Murphy, 2020). The success of traditional and targeted therapies has created optimism for the treatment of cancers. However, metastatic patients have a worse therapeutic response, and drug resistance is quite common with many side effects such as nausea and fatigue, among others (Phan and Croucher, 2020; Zeeshan and Mutahir, 2017).

In this scenario, studies focus on functional and natural products, especially those rich in bioactive compounds, which could be used as chemotherapy adjuvant to improve treatment response and decrease side effects. Bioactive molecules can decrease cell growth by inhibiting growth factors and activating apoptosis, such as capsaicin. Studies with these molecules have been carried out to mitigate the side effects of chemotherapy, as well as increase the drug response since cancer cells are resistant to treatments (Stek and Murphy, 2020).

Capsaicin, presenting in chilli pepper extract, has been associated with chemopreventive and chemotherapeutic activities against various types of cancers, such as prostate and lung cancers, through the modulation of numerous genes involved in cancer cell survival, cell growth, angiogenesis, and metastases, and inducing apoptosis through activation of proapoptotic molecules, such as p53 and caspases (Chapa-Oliver and Mejia-Teniente, 2016).

* Corresponding author: 1614 Andradas Street, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97010-032, Brazil.
 E-mail address: francinecadona@gmail.com (F.C. Cadoná).

<https://doi.org/10.1016/j.hermed.2024.100882>
 Received 8 November 2023; Received in revised form 26 March 2024; Accepted 14 April 2024
 Available online 20 April 2024
 2210-8033/© 2024 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Anexo E – Documento da aprovação do doutorado sanduíche pelo edital CAPES/PDSE 2024.



Ministério da Educação - MEC
Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES
Setor Bancário Norte, Quadra 2, Bloco L, Lote 06
CEP 70.040-031 - Brasília, DF

Prezado(a) Sr(a),
RAISA FERREIRA COSTA
Rua Tamandaré - 272 - APTO 22 Bloco G
Liberdade
São Paulo - São Paulo
Brasil
01.525-001

Brasília, 03/07/2024

Processo: PDSE - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior -88881.981893/2024-01

A QUEM POSSA INTERESSAR

Certificamos que o Sr./Sra. RAISA FERREIRA COSTA obteve uma bolsa de estudos da Capes, fundação subordinada ao Ministério da Educação do Brasil, para realizar **DOCTORADO SANDUÍCHE** na **UNIVERSITÉ LIBRE DE BRUXELLES**.

A bolsa de estudos consiste em:

Rubrica	Valor Unitário	Parcelas (Até)	Valor Total
Adicional localidade	€ 400,00	3	€ 1.200,00
Auxílio deslocamento - Parcela única	€ 950,00	1	€ 950,00
Auxílio instalação	€ 1.300,00	1	€ 1.300,00
Auxílio Seguro Saúde	€ 90,00	3	€ 270,00
Mensalidade	€ 1.300,00	3	€ 3.900,00

Trecho aprovado: **Brasil / Bélgica /Brasil**

A bolsa é concedida para o período **10/2024 a 12/2024**

Atenciosamente,

Coordenador(a) Geral de Programas Institucionais e Bolsas Internacionais
Esta assinatura independe de reconhecimento de firma, por se tratar de documento público
- Art. 19, Inciso II - Constituição Federal do Brasil.

A fim de validar a autenticação deste documento, por favor acesse <http://validadocumentos.capes.gov.br/> e informe o seguinte código: **2zJBvLyNvL0J-**

Anexo F – Documento com a parceria na Universidade Libre de Bruxelles
com a Dra. Christine Delporte, no projeto de organoides de carcinoma adenoide cístico.



Subject: laboratory internship of Dr. Raiza Ferreira Costa,

Brussels, June 27th, 2024

To whom it may concern

As the head of the in our Laboratory of Biochemical and Nutritional Biochemistry, I hereby certify that Ms Raiza Ferreira Costa from the FUNDAÇÃO ANTONIO PRUDENTE A.C. CAMARGO CANCER CENTER of Sao Paulo in Brazil will perform an internship in our laboratory at the Faculty of Medicine from the Université Libre de Bruxelles, Brussels, Belgium.

Ms Raiza Ferreira Costa will benefit from a PDSE - Sandwich Doctoral Program Abroad - 88881.981893/2024-01 scholarship fellowship awarded from the CAPES, foundation subordinate to the Ministry of Education in Brazil. Ms Raiza Ferreira Costa will perform her research project entitled "Establishment and characterization of organoids derived from salivary gland adenoid cystic carcinoma tumors". The 80 days fellowship is planned to start on October 01st, 2024.

Do not hesitate to let me know if you require any further information.

Yours sincerely,

Professor Christine Delporte

Anexo G – Documento de declaração de estágio prático e observacional no Laboratório de Histologia, Macroscopia, Citologia e Imunoquímicas do A.C.Camargo Cancer Center.



DECLARAÇÃO

Declaramos que a aluna **Raísa Ferreira Costa**, CPF: 112.726.774-43, está regularmente matriculada sob o n° FAP 1501 no Curso de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Fundação Antônio Prudente- Área de Oncologia.

Data de ingresso: 12/04/2021

Nível: Doutorado

Data prevista para término: 11/04/2025

Orientador(a): Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Coorientador(a): Dr. Tiago Goss dos Santos

Título do projeto: Estabelecimento e caracterização de linhagens celulares e xenoinxertos derivados de tumores de glândula salivar.

Declaramos também, que a aluna realizou um estágio prático e observacional no Laboratório de Histologia, relacionado abaixo. Esse estágio contribuiu para a sua formação fornecendo conhecimentos necessários para o desenvolvimento do seu projeto de pesquisa.

Período: Novembro/2022 a Abril/2023

- Estágio prático em Microtomia (200 horas): Cortes de material histológico em parafina e material congelado e coloração HE;
- Estágio Prático em Macroscopia (150 horas): Análise de tecidos para inclusão em parafina e avaliação microscópica. Essa análise compreende a seleção e corte de áreas representativas de acordo com o protocolo estabelecido;
- Estágio Observacional (40 horas): Acompanhamento de atividades e aprendizado das técnicas desenvolvidas nas áreas de Citologia (20 horas) e Imunohistoquímica (20 horas).

São Paulo, 20 de junho de 2023.

Luciana Costa Pitombeira Castetano
Supervisora Administrativa de Ensino

PPG-140/2023

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br

Anexo H – Documentos de declaração de Monitorias de disciplinas.

Oncogenética, Bioética e Métodos e Estratégias em Biologia Molecular e suas Aplicações na Pesquisa do Câncer.

Relatório de conclusão da Monitoria para alunos da Pós-Graduação - Doutorado		 A.C. Camargo Cancer Center Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa	
Nome do aluno: Raísa Ferreira Costa			
Email: raisa.costa@accamargo.org.br		Telefone: 1,2E+10	
Nome do orientador: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo			
MONITORIA EM DISCIPLINA			
Disciplina:	Bioética		
Período:	06/11/23 - 08/11/23		
1) Créditos:	4		
Coordenador da Disciplina:	Gláucia Hajji; Tiago Góss dos Santos e Samuel Aguiar Jr.		
Comentários do docente da disciplina:			
aluna dedicada e organizada, colaborou com andamento da disciplina.			

Relatório de conclusão da Monitoria para alunos da Pós-Graduação - Doutorado		 A.C. Camargo Cancer Center Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa	
Nome do aluno: Raísa Ferreira Costa			
Email: raisa.costa@accamargo.org.br		Telefone: 1,2E+10	
Nome do orientador: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo			
MONITORIA EM DISCIPLINA			
Disciplina:	Oncogenética		
Período:	16/10/23 - 20/10/23		
1) Créditos:	2		
Coordenador da Disciplina:	Maria Nirvana Formiga e Giovana Tardin Torrezan		
Comentários do docente da disciplina:			
Como coordenadora da disciplina de Oncogenética, atesto que a aluna Raísa atuou como monitora na disciplina, acompanhando as aulas, as discussões dos alunos e realizando a correção das atividades da disciplina no Moodle.			
Assinatura docente:			
<i>Giovana T. Torrezan</i>			

Relatório de conclusão de Monitoria para alunos da Pós-Graduação - Doutorado		 A.C. Camargo Cancer Center Centro Integrado de Diagnóstico, Tratamento, Ensino e Pesquisa	
Nome do aluno: Raísa Ferreira Costa			
Email: raisa.costa@accamargo.org.br		Telefone: 1,2E+10	
Nome do orientador: Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo			
MONITORIA EM DISCIPLINA			
Disciplina:	Métodos e estratégias em Biologia Molecular e suas aplicações na pesquisa do Câncer		
Período:	10/06/24 à 05/07/24		
1) Créditos:	2		
Coordenador da Disciplina:	Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo		
Comentários do docente da disciplina:			
A aluna Raísa Ferreira Costa atuou de forma consistente durante o período da disciplina executando atividades como: auxílio aos alunos na realização das atividades, acompanhamento da entrega dos trabalhos, esclarecimento de dúvidas, controle da presença.			
Assinatura docente:			
<i>Cláudia M. C. Camillo</i>			

Anexo I – Documento de declaração de Monitoria de Aluno da Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo.

MONITORIA EM INICIAÇÃO CIENTÍFICA		
1	Nome completo do aluno IC que recebeu a monitoria:	Adriane Krupp
	Período:	01/01/2024 à 30/08/2024
	Nome do orientador IC responsável:	Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo
Comentário do orientador de IC:		
elaboração do projeto e organização do banco de dados através da coleta de informações clínicas e patológicas. Coordenou as atividades		
Assinatura orientador:		
2	Nome completo do aluno IC que recebeu a monitoria:	
	Período:	
	Nome do Orientador IC responsável:	
Comentário do orientador de IC:		
Assinatura docente:		
Assinatura aluno		Assinatura orientador
		<i>Cláudia M. C. Camillo</i>
Para uso da Secretaria		
Lançado no sistema		Arquivado no prontuário do aluno
/ /		/ /
Responsável:		Responsável:
M:\SEI\Estágio Docente\Formulários e Orientações\relatorio conclusão		

