

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

CAROLINNE ALVES DE OLIVEIRA

**PERFIL MUTACIONAL DE NEOPLASIAS DO DUCTO INTERCALAR DA
GLÂNDULA SALIVAR**

Tese de Doutorado, apresentada à Fundação Antônio Prudente como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde. Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

São Paulo

2025

FICHA CATALOGRÁFICA

Alves de Oliveira, Carolinne.

Perfil mutacional de neoplasias do ducto intercalar da glândula salivar. / Carolinne Alves de Oliveira. São Paulo, 2025.

83f.

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

Orientador: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo.

1. Neoplasias das Glândulas Salivares, 2. Sequenciamento de Nova Geração, 3. Mutação

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: Carolinne Alves de Oliveira

Título: Perfil mutacional de neoplasias do ducto intercalar da glândula salivar

Aprovado em: 15/12/2025

Banca examinadora

Orientador: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Instituição: Hospital A.C.Camargo Cancer Center

Membro da banca: Cristiane Helena Squarize

Instituição: Universidade de Michigan

Membro da banca: Leandro Luongo de Matos

Instituição: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Membro da banca: Giovana Tardin Torrezan

Instituição: Hospital A.C.Camargo Cancer Center

Membro da banca: Clóvis Antônio Lopes Pinto

Instituição: Hospital A.C.Camargo Cancer Center

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, através de auxílio à Pesquisa - [14/50943-1]. Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq) - [465682/2014-6]. Bolsa da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - [001] e Programa de Doutorado Sanduiche no Exterior (PDSE-CAPES) [88881.934471/2024-01].

DEDICATÓRIA

Esta Tese é dedicada à minha família e a todos que caminharam comigo nessa jornada. Por cada gesto de apoio que me ajudou a transformar um sonho em ciência.

AGRADECIMENTOS

Penso que, atualmente, falar em gratidão pode parecer clichê ou até mesmo repetitivo, mas não conseguiria resumir esses anos em outras palavras.

Acredito que este trabalho, só pôde ser construído de modo integral por minha parte porque tive pessoas que acreditaram, ajudaram, deram suporte, incentivaram e colaboraram em algum grau. Além das questões entorno da pesquisa, dentro desses quatro anos, tive oportunidades das quais eram objetivos (e ainda assim me exigiram coragem) e foram alcançados, como o período sanduiche e ida a congressos internacionais. Mas também, fui surpreendida positivamente e vivi coisas não imaginadas ou planejadas pela coragem de dizer “sim” ao longo desses anos, e ter sido representante discente, foi um desses momentos.

Realizar esse Doutorado foi a concretização de um sonho. Tenho orgulho do que pudemos construir durante este caminho, e por isso, meu coração sabe apenas agradecer, pela oportunidade de gerar algo que contribua para a comunidade científica, e quem sabe, no futuro, na vida de muitos pacientes.

Por isso, e tantas outras coisas, preciso agradecer especialmente a algumas pessoas chave que fizeram parte desses quatro anos de trabalho, dedicação e pesquisa e me ensinaram em alguma medida coisas que levarei comigo.

Agradeço à Deus por me inspirar paz em meio aos dias difíceis, alegria para comemorar os bons e a benevolência para os dias comuns.

Aos meus pais, Elaine A. Oliveira e Rogério R. Oliveira, que são as pessoas que me fizeram conhecer na prática o que significa cuidado e amor incondicionais. Que me incentivam e dão a oportunidade de seguir meus sonhos. Que me oferecem todo carinho e escuta, e são os melhores apoiadores como ninguém mais poderia ser. Amo vocês infinitamente, obrigada por tanto.

Aos meus irmãos, Rhayssa A. de Oliveira e Ryan A. de Oliveira, que são meus melhores amigos e as pessoas que sei que também posso contar incondicionalmente.

À Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, minha orientadora, que foi a idealizadora desse projeto tão bonito e cheio de propósito. Sou muito feliz e grata por tê-la como “chefe” e poder aprender de perto com alguém tão generosa, respeitosa e dedicada.

Ao Dr. Clóvis A. Lopes, por todo auxílio na parte patológica e para seleção dos casos. Passar alguns momentos com o senhor avaliando lâmina me ensinou muito. Agradeço por todo tempo que dedicou em nos ajudar com esse projeto.

À Dra. Dirce M. Carraro pelos direcionamentos de algumas estratégias com sua expertise e olhar para o melhor aproveitamento das amostras que tínhamos.

Ao Dr. Rafael C. Brianese, que foi a pessoa que me ensinou diretamente e pacientemente sobre genômica, seus termos, significados e aplicações. Obrigada pelo apoio e explicações.

À Katia Klug, no início foi minha parceira de bancada e me ensinou muito do que sei hoje. Obrigada pela sua generosidade de compartilhar seus conhecimentos comigo.

À Ana Miguez, Nathalia de Angelis e Thalita Ferraz que foram as técnicas que me ajudaram diretamente no sequenciamento das amostras.

À Professora Karen B. Muller, uma das minhas professoras da graduação, e que foi a pessoa que me disse “pode não ser um início fácil, mas coragem, vá atrás do seu mestrado”. Obrigada por ver além do que eu conseguia na época e me incentivar a ingressar na vida acadêmica.

Aos meus avós, Josefa Alves, Elias da Silva, Ednalva Rocha e Eugênio Moreira (*in memoriam*) que são a representação de acolhimento e amor.

Aos meus familiares, tios e primos, por se empolgarem com essa conquista e vibrarem cada etapa comigo e minha família, mesmo sendo uma novidade para todos. Vocês são incríveis.

Aos meus amigos das mais diversas áreas da vida e que tive o prazer de ser apresentada e conhecer, muito obrigada por serem pessoas incríveis em meus dias.

Às minhas colegas e amigas do grupo de pesquisa que já passaram por aqui (Milena Antunes, Ágatha Nagli, Adriane, Leandra Kerche e Maria Eduarda Trevizani) e aos que eu convivo diariamente e compartilho meus dias (Aline Queiroz, Ana Luiza Bet, Ana Luiza Fakeiti, Paula Renata, Stephanie Mancini e Pedro Nunes). Ter vocês, é um presente, obrigada pelas conversas e risadas.

Àgatha Nagli pela ajuda com as figuras para ilustrar a tese e minhas ideias.

Aos professores Dra. Cristiane Squarize e Dr. Rogério Castilho, pelo acolhimento durante meu período na Universidade de Michigan. Obrigada pelos ensinamentos e momentos compartilhados.

Aos meus amigos e colegas de Michigan (especialmente, Brendo, Thiago, Rafael, Guilherme e Felipe Cutrim), que alegria e sorte a minha ter encontrado vocês por lá e ser apresentada a pessoas maravilhosas desse Brasil. Obrigada pelas conversas, risadas e passeios divertidos.

À secretaria de ensino, especialmente à Luciana Pitombeira, Adriana Ferreira, Mayara Antunes, Leticia Duarte e Brenda Andrade, Suellen do Marketing e Jamiel do Alumni, pelo apoio, respaldo, auxílio e confiança.

Ao Dr. Rubens Chojniak, Dr. José Humberto Fregnani e Dra. Mariana Brait, pelo incentivo e espaço e escuta nesses quatro anos em que atuei como representante discente.

À Mariana Bitu, com quem eu tive a alegria de compartilhar as responsabilidades, conquistas, desafios e aprendizados da representação discente nesses anos. Fico contente com tudo que conseguimos construir com o trabalho em equipe e por conquistar o objetivo de pertencimento em ações diárias para nós, alunos.

Aos membros da Comissão de Pós-Graduação pela atenção e disponibilidade.

Ao Severino, Keila, Fernanda e demais colaboradores do LabHisto pelo auxílio direto com os materiais parafinados que usaríamos.

À Ana Paula Mitsue e demais colaboradoras do BioBanco, obrigada pelo auxílio com protocolos que geraram bom aproveitamento das amostras.

Aos bibliotecários Igor Tabert e Claudia Anunciato pelo auxílio na formatação desta tese.

Às demais facilities pelo auxílio técnico e estatístico, em especial à Gabriela Agnol que me ajudou diretamente com as análises.

Aos funcionários da biblioteca pela ajuda os ajustes de formatação.

Funcionários em geral do CIPE e Matriz (Antônio Prudente), por serem atenciosos e gentis.

Aos pacientes, cujos dados, anonimizados, foram essenciais para a realização deste estudo.

À CAPES pela bolsa de Doutorado e a bolsa de doutorado sanduiche no exterior (PDSE).

Ao CNPq e FAPESP pelo apoio financeiro através do projeto INCT.

Aos membros da banca pelo seu tempo em participar desse dia e por todos os elogios, comentários e sugestões que foram incorporados para melhoramento da tese e artigo final.

EPÍGRAFE

“Todas as pessoas podem ser grandes, porque todas podem servir [...]. Basta um coração cheio de graça e uma alma gerada pelo amor.”

Marthin Luther King

RESUMO

OLIVEIRA, CA. **Perfil mutacional de neoplasias do ducto intercalar da glândula salivar.** [Tese]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Introdução: Os tumores de glândulas salivares formam um grupo heterogêneo de lesões raras, representam até 6% dos tumores de cabeça e pescoço e demonstram ampla diversidade morfológica, principalmente entre as neoplasias com participação do componente mioepitelial. No ambiente do ducto intercalar da glândula, composto por células epiteliais e mioepiteliais, se originam neoplasias de caráter único e padrões histológicos distintos. Essa diversidade é frequentemente atribuída ao potencial de diferenciação das células mioepiteliais. Nas neoplasias derivadas dessa região, que compõem o grupo de interesse deste estudo, essas células apresentam participação parcial ou completa, nas seguintes neoplasias benignas, adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais, e nas neoplasias malignas: carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais. Essas neoplasias apresentam entre si, diversas similaridades de características histológicas, e por esse motivo, mesmo que atualmente sejam classificadas como tumores distintos, há na literatura uma dúvida quanto a heterogeneidade citológica desses tumores, se de fato trata-se de entidades diferentes ou poderiam ser espectros de um mesmo tumor. **Objetivos:** A heterogeneidade morfológica desses tumores impacta e gera desafios diagnósticos e de classificação. Assim, compreender suas bases moleculares, por meio de um painel de mutações, pode contribuir para o refinamento da diferenciação entre essas lesões. **Metodologia:** A partir de um banco de dados prévio do grupo, o DNA de 31 amostras parafinadas dos 6 subtipos tumorais foi selecionado para extração. Após aplicação de critérios como, quantidade mínima de massa, porcentagem de células tumorais, e avaliação da qualidade do DNA, obtivemos 15 amostras aptas para realização de análise exploratória de sequenciamento utilizando um painel que abrange 409 genes associados a câncer, e dessas, 13 amostras tiveram resultados satisfatórios de métricas de qualidade pós sequenciamento. Após avaliação desses índices e a identificação em bancos de dados, ferramentas de predição e bioinformáticas e estudo na literatura, variantes genéticas de interesse passaram pela análise de validação por sequenciamento direcionado por *amplicon*. Adicionalmente, avaliou-se o gene *CTNNB1*, com foco no éxon 3, região de *hotspot*, permitindo comparação com achados prévios obtidos por imunohistoquímica em estudos prévios do grupo e da literatura relacionados a adenoma de células basais e presente em nossa casuística. **Resultados e Discussão:** Inicialmente, foram observadas 94 variantes em 73 genes na análise por painel. Posterior as avaliações mencionadas, 33 variantes foram pré-selecionadas e dessas, variantes nos genes *NOTCH1*, *NOTCH2*, *KMT2D* e *DNMT3A* seguiram para a etapa de validação, considerando o potencial de oncogenicidade, frequência alélica e dados de literatura, possibilitando investigar associações com subtipos tumorais, vias de sinalização e potenciais interações relevantes. Dessas, apenas as variantes em *NOTCH1* puderam ser validadas. Além disso, 20 casos adicionais foram analisados por sequenciamento por *amplicon*, permitindo confirmar, em parte das amostras, a presença das mesmas variantes em *NOTCH1* previamente validadas. Do ponto de vista estatístico, a presença de mutações em *NOTCH1* mostrou-se significativamente associada a pior prognóstico e a desfechos clínicos desfavoráveis. A análise das alterações em *CTNNB1* revelou possíveis variantes relacionadas com subtipos tumorais, onde, identificamos a mesma mutação em adenoma de células basais previamente relatada na

literatura, bem como novas, como a p.Gly34Glu em adenoma pleomórfico e classificado como potencialmente oncogênico. **Conclusão:** As neoplasias avaliadas não puderam ser diferenciadas por um perfil mutacional específico. Entretanto, alterações presentes em *NOTCH1* demonstraram possível associação com pior desfecho clínico. Por fim, os resultados sugerem que essas neoplasias possam representar espectros histológicos diferentes de uma mesma neoplasia.

Palavras-chave: Neoplasias das Glândulas Salivares. Mutação. Sequenciamento de Nova Geração.

ABSTRACT

OLIVEIRA, CA. **Mutational Profile in Salivary Gland Intercalated Duct Neoplasms.** [Tese]. São Paulo: Fundação Antônio Prudente; 2025.

Introduction: Salivary gland tumors constitute a heterogeneous group of rare lesions, accounting for up to 6% of head and neck tumors, and exhibit broad morphological diversity, particularly among neoplasms with myoepithelial component involvement. Within the intercalated duct environment of the salivary gland, composed of epithelial and myoepithelial cells, neoplasms with unique biological behavior and distinct histological patterns arise. This diversity is frequently attributed to the differentiation potential of myoepithelial cells. In neoplasms derived from this region, which comprise the group of interest of the present study, these cells show partial or complete participation in the following benign neoplasms: pleomorphic adenoma, myoepithelioma, and basal cell adenoma, and in the malignant neoplasms: carcinoma ex pleomorphic adenoma, myoepithelial carcinoma, and basal cell adenocarcinoma. These neoplasms share several histological similarities, and for this reason, despite currently being classified as distinct tumors, there is uncertainty in the literature regarding their cytological heterogeneity, questioning whether they truly represent different entities or rather distinct spectra of the same tumor. **Objectives:** The morphological heterogeneity of these tumors impacts and creates diagnostic and classification challenges. Thus, understanding their molecular bases through a mutation panel analysis may contribute to refining the differentiation among these lesions. **Methodology:** From a previously established database of the research group, DNA from 31 formalin-fixed paraffin-embedded samples representing the six tumor subtypes was selected for extraction. After applying criteria such as minimum tissue mass, tumor cell percentage, and DNA quality assessment, 15 samples were deemed suitable for exploratory sequencing analysis using a panel covering 409 cancer-associated genes, of which 13 samples achieved satisfactory post-sequencing quality metrics. Following the evaluation of these indices and variant identification using databases, prediction tools, bioinformatic analyses, and literature review, genetic variants of interest underwent validation analysis by targeted amplicon sequencing. Additionally, the *CTNNB1* gene was evaluated, with a focus on exon 3, a hotspot region, allowing comparison with previous findings obtained by immunohistochemistry in prior studies conducted by the group and in the literature, particularly those related to basal cell adenoma and present in our cohort. **Results and Discussion:** Initially, 94 variants across 73 genes were identified through panel analysis. After the evaluations, 33 variants were preselected, of which variants in *NOTCH1*, *NOTCH2*, *KMT2D*, and *DNMT3A* proceeded to the validation stage, considering oncogenic potential, allelic frequency, and data from the literature, enabling the investigation of associations with tumor subtypes, signaling pathways, and potentially relevant interactions. Among these, only *NOTCH1* variants were successfully validated. In addition, 20 additional cases were analyzed by amplicon sequencing, allowing partial confirmation of the presence of the same previously validated *NOTCH1* variants. From a statistical standpoint, the presence of *NOTCH1* mutations was significantly associated with poorer prognosis and unfavorable clinical outcomes. Analysis of *CTNNB1* alterations revealed possible variants related to tumor subtypes, including the identification of the same mutation in basal cell adenoma previously

reported in the literature, as well as novel variants, such as p.Gly34Glu in pleomorphic adenoma, classified as potentially oncogenic. **Conclusion:** The evaluated neoplasms could not be differentiated by a specific mutational profile. However, alterations in *NOTCH1* demonstrated a possible association with poorer clinical outcomes. Finally, the results suggest that these neoplasms may represent different histological spectra of the same neoplastic entity.

Keywords: Salivary Gland Neoplasms. Mutation. Next-Generation Sequencing

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Representação estrutural da glândula salivar, indicando os ductos, ácinos e porção parenquimatosa.	18
Figura 2 - Representação da distribuição de células mioepiteliais na estrutura da glândula salivar e das neoplasias benignas e malignas derivadas do ducto intercalar.	20
Figura 3 - Aspectos histológicos de neoplasias malignas do ducto intercalar da glândula salivar.	25
Figura 4 - Aspectos histológicos de neoplasias benignas do ducto intercalar da glândula salivar.	26
Figura 5 - Descrição das etapas metodológicas do projeto. O fluxo de trabalho conta com as etapas de seleção das amostras, extração de DNA e avaliação dos critérios de qualidade, sequenciamento e análise usando bancos de dados e ferramentas de bioinformática.	33
Figura 6 - Lista contendo os 409 genes presentes no <i>Comprehensive Cancer Panel</i> (CCP).	35
Figura 7 - Dados da verificação da concentração e pureza, quantificação e integridade do DNA extraído de amostras de tumores de glândula salivar e abordagens metodológicas realizadas.	39
Figura 8 - Informações gerais de qualidade do sequenciamento das amostras de tumores de glândula salivar que foram sequenciados utilizando o painel CCP.	41
Figura 9 – Fluxograma do total de casos disponíveis/utilizados em cada etapa realizada.	45
Figura 10 - Perfil mutacional das amostras de tumores de glândula sequenciadas pelo painel CCP.	50

Figura 11 - Rede de interação proteica gerada pelo STRING evidenciando conexões funcionais entre seus principais parceiros moleculares considerando os genes inicialmente identificados nas amostras de tumores de glândula salivar analisadas por sequenciamento guiado por painel. Em vermelho, destacando a interação entre *NOTCH1*, *NOTCH2*, *KMT2D* e *DNMT3A*.51

Figura 12 - Análise de enriquecimento funcional demonstrando as principais vias biológicas associadas ao conjunto de 79 genes identificados com alterações nas amostras de tumores de glândula salivar que realizaram análise de sequenciamento guiado por painel.52

Figura 13 - Exemplo de inspeção visual de alterações observadas nas amostras de tumor de glândula salivar estudadas via análise de *amplicon*. Sendo possível observar um arquivo BAM gerado após sequenciamento sendo analisado no Software IGV a fim de realizar a inspeção visual de maneira manual para validar potenciais mutações encontradas.56

Figura 14 - Distribuição das variantes validadas ou identificadas ao longo das estruturas dos genes *NOTCH1*, *DNMT3A* e *KMT2D*, destacando a localização específica de cada alteração em seu respectivo domínio funcional, éxon correspondente e região da estrutura proteica a que pertence.58

Figura 15 - *Heatmap* representando o perfil de alterações nos genes *NOTCH1*, *KMT2D* e *DNMT3A* em amostras de tumores benignos e malignos de glândulas salivares que passaram pela análise de *amplicon* e tiveram alguma variante identificada nos genes mencionados.59

Figura 16 - Rede de interação proteica gerada pelo STRING evidenciando conexões funcionais entre *NOTCH1*, *KMT2D*, *DNMT3A* e *CTNNB1*.63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores benignos e malignos de glândula salivar: adenoma plemórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais utilizados nas diferentes etapas desse projeto.	46
Tabela 2 - Perfil das 33 variantes genéticas identificadas por sequenciamento em tumores de glândula salivar consideradas potencialmente somáticas.	53
Tabela 3 - Informações gerais das variantes consideradas para validação por <i>amplicon</i> e seus resultados no painel e na região alvo.	55
Tabela 4 - Informações sobre as alterações moleculares identificadas nas regiões de pesquisa por <i>amplicon</i> em amostras de tumor de glândula salivar.	60
Tabela 5 - Informações gerais das variantes observadas no gene <i>CTNNB1</i>	62

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	GLÂNDULAS SALIVARES	17
1.2	CÉLULAS MIOEPITELIAIS.....	18
1.3	TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR.....	19
1.3.1	<i>Adenoma pleomórfico.....</i>	<i>21</i>
1.3.2	<i>Carcinoma ex-adenoma pleomórfico.....</i>	<i>21</i>
1.3.3	<i>Mioepitelioma.....</i>	<i>22</i>
1.3.4	<i>Carcinoma mioepitelial.....</i>	<i>22</i>
1.3.5	<i>Adenoma de células basais.....</i>	<i>23</i>
1.3.6	<i>Adenocarcinoma de células basais.....</i>	<i>24</i>
1.4	IDENTIFICAÇÃO DE ALTERAÇÕES GENÉTICAS EM TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR.....	27
2	JUSTIFICATIVA.....	30
3	OBJETIVOS	31
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
4	METODOLOGIA	32
4.1	CASUÍSTICA.....	32
4.2	SEQUENCIAMENTO DE NOVA-GERAÇÃO.....	33
4.2.1	<i>Extração de DNA e qualificação das amostras</i>	<i>33</i>
4.2.2	<i>Painel de genes associados ao câncer</i>	<i>34</i>
4.2.3	<i>Sequenciamento de Nova Geração (NGS), critérios e ferramentas de análise.....</i>	<i>37</i>
4.2.4	<i>Validação das variantes candidatas</i>	<i>42</i>
4.2.5	<i>Avaliação da região de hotspot de CTNNB1.....</i>	<i>42</i>
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5	RESULTADOS.....	44
5.1	CASUÍSTICA.....	44
5.2	AVALIAÇÃO DOS RESULTADOS DO PAINEL CCP.....	48
5.3	VALIDAÇÃO DAS VARIANTES SELECIONADAS.....	55
5.4	IDENTIFICAÇÃO DAS VARIANTES EM OUTROS CASOS	56
5.5	AVALIAÇÃO DO GENE <i>CTNNB1</i>	61
5.6	DADOS DA ANÁLISE ESTATÍSTICA	63
6	DISCUSSÃO.....	64
7	CONCLUSÕES.....	73
	REFERÊNCIAS	74
	APÊNDICE A - COMENTÁRIO SOBRE O PERÍODO SANDUÍCHE	81
	ANEXO A – CARTA DE ACEITE DE EMENDA DO PROJETO NO CEP	82

1 INTRODUÇÃO

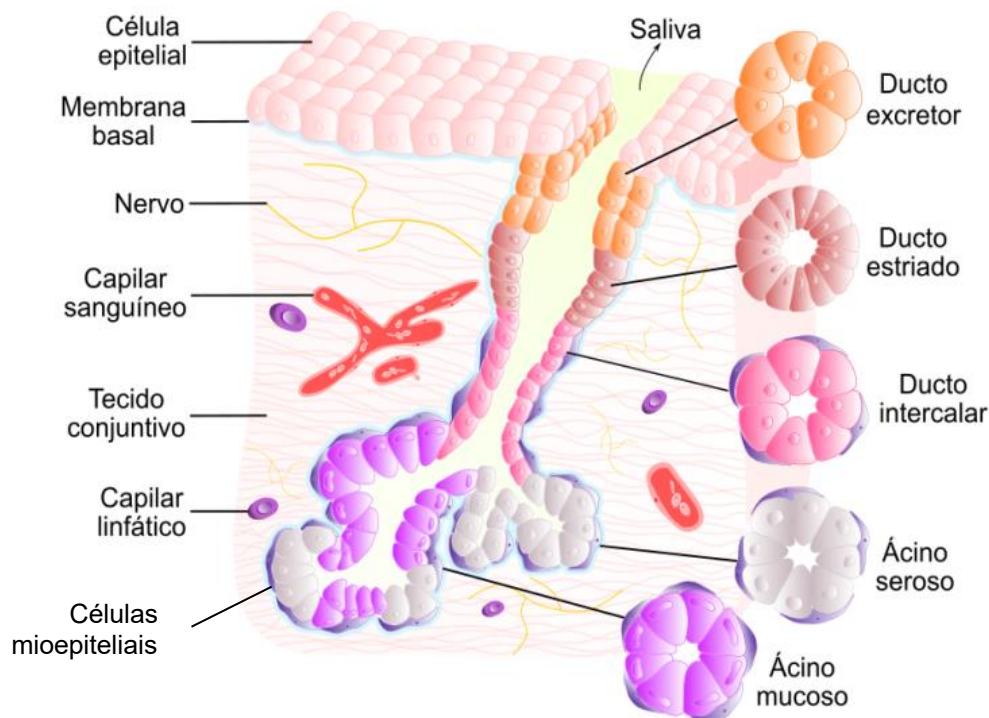
1.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares são estruturas exócrinas distribuídas pela região de cabeça e pescoço e apresentam-se anatomicamente em três pares de glândulas maiores, sendo, parótidas, submandibulares e sublinguais. E inúmeras glândulas menores localizadas na cavidade oral, laringe e faringe. A glândula é composta pela porção parenquimatosa, onde estão localizadas as unidades secretoras e ductais, e pelo estroma glandular, formado pelo tecido conjuntivo que envolve vasos linfáticos, nervos e vasos sanguíneos (Jaeger e Freitas 2016; Junqueira e Carneiro 2018).

Do ponto de vista histológico, são constituídas principalmente por três tipos celulares: acinares, ductais e mioepiteliais. Estruturalmente, os ácinos (ou unidades secretoras), são constituídas por células serosas, mucosas ou mistas, sendo responsáveis pela produção da saliva. A porção ductal, é subdividida em ducto intercalar, estriado e excretor e responsável pela condução e modificação do fluido salivar. As células mioepiteliais, que auxiliam na expulsão da saliva, mediante sua contração, estão presentes dos ácinos ao ducto intercalar (Figura 1) (Milletich 2010; Jaeger e Freitas 2016; de Paula et al. 2017; Junqueira e Carneiro 2018).

Essa organização está relacionada a função essencial das glândulas, a secreção de saliva, que é um fluido complexo e exerce diferentes ações fundamentais, tais como, atuar como efeito protetor em dentes e mucosa, garantir a umidade da cavidade oral, secreção de proteínas digestivas, formação do bolo alimentar, manutenção do pH, ação bactericida para o ambiente bucal e manutenção da homeostase oral (Ghannam e Singh 2019; Athwal e Lombaert 2020).

Figura 1 - Representação estrutural da glândula salivar, indicando os ductos, ácinos e porção parenquimatosa.



Fonte: Oliveira, CA 2021, p.1 [Dissertação].

Legenda: Representação esquemática da organização histológica da glândula salivar, evidenciando os ácinos serosos e mucosos, o sistema ductal (ductos intercalares, estriados e excretores) e os principais componentes do estroma, incluindo tecido conjuntivo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos e inervação.

1.2 Células mioepiteliais

A identificação das células mioepiteliais na glândula salivar foi observada pela primeira vez em 1966 por Tamarin, estando localizadas entre as células epiteliais e a membrana basal e unidas à unidade secretora terminal (ácinos) e ao ducto intercalares através de desmossomos. Acredita-se que essas células provêm de células pluripotentes, mas atualmente as informações de literatura sobre essa questão são limitadas, por isso, o que se sabe é que elas exercem uma ação essencial na morfogênese das glândulas nas diversas etapas do desenvolvimento e na diferenciação de células epiteliais através da secreção de citocinas e fatores de crescimento (Ianez et al. 2010; Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016).

Além disso, suas funções desempenham um importante papel nas características fenotípicas e fisiológicas da glândula, tais como: organização estrutural da unidade secretora terminal, formação e manutenção da membrana basal, a produção de proteínas atuantes como supressores tumorais (inibidores de proteinase e fatores anti-angiogênese), manutenção da

polaridade, função sensorial, transporte de metabólicos, capacidade de contração e a interação com o microambiente local (Nanci 2013; Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016; Alali e Kochaji 2018; Ghannam e Singh 2019).

Tais características e funções exercidas por essas células estão diretamente relacionadas ao seu alto potencial de diferenciação. Em diferentes contextos, sua capacidade de produzir componentes da matriz extracelular contribui significativamente para a variedade morfológica observada nas neoplasias de glândulas salivares. Além disso, as células mioepiteliais participam da diferenciação das células epiteliais, da síntese da membrana basal e da secreção de maspina, uma proteína com função supressora tumoral (Katabi et al. 2010; Shah et al. 2016).

No contexto neoplásico, destaca-se ainda a marcante plasticidade fenotípica das células mioepiteliais, que podem assumir formas distintas no microambiente tumoral, como configurações estreladas, fusiformes, plasmocitoides ou claras. Essa versatilidade impacta diretamente o comportamento tumoral e contribui para a pluralidade celular observada em um mesmo tipo de neoplasia. Diante disso, compreende-se que essas características podem influenciar de maneira significativa a arquitetura histológica dos tumores, bem como seu potencial de recidiva e invasão (Katabi et al. 2010; Shah et al. 2016).

1.3 Tumores de glândula salivar

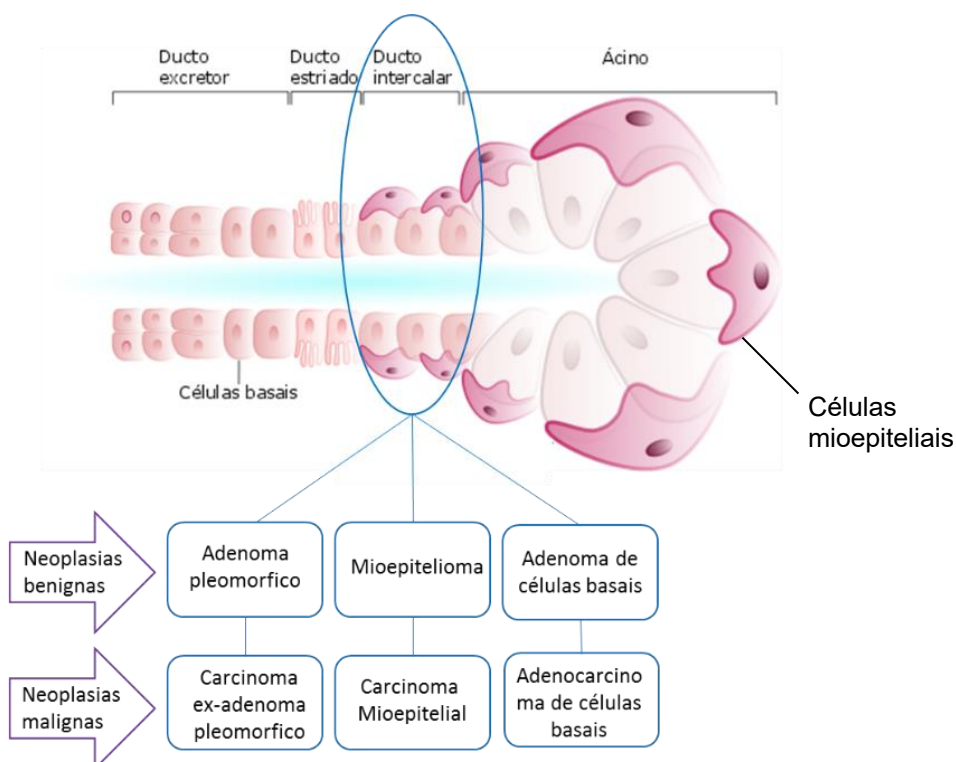
Os tumores de glândula salivar (TGS) representam cerca de 3-6% das neoplasias de cabeça e pescoço, e cerca de 0,5% de todas as neoplasias malignas em humanos e tendo as glândulas salivares maiores como sítios mais acometidos. Atualmente, trata-se de um grupo heterogêneo, com ampla variabilidade clínica, histológica e moleculares, o que gera complexidade e dificuldade para um diagnóstico diferencial em alguns casos e opções de abordagens terapêuticas (Noel et al. 2018; Sowa et al. 2018).

A classificação dos tumores é baseada nos critérios publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS). Em 2022, houve atualização da classificação dos tumores de glândula salivar e atualmente contempla cerca de 30 subtipos histológicos, entre malignos e benignos, baseados nos critérios morfológicos e citogenéticos para classificação, relacionados a marcadores moleculares e imunoistoquímicos que podem ser incorporados no auxílio diagnóstico (Lin et al. 2018; Meyer et al. 2021; Skálová et al. 2022).

Esses tumores podem se originar a partir de diferentes regiões da glândula, e realizar essa identificação é fundamental para diferenciação tumoral. Visto que tumores de origem

acinar se contrastam com os de origem ductal pelas populações celulares presentes, porém quando observamos neoplasias originadas no ducto intercalar (Figura 2) é possível identificar participação do componente mioepitelial de modo parcial ou completo e uma sobreposição de características histológicas e imunoistoquímicas em diferentes tumores, resultando em um amplo espectro de diferenciação da matriz extracelular e produção de diferentes padrões arquitetônicos em um mesmo tipo tumoral. Essas variações histológicas geram um amplo espectro morfológico e implicam em dificuldades tanto no diagnóstico quanto na classificação dessas neoplasias (Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016; Cheuk e Chan 2020; Skálová et al. 2022).

Figura 2 - Representação da distribuição de células mioepiteliais na estrutura da glândula salivar e das neoplasias benignas e malignas derivadas do ducto intercalar.



Fonte: Adaptado de Adams et al. 2013.

Legenda: Representação esquemática da unidade ducto-acinar da glândula salivar, com destaque para o ducto intercalar (em evidência). O esquema ilustra os principais compartimentos celulares envolvidos, incluindo células ductais e células basais/mioepiteliais e os subtipos neoplásicos benignos e malignos que são objeto de estudo nesta pesquisa.

Dentro deste grupo destacam-se alguns subtipos de neoplasias que são consideradas raras e com informações limitadas na literatura quanto a questões que possam auxiliar a elucidar questões quanto a sua composição, através de estudos relacionados aos seus perfis de alterações. Dentre esses tumores, neste estudo destacam-se o adenoma pleomórfico, carcinoma ex-

adenoma pleomórfico, mioepitelioma, carcinoma mioepitelial, adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais (Figuras 3 e 4) (Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016).

1.3.1 Adenoma pleomórfico

O adenoma pleomórfico (AP) é o tumor benigno de glândula salivar mais frequentemente encontrado, correspondendo a uma média de 60% dos tumores de glândulas salivares registrados e acometendo principalmente a parótida. Histologicamente, é considerado um tumor localizado, com presença de cápsula, de lenta progressão e com características mistas quanto a constituição, que pode variar de mixóide a condróide, sendo também considerado um tumor bifásico devido a sua composição que conta com células epiteliais, mioepiteliais e mesenquimais que dão as características para um diagnóstico microscópico. É uma neoplasia conhecida pelas frequentes recorrências e até mesmo a transformação maligna, mas com taxas de sobrevida que variam de 25-65%. Foi identificada a presença de alterações em *PLAG1* em pacientes com este tipo tumoral. Contudo, essas alterações também podem ser vistas em outros tipos tumorais, por isso a necessidade de estudos genéticos para entendimento da composição de alterações moleculares nestas neoplasias (Seok et al. 2019; Almeslet 2020; Hernandez-Prera et al. 2020; Young e Okuyemi 2020).

1.3.2 Carcinoma ex-adenoma pleomórfico

O carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CAEX) é definido como um tumor maligno, originado no ducto intercalar, a partir da recorrência do adenoma pleomórfico benigno primário e que pode ser composto de vários subtipos histológicos, porém os mecanismos ainda não são totalmente conhecidos. Trata-se de um tumor considerado raro, representando 3,6% dos tumores de glândula salivar, acometendo principalmente a glândula parótida, e é relatada sua ocorrência em 0,15% das lesões de cabeça e pescoço (Shah et al. 2016; Yin e Ha 2016; Kessler e Bhatt 2018).

Histopatologicamente, o CAEX é classificado em categorias de acordo com seu grau de crescimento, sendo elas, carcinomas intracapsulares, minimamente invasivos e amplamente invasivos. É identificado como um carcinoma agressivo, com alta taxa de metástases locais ou a distância, principalmente em casos amplamente invasivos. Nesta neoplasia, as modificações iniciais consistem comumente em células tumorais que substituem a camada epitelial do ducto

interno normal, deixando a camada mioepitelial localizada na periferia normal e intacta. As alterações celulares atípicas variam de difusas a focais, e em sua maioria, conta com áreas multifocais contendo carcinoma, que frequentemente supera e substitui os elementos benignos (Covinsky et al. 2018; Seok et al. 2019; Okano et al. 2020).

Em geral os CAEXs são de alto grau com características malignas bem definidas, como crescimento infiltrativo, alta atividade mitótica, pleomorfismo nuclear e necrose, enquanto poucos casos destes tumores são de baixo grau. Sendo assim, considerando tamanha heterogeneidade, o papel das células mioepiteliais na progressão tumoral vem sendo estudado, pois tem sido notado que ao invés de atuar como supressor tumoral, essas células têm contribuído para um microambiente que favorece a progressão tumoral (Shah et al. 2016; Yin e Ha 2016; Kessler e Bhatt 2018; Covinsky et al. 2018; Seok et al. 2019; Okano et al. 2020; Scarini et al. 2021).

1.3.3 Mioepitelioma

O mioepitelioma é descrito como um tumor benigno de glândulas salivares que acomete principalmente a parótida ou o palato quando em glândulas menores e representa cerca de 2% das neoplasias de glândulas salivares. Histopatologicamente, é identificado como um tumor bem circunscrito e encapsulado de células mioepiteliais com características diversas (podendo variar de fusiformes a plasmocitóides). Como o adenoma pleomórfico pode apresentar padrões diversos, o que inclui semelhantes ao mioepitelioma, a diferenciação entre ambos durante o diagnóstico morfológico se dá pela observação da ausência ou mínima presença de estruturas ductais no mioepitelioma. A recorrência ou transformação maligna deste tipo tumoral são consideradas extremamente raras (Xiao et al. 2016; Weitzel et al. 2017; Young e Okuyemi 2020; Cheuk e Chan 2020).

1.3.4 Carcinoma mioepitelial

O carcinoma mioepitelial (CAMIO) é uma neoplasia rara, maligna e representa até 2% de todas as neoplasias da glândula salivar. As características clínicas são diversas, e ao diagnóstico, o grau histológico é principalmente intermediário ou alto. Este tumor comumente atinge a parótida e é considerado a versão maligna do mioepitelioma, sendo que pode também surgir a partir de recidivas do adenoma pleomórfico, como um subtipo histológico de carcinoma

ex-adenoma pleomórfico. Quanto a sua histologia, há dificuldade de estabelecer uma identidade diferencial, mas geralmente é caracterizado pela extensa composição mioepitelial no ambiente tumoral, pelo padrão de crescimento celular sólido/trabecular, circundando um centro hipocelular que normalmente é mixóide e/ou necrótico. O tumor apresenta alto grau de pleomorfismo, onde são observadas diferentes morfologias, como: células fusiformes, epitelióides, hialinas, plasmocitóides, claras, estreladas e basalóides. A atipia nuclear pode variar de leve a acentuada, e costuma apresentar atividade mitótica. É possível fazer sua diferenciação com o carcinoma epitelial-mioepitelial microscopicamente pela composição celular, uma vez que o carcinoma mioepitelial é majoritariamente com células mioepiteliais, podendo ter células epiteliais, mas sem ocupar mais de 10% do tumor enquanto o epitelial-mioepitelial, tem aspecto lobular, com seu interior epitelial circundado por células mioepiteliais (Rao et al. 2014; Nicholas et al. 2019; Zeitouni et al. 2019; Cheuk e Chan 2020; Xu e Katabi 2021).

Em estudos recentes, tem sido caracterizado pela proliferação infiltrativa de células neoplásicas poligonais de forma difusa, células com núcleos levemente aumentados e citoplasma eosinofílico, mas apresenta um comportamento variável, onde recorrências locais e a evolução de metástases podem ser observadas vários meses ou anos após o diagnóstico inicial. No diagnóstico imunoistoquímico, é observada uma expressão variável de proteínas, tais como calponina e vimentina, sendo usadas como marcadores para a diferenciação mioepitelial, bem como outros marcadores que são úteis para destacar a arquitetura tumoral e evidenciar possíveis padrões (Rao et al. 2014; Nicholas et al. 2019; Zeitouni et al. 2019; Cheuk e Chan 2020; Xu e Katabi 2021).

1.3.5 Adenoma de células basais

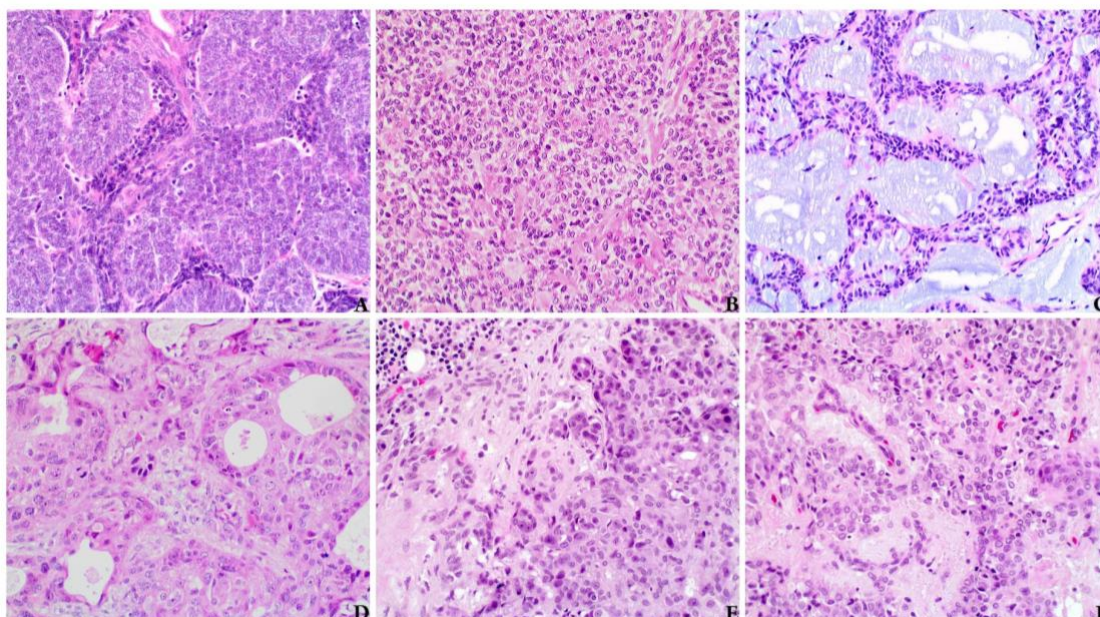
O adenoma de células basais (ACB) é uma neoplasia benigna de glândulas salivares com menor frequência de incidência, correspondendo até 5% dos tumores de glândulas salivares, assim como as demais neoplasias acomete principalmente a parótida como sítio primário. Histologicamente, é um tumor encapsulado, monomorfo, de baixa agressividade, composto por células basalóides uniformes, e células ductais internas que podem apresentar padrões diferentes como: trabecular, tubular, sólido ou membranoso, sendo também observado a combinação de padrões diferentes. Diante dessas características morfológicas, o diagnóstico diferencial microscópico pode ser mais difícil. Estudos utilizando expressão imunoistoquímica

diferencial de beta-catenina e alterações gênicas nesses tumores têm sido realizados ao longo dos anos, com o intuito de se diferenciar dos casos de adenocarcinoma de células basais, mas ainda com informações limitadas (Kawahara et al. 2011; Jo et al. 2016; Wilson et al. 2016; Cheuk e Chan 2020; Robinson 2021; Rito et al. 2022; Sasaki et al. 2024).

1.3.6 Adenocarcinoma de células basais

O adenocarcinoma de células basais (ADCB) da glândula salivar é considerado a versão maligna do adenoma de células basais (ACB) devido a semelhanças arquitetônicas e citológicas. É um subtipo raro, responsável por 1-3% dos diagnósticos de tumores da glândula salivar, acometendo majoritariamente a parótida (>80%). Na classificação da OMS de 2017, o ADCB foi definido como um tumor com bom prognóstico e de baixo grau. Essa neoplasia costuma ser composta de células basalóides menores com citoplasma escasso e núcleos escuros e/ou células basalóides poligonais, além disto, apresenta sobreposição bifásica de células, que abrange células ductais (luminais), basais e mioepiteliais. Baseado em padrão de crescimento, o tumor pode ser dividido em quatro subtipos: membranoso, sólido, tubular e trabecular. O subtipo sólido é o mais comum e o subtipo membranoso o que apresenta maior recorrência tumoral. Também é possível observar um padrão de arranjo cribriforme, mas apenas de modo focal. Estudos indicam a necessidade de diferenciação entre ACB e ADCB, devido a existência de uma sobreposição de características citológicas e histomorfológicas entre esses tumores e que dificultam a sua distinção, já que essa diferenciação é realizada atualmente pela observação de crescimento infiltrativo e presença de invasão como características de malignização, mesmo considerando alguns poucos estudos imunoistoquímicos que ajudam na diferenciação em relação a outras neoplasias (Kawahara et al. 2011; Jo et al. 2016; Wilson et al. 2016; Robinson 2021; Rito et al. 2022; Sasaki et al. 2024).

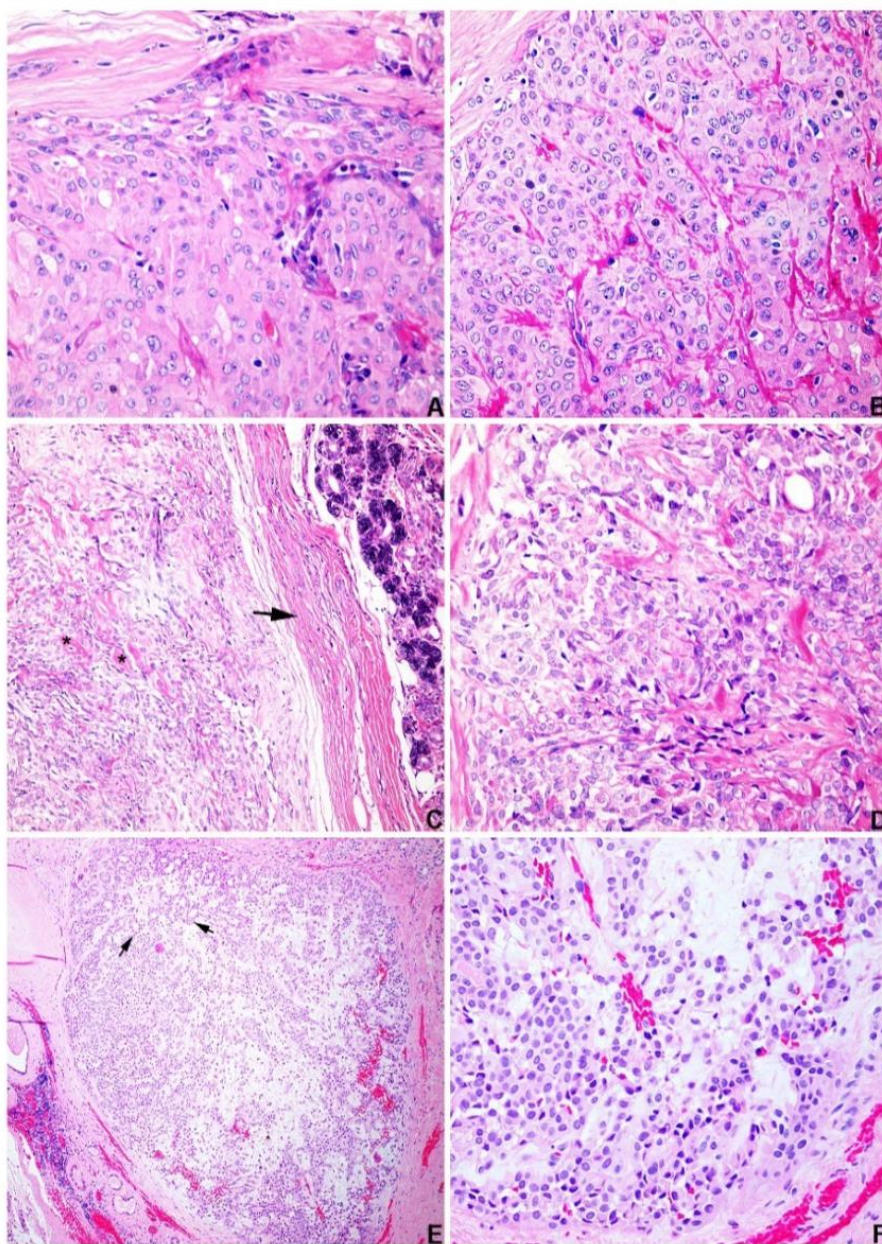
Figura 3 - Aspectos histológicos de neoplasias malignas do ducto intercalar da glândula salivar.



Fonte: Adaptado de Oliveira, CA 2021, p.15 [Dissertação].

Legenda: A, adenocarcinoma de células basais: neoplasia de arquitetura lobular, formada por células basalóides; B, carcinoma mioepitelial: neoplasia formada por lençóis de células mioepiteliais modificadas, de aspecto plasmocitóide e com citoplasma claro; C, carcinoma mioepitelial: área tumoral com presença de formações ductiformes permeadas por material mucóide; D-F, carcinoma ex-adenoma pleomórfico: neoplasia infiltrativa composta por células com pleomorfismo nuclear e com formações ductiformes atípicas. Notar em E a presença de células atípicas, com núcleos hipercromáticos e por vezes multinucleadas.

Figura 4 - Aspectos histológicos de neoplasias benignas do ducto intercaler da glândula salivar.



Fonte: Adaptado de Stamboni HB 2018 [Tese].

Legenda: A e B, adenoma de células basais. Neoplasia basalóide encapsulada. Células neoplásicas com núcleo basofílico e citoplasma amplo; C e D, mioepitelioma. Neoplasia encapsulada (seta) composta majoritariamente por células mioepiteliais de citoplasma claro. Em algumas regiões notam-se formações hialinas (asterisco); E e F, adenoma pleomórfico. Neoplasia bem delimitada composta por células mioepiteliais, formações ductais (E, seta) e estroma hialino e frouxo (mixóide). Células epiteliais de fenótipo plasmocitóide.

1.4 Identificação de alterações genéticas em tumores de glândula salivar

Considerando os aspectos mencionados anteriormente, existem alguns estudos relacionados as neoplasias de glândulas salivares que procuram identificar alterações epigenéticas e/ou genéticas que possam justificar a grande variedade morfológica e fenotípica observada nesses tumores. Por esses estudos, seria possível entender melhor os caminhos de alterações já identificadas ou encontrar novas alterações que possam caracterizar a composição histológica dos tumores (da Cunha et al. 2021; Toper e Sarioglu 2021; Meyer et al. 2021). Do ponto de vista epidemiológico, os TGS não apresentam fatores de risco bem estabelecidos ou diretamente associados, diferentemente de outras neoplasias da região de cabeça e pescoço que podem estar relacionadas ao consumo de álcool, tabagismo ou infecção pelo HPV. Da mesma forma, nenhuma síndrome conhecida determinada por mutações germinativas tem sido consistentemente associada ao desenvolvimento de tumores de glândulas salivares (Skálová et al. 2022).

Nos estudos direcionados à identificação de biomarcadores, diferentes abordagens técnicas são utilizadas, incluindo hibridização *in situ*, PCR, imunoistoquímica (IHQ) e Sequenciamento de Nova Geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), que são os métodos mais frequentemente utilizados para essa finalidade (da Cunha et al. 2021; Meyer et al. 2021). Especificamente, o Sequenciamento de Nova Geração, consiste em uma técnica de alta precisão, usada para avaliar uma sequência de bases de DNA ou RNA, com o intuito de conhecer e explorar informações genéticas da amostra. Isso nos permite obter diferentes informações como: relação evolutiva, mapeamento de mutações, presença de elementos móveis, entre outros, através do sequenciamento de DNA em larga escala, do exoma completo ou até mesmo um sequenciamento direcionado (Fietto e Maciel 2020; Hu et al. 2021).

Grande parte dos estudos utiliza amostras congeladas ou frescas, favorecendo a obtenção de resultados mais amplos ou até mesmo exploratórios. No entanto, quando se trata de amostras provenientes de material parafinado, o sequenciamento direcionado é a abordagem que melhor equilibra a profundidade da exploração que se propõe, focando em painéis que concentrem-se em regiões e genes relevantes para a patogênese tumoral, sejam eles comerciais ou customizados (Bewicke-Copley et al. 2019).

Nesse contexto, o NGS representa a técnica mais amplamente utilizada para a identificação de alterações e mutações em regiões genômicas específicas, que podem estar associadas a oncogenes ou genes supressores de tumor, contribuindo de forma significativa para

o entendimento da patogênese molecular dessas lesões. Assim, o uso dessa metodologia possibilita uma avaliação mais abrangente e detalhada das neoplasias, o que pode, posteriormente, auxiliar no aprimoramento do diagnóstico, na definição do prognóstico e no desenvolvimento de terapias direcionadas (Fonseca et al., 2016; Kar et al., 2020; Hu et al., 2021).

Sob essa perspectiva, alguns estudos identificaram alterações em alguns tipos histológicos de tumores de glândula salivar, como o adenoma pleomórfico, carcinoma do ducto salivar, carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenoide cístico, que são os subtipos com mais estudos na literatura, e dentre esses achados, podemos observar algumas alterações atualmente bem descritas, como a translocação envolvendo *PLAG1*, translocação de *CRTC1-MAML2*, Fusão/ativação/amplificação do *MYB* ou *MYBL1*, mutações em *NOTCH*, amplificação de *HER2*, mutação em *TP53*, *PIK3CA*, *HRAS*, hiperexpressão de *EGFR* ou a perda de *PTEN*, por exemplo. A identificação dessas alterações auxilia em um diagnóstico direcionado, associação com prognóstico e perspectivas de possíveis terapias alvo (Andreasen et al. 2019; Toper e Sarioglu, 2021; da Cunha et al. 2021; Meyer et al. 2021; Skálová et al. 2022). Bem como, alguns estudos que tentam trazer diferenciação entre adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais através da expressão diferencial por IHQ, onde, em ACB a proteína apresenta expressão nuclear e não em ADCB, e posteriormente, em conjunto a isso, foi observada a alteração do gene *CTNNB1* (p.I35T) em ACB e expressão nuclear por IHQ, diferentemente de ADCB, em que este conjunto de alterações não é observada de maneira significativa (Kawahara et al. 2011; Wilson et al. 2016; Tesdahl et al. 2016).

Neste sentido, em 2022 a Organização Mundial da Saúde (*WHO*) acrescentou, pela primeira vez, parâmetros para o diagnóstico diferencial que vão além dos critérios patológicos, incluindo agora critérios genéticos. Isso inclui dentro das neoplasias de interesse alguns perfis moleculares que possam ser associados, sendo para adenoma pleomórfico, destacam-se as fusões ou amplificações envolvendo **PLAG1**, seguidas pelas alterações em **HMGA2**. No adenoma de células basais, são frequentemente relatadas mutações em **CTNNB1** e mutações em **CYLD**, enquanto alterações em **AXIN1** e **APC** são menos comuns. Em mioepiteliomas, especialmente no subtipo oncocítico, a fusão envolvendo **PLAG1**. No carcinoma ex-adenoma pleomórfico, as fusões ou amplificações de **PLAG1**, seguidas pelas alterações em **HMGA2** e mutações em **TP53**. Já no adenocarcinoma de células basais, são relatadas mutações em **CYLD**. Por fim, no carcinoma mioepitelial, as fusões envolvendo **PLAG1** são observadas e rearranjos de **EWSR1**. Porém, ainda não se sabe quanto aos efeitos dessas alterações nessas neoplasias.

Além disso, estudos preliminares do nosso grupo de pesquisa foram realizados por Stamboni HB (2018) e Oliveira CA (2021), avaliando se seria possível classificar os subtipos histológicos das neoplasias benignas e malignas do ducto intercalar através de um painel imunoistoquímico. Os resultados mostraram que os tumores benignos e malignos têm um perfil de expressão diferente, mas não foi possível separar os diferentes subtipos, sugerindo que essas lesões possam representar espectros histológicos de um mesmo tumor.

2 JUSTIFICATIVA

Ao longo dos anos, estudos têm sido realizados visando a identificação de alterações nas diversas neoplasias de glândulas salivares, com foco principalmente no carcinoma adenoide cístico e no carcinoma mucoepidermoide e mais recentemente, adenoma e adenocarcinoma de células basais. Esses estudos têm apontado possíveis associações entre alterações moleculares, especialmente rearranjos ou fusões gênicas, e estes subtipos histológicos específicos.

Contudo, ainda não há um painel de marcadores moleculares que auxiliem na caracterização desses tumores de modo consistente, especialmente nos subtipos que são estudados nesta pesquisa. Diante disso, a identificação de mutações nessas neoplasias de glândula salivar poderá apontar novos caminhos para o entendimento das bases moleculares, e contribuir para o aprimoramento de sua classificação e diagnóstico, além de fornecer informações para a determinação de fatores prognósticos e evidências para o desenvolvimento de novas incursões terapêuticas.

Para este estudo, foram selecionados um conjunto de neoplasias benignas e malignas derivadas do ducto intercalar - adenoma pleomórfico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, mioepitelioma, carcinoma mioepitelial, adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais – que apresentam um marcante componente mioepitelial com características fenotípicas bastantes similares. Nos estudos preliminares do nosso grupo (Stamboni, 2018; Oliveira, 2021) demonstraram que os tumores benignos e malignos podem ser separados por um painel de proteínas. Contudo, não foi possível separar os diferentes subtipos tumorais, sugerindo que essas lesões possam representar espectros histológicos de um mesmo tumor. Dessa forma, a avaliação do perfil molecular desses tumores pode permitir um refinamento desses resultados.

Com base nesse panorama, realizamos uma investigação exploratória inicial com um amplo painel de genes associados ao câncer, protocolo bem padronizado para uso de amostras parafinadas, para então, em um segundo momento, realizar a validação das mutações somáticas de interesse que fossem observadas e posterior identificação em demais casos que não puderam ser utilizadas na investigação inicial. Paralelamente, em um segundo momento, optamos por realizar uma investigação da região *hotspot* do gene *CTNNB1* (focada no éxon 3) para verificar se em nossa casuística também observaríamos a mutação relatada na literatura e associada ao ACB e se encontraríamos ainda, outros potenciais padrões nos demais subtipos, visto que não há tal investigação na literatura atualmente.

3 OBJETIVOS

Determinação de um perfil de mutações em neoplasias benignas (adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais) e malignas (carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais) das glândulas salivares, derivadas do ducto intercalar

3.1 Objetivos específicos

Verificar se os tumores podem ser classificados de acordo com o perfil de mutação destes genes

Comparar a presença de alterações com características demográficas, clínicas e patológicas dos tumores

Validar a presença das alterações moleculares

4 METODOLOGIA

4.1 Casuística

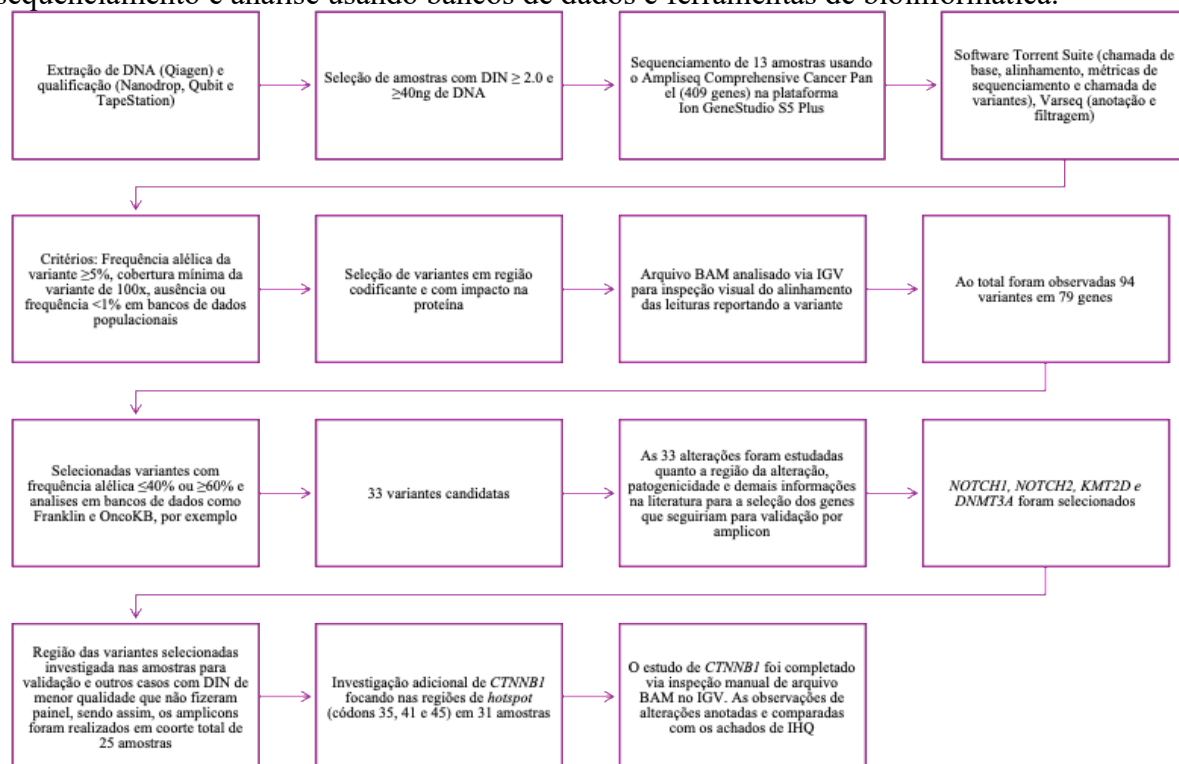
Trata-se de um estudo retrospectivo de casos registrados no período de 1980 a 2020 no A.C.Camargo Cancer Center, onde foram selecionados casos que possuíam material parafinado armazenado no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Essa casuística já havia sido selecionada em estudos anteriores do grupo e conta com 53 casos (28 de adenoma pleomórfico, 3 de mioepitelioma, 7 de adenoma de células basais, 8 de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, 4 de carcinoma mioepitelial e 3 de adenocarcinoma de células basais).

Para a seleção do material, as lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de cada caso foram analisadas para checagem das estruturas glandulares presentes e seleção do material a ser utilizado na pesquisa. Foram incluídos neste estudo os casos que apresentaram blocos de parafina com material satisfatório e suficiente para as etapas necessárias que foram realizadas neste estudo. Sendo assim, esses casos passaram por confirmação do diagnóstico e foram revisados com o auxílio de um patologista (Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto). Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada caso foram estudados nos prontuários arquivados no H2TC e Tasy do A.C.Camargo Cancer Center para montagem de um banco de dados no sistema REDCap, contendo informações demográficas, clínicas e patológicas. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (protocolo 2706/19).

Após essa avaliação, 31 casos tinham bloco de parafina com material suficiente para as posteriores análises (8 de adenoma pleomórfico, 2 de mioepitelioma, 6 de adenoma de células basais, 8 de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, 4 de carcinoma mioepitelial e 3 de adenocarcinoma de células basais).

Na Figura 5 pode ser observado o fluxograma que resume as etapas metodológicas realizadas neste estudo e descritas abaixo.

Figura 5 - Descrição das etapas metodológicas do projeto. O fluxo de trabalho conta com as etapas de seleção das amostras, extração de DNA e avaliação dos critérios de qualidade, sequenciamento e análise usando bancos de dados e ferramentas de bioinformática.



Fonte: Autoria própria.

4.2 Sequenciamento de Nova-Geração

4.2.1 Extração de DNA e qualificação das amostras

As lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina (HE) passaram por revisão para a marcação de regiões de interesse, considerando a área com maior número de células tumorais, sendo consideradas áreas com no mínimo 70% de células tumorais, e sem a presença de infiltrado inflamatório extenso. Após a escolha das regiões apropriadas à análise, foram realizados *punchs* nos blocos de parafina nas áreas selecionadas, e armazenados em tubos 1,5mL para posterior extração do DNA, utilizando-se o kit QIAamp FFPE Tissue, como descrito:

Foi adicionado 1mL de xilol em cada tubo contendo os fragmentos. As amostras homogeneizadas e centrifugadas. O sobrenadante descartado e adiciona-se 1mL de etanol 100%. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi descartado e o pellet seco em centrífuga a vácuo. Adicionado 180µL do tampão ATL e 20µL de proteinase K e as amostras incubadas por 16 horas a 56°C, seguido por incubação por 1 hora a 90°C. Posteriormente, foi adicionado

200µL do tampão AL e 200µL de etanol 100%, sendo homogeneizado. Essa solução foi transferida para tubos de 1,5mL contendo uma coluna de sílica inserida e centrifugada a 8000rpm por 1 minuto. Após lavagens e centrifugações com etanol 100%, tampão AW1, tampão AW2 e etanol 70% a coluna foi então transferida para outro tubo e adicionado 20µL de água livre de nuclease, deixando a temperatura ambiente por um minuto, seguido por centrifugação por mais 1 minuto a 14000 rpm.

O DNA das 53 amostras foi extraído e submetido a avaliação de controle de qualidade através dos métodos espectrofotométrico Nanodrop (Thermo Fisher Scientific), para quantificação e pureza e fluorimétrico *Qubit* (Thermo Fisher Scientific), para quantificação. A integridade do DNA extraído foi avaliada utilizando-se o equipamento 4200 *TapeStation* (Agilent Technologies) usando o ensaio *ScreenTape Genomic DNA*. Os valores de *DNA Integrity Number* (DIN) variam de 1 a 10, e, quanto maior o valor de DIN, melhor é a integridade do DNA da amostra. Em nosso estudo, foram consideradas as amostras que tivessem valores de $DIN \geq 2,0$ e massa suficiente para as análises, por serem amostras antigas e parafinadas.

4.2.2 Painel de genes associados ao câncer

A estratégia utilizada para identificação de variantes genéticas tumorais neste estudo foi a de painel gênico por amplificação *multiplex* com uso do kit *Comprehensive Cancer Panel* (CCP) (Thermofisher) para sequenciamento de nova geração (NGS, do inglês *Next Generation Sequencing*), que investiga 409 genes associados a diferentes neoplasias. Os genes que compõem o painel podem ser identificados na Figura 6.

As bibliotecas de DNA foram construídas utilizando o kit *Ion AmpliSeq Library Kit 2.0* (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando ao menos 40ng de DNA, seguindo as recomendações do fabricante. De maneira resumida, o preparo de biblioteca consiste no enriquecimento das regiões alvo através de amplificação do DNA do tumor por PCR multiplex, seguida de digestão parcial das sequências de iniciadores (não informativas) e ligação de adaptadores e *barcodes* (sequências únicas que permitem o sequenciamento massivo paralelo e a identificação das amostras após o sequenciamento).

Na sequência, as reações foram purificadas com *beads* magnéticas (Ampure XP), eluídas e quantificadas por qPCR (Ion Library Taqman Quantitation kit), sendo consideradas qualificadas aquelas com rendimento superior a 100pM.

Figura 6 - Lista contendo os 409 genes presentes no *Comprehensive Cancer Panel* (CCP).

<i>ABL1</i>	<i>BCL2</i>	<i>CDH20</i>	<i>DDB2</i>	<i>EXT1</i>	<i>GATA2</i>	<i>IRS2</i>	<i>MLL2</i>	<i>MAPK8</i>	<i>NCOA1</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>RRM1</i>	<i>STK36</i>	<i>TRIP11</i>
<i>ABL2</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>CDH5</i>	<i>DDIT3</i>	<i>EXT2</i>	<i>GATA3</i>	<i>ITGA10</i>	<i>MMP2</i>	<i>MYH11</i>	<i>NFE2L2</i>	<i>PAX5</i>	<i>RNF2</i>	<i>SUFU</i>	<i>TSC2</i>
<i>ACVR2A</i>	<i>BCL2L2</i>	<i>CDK12</i>	<i>DDR2</i>	<i>EZH2</i>	<i>GDNF</i>	<i>IRF4</i>	<i>MPL</i>	<i>MARK1</i>	<i>NCOA2</i>	<i>PRKAR1A</i>	<i>RPS6KA2</i>	<i>SYK</i>	<i>TSC1</i>
<i>ADAMTS20</i>	<i>BCL3</i>	<i>CDK4</i>	<i>DEK</i>	<i>FAM123B</i>	<i>GNAI1</i>	<i>ITGA9</i>	<i>MLL</i>	<i>MYH9</i>	<i>NFKB1</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>RNASEL</i>	<i>SYNE1</i>	<i>TRRAP</i>
<i>AFF1</i>	<i>BCL6</i>	<i>CDK6</i>	<i>DICER1</i>	<i>FANCA</i>	<i>GNAQ</i>	<i>IKBKB</i>	<i>MLL3</i>	<i>MARK4</i>	<i>NCOA4</i>	<i>PTGS2</i>	<i>RUNX1</i>	<i>TAF1</i>	<i>TSHR</i>
<i>AFF3</i>	<i>BCL9</i>	<i>CDK8</i>	<i>DNMT3A</i>	<i>FANCC</i>	<i>GNAS</i>	<i>IKZF1</i>	<i>MRE11A</i>	<i>MBD1</i>	<i>PBX1</i>	<i>PDGFB</i>	<i>RECQL4</i>	<i>TAF1L</i>	<i>UGT1A1</i>
<i>AKAP9</i>	<i>BCR</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>DPYD</i>	<i>FANCD2</i>	<i>GPR124</i>	<i>ITGB3</i>	<i>MSH2</i>	<i>MCL1</i>	<i>PAX3</i>	<i>PTPN11</i>	<i>RUNX1T1</i>	<i>TAL1</i>	<i>USP9X</i>
<i>AKT1</i>	<i>BIRC2</i>	<i>CDKN2B</i>	<i>DST</i>	<i>FANCF</i>	<i>GRM8</i>	<i>JUN</i>	<i>MSH6</i>	<i>MDM2</i>	<i>PTEN</i>	<i>PDGFRA</i>	<i>SF3B1</i>	<i>TBX22</i>	<i>UBR5</i>
<i>AKT2</i>	<i>BIRC3</i>	<i>CDKN2C</i>	<i>EGFR</i>	<i>FANCG</i>	<i>GUCY1A2</i>	<i>JAK1</i>	<i>MAF</i>	<i>MDM4</i>	<i>PTCHI</i>	<i>PTPRD</i>	<i>SDHB</i>	<i>TCF12</i>	<i>VHL</i>
<i>AKT3</i>	<i>BIRC5</i>	<i>CEBPA</i>	<i>EML4</i>	<i>FAZ</i>	<i>HCAR1</i>	<i>JAK2</i>	<i>MAFB</i>	<i>MEN1</i>	<i>PBRM1</i>	<i>PALB2</i>	<i>SGK1</i>	<i>TCF3</i>	<i>XPC</i>
<i>ALK</i>	<i>BLM</i>	<i>CHEK1</i>	<i>EP300</i>	<i>FBXW7</i>	<i>HIF1A</i>	<i>JAK3</i>	<i>MTOR</i>	<i>MET</i>	<i>PTPRT</i>	<i>PPARG</i>	<i>SAMD9</i>	<i>TCF7L1</i>	<i>XRCC2</i>
<i>APC</i>	<i>BLNK</i>	<i>CHEK2</i>	<i>EP400</i>	<i>FGFR1</i>	<i>HLF</i>	<i>KLF6</i>	<i>MAGEA1</i>	<i>MITF</i>	<i>PRDM1</i>	<i>PAX8</i>	<i>SDHC</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>XPA</i>
<i>AR</i>	<i>BMPR1A</i>	<i>CIC</i>	<i>EPHA3</i>	<i>FGFR2</i>	<i>HNFI1A</i>	<i>KRAS</i>	<i>MTR</i>	<i>NRAS</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>PSIP1</i>	<i>SDHA</i>	<i>TCL1A</i>	<i>XPO1</i>
<i>ARID1A</i>	<i>BRAF</i>	<i>CKS1B</i>	<i>EPHA7</i>	<i>FGFR3</i>	<i>HOOK3</i>	<i>KDR</i>	<i>MAGI1</i>	<i>NTRK1</i>	<i>PER1</i>	<i>PIK3CB</i>	<i>SDHD</i>	<i>TET1</i>	<i>WHSC1</i>
<i>ARID2</i>	<i>BRD3</i>	<i>CMPK1</i>	<i>EPHB1</i>	<i>FGFR4</i>	<i>HRAS</i>	<i>KAT6A</i>	<i>MTRR</i>	<i>NTRK3</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>PMS1</i>	<i>SETD2</i>	<i>TET2</i>	<i>WAS</i>
<i>ARNT</i>	<i>BRIP1</i>	<i>COL1A1</i>	<i>EPHB4</i>	<i>FH</i>	<i>HSP90AA1</i>	<i>KAT6B</i>	<i>MALT1</i>	<i>NIN</i>	<i>PGAP3</i>	<i>PAK3</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>TFE3</i>	<i>WT1</i>
<i>ASXL1</i>	<i>BTK</i>	<i>CRBN</i>	<i>EPHB6</i>	<i>FLCN</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>KDM5C</i>	<i>MUC1</i>	<i>NUP98</i>	<i>PKHD1</i>	<i>POU5F1</i>	<i>SBDS</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>WRN</i>
<i>ATF1</i>	<i>BUB1B</i>	<i>CREB1</i>	<i>ERBB2</i>	<i>FLI1</i>	<i>ICK</i>	<i>KDM6A</i>	<i>MAML2</i>	<i>NSD1</i>	<i>PLEKHG5</i>	<i>POT1</i>	<i>SEPT9</i>	<i>TGM7</i>	<i>ZNF384</i>
<i>ATM</i>	<i>CARD11</i>	<i>CREBBP</i>	<i>ERBB3</i>	<i>FLT1</i>	<i>IDH1</i>	<i>KEAP1</i>	<i>MUTYH</i>	<i>NUMA1</i>	<i>PLCG1</i>	<i>PAX7</i>	<i>SMAD2</i>	<i>THBS1</i>	<i>ZNF521</i>
<i>ATR</i>	<i>CASC5</i>	<i>CRKL</i>	<i>ERBB4</i>	<i>FLT3</i>	<i>IGF1R</i>	<i>KIT</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>NUP214</i>	<i>PIMI</i>	<i>PRKDC</i>	<i>SMAD4</i>	<i>TIMP3</i>	
<i>ATRX</i>	<i>CBL</i>	<i>CRTC1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>FLT4</i>	<i>IDH2</i>	<i>LPHN3</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>NKX2-1</i>	<i>PARP1</i>	<i>RAF1</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>TLR4</i>	
<i>AURKA</i>	<i>CCND1</i>	<i>CSF1R</i>	<i>ERCC2</i>	<i>FN1</i>	<i>ING4</i>	<i>LCK</i>	<i>MYB</i>	<i>NPM1</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>RAD50</i>	<i>SMO</i>	<i>TLX1</i>	
<i>AURKB</i>	<i>CCND2</i>	<i>CSMD3</i>	<i>ERCC3</i>	<i>FOXL2</i>	<i>ITGB2</i>	<i>LRP1B</i>	<i>MYC</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>PIK3C2B</i>	<i>RALGDS</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>TNFAIP3</i>	
<i>AURKC</i>	<i>CCNE1</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>ERCC4</i>	<i>FOXO1</i>	<i>IKBKE</i>	<i>LAMP1</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>RNF213</i>	<i>SMUG1</i>	<i>TNFRSF14</i>	
<i>AXL</i>	<i>CD79A</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>ERCC5</i>	<i>FOXO3</i>	<i>IGF2</i>	<i>LPP</i>	<i>MYCL1</i>	<i>NOTCH4</i>	<i>PIK3CA</i>	<i>RET</i>	<i>SOCS1</i>	<i>TNK2</i>	
<i>BAI3</i>	<i>CD79B</i>	<i>CYLD</i>	<i>ERG</i>	<i>FOXP1</i>	<i>IGF2R</i>	<i>LIFR</i>	<i>MAP3K7</i>	<i>NFKB2</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>RARA</i>	<i>SOX11</i>	<i>TOP1</i>	

<i>BAP1</i>	<i>CDC73</i>	<i>CYP2C19</i>	<i>ESR1</i>	<i>FOXP4</i>	<i>IL2</i>	<i>LTF</i>	<i>MYCN</i>	<i>NLRP1</i>	<i>PLAG1</i>	<i>RB1</i>	<i>SOX2</i>	<i>TP53</i>	
<i>BCL10</i>	<i>CDH1</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>ETS1</i>	<i>FZR1</i>	<i>IL21R</i>	<i>LTK</i>	<i>MAPK1</i>	<i>NF1</i>	<i>PMS2</i>	<i>RHOH</i>	<i>SRC</i>	<i>TPR</i>	
<i>BCL11A</i>	<i>CDH11</i>	<i>DAXX</i>	<i>ETV1</i>	<i>G6PD</i>	<i>IL6ST</i>	<i>MLLT10</i>	<i>MYD88</i>	<i>NF2</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>ROS1</i>	<i>SSX1</i>	<i>TRIM24</i>	
<i>BCL11B</i>	<i>CDH2</i>	<i>DCC</i>	<i>ETV4</i>	<i>GATA1</i>	<i>IL7R</i>	<i>MLH1</i>	<i>MN1</i>	<i>NBN</i>	<i>PML</i>	<i>REL</i>	<i>STK11</i>	<i>TRIM33</i>	

Fonte: ThermoFisher. Ion AmpliSeq™ Comprehensive Cancer Panel target gene list.

4.2.3 Sequenciamento de Nova Geração (NGS), critérios e ferramentas de análise

O sequenciamento foi realizado na plataforma *IonGeneStudio S5 Plus* (Thermo Fisher Scientific, EUA) utilizando o Ion540 chip, de acordo com as instruções do fabricante. A análise foi realizada com os softwares Torrent Suite 5.12.3 (chamada de base, alinhamento, métricas de sequenciamento e chamada de variantes) e Varsseq 2.2.5 (anotação e filtragem), seguindo os seguintes critérios: cobertura mínima da região da variante em $\geq 100x$, frequência alélica da variante $\geq 5\%$, cobertura mínima da variante de 100x, ausência ou frequência $< 1\%$ em bancos de dados populacionais (gnomAD e ExAC). Foram selecionadas variantes em região codificante e com impacto na proteína (*missense*, *nonsense*, *splice site* e *indels*). Foi feita inspeção visual do alinhamento das leituras reportando a variante, incluindo critérios como ausência de *strand-bias* (ter as leituras nas fitas *forward* e *reverse* de forma equilibrada), leitura completa em relação ao alvo, região livre de erros e não homopolimérica/repetitiva (software Integrative Genomics Viewer – IGV 2.18.4).

Nas Figuras 7 e 8 podem ser conferidas as demais informações das métricas de qualidade que foram obtidas nas avaliações nas etapas pré e pós sequenciamento em larga escala. Na Figura 8 é possível visualizar que 13 amostras das 15 que puderam ser sequenciadas, obtiveram padrões de métricas de qualidade satisfatórios.

Adicionalmente, e considerando as variantes observadas nessas 13 amostras, optamos pela priorização de variantes potencialmente somáticas (frequência alélica $\leq 40\%$ e $\geq 60\%$) e relacionadas com as neoplasias estudadas, considerando a classificação de oncogenicidade em ferramentas como Franklin genoox, Rare Exome Variant Ensemble Learner (REVEL), *Cancer Genome Interpreter* (CGI), além dos bancos de dados ClinVar, Cosmic e OncoKB.

O Franklin Genoox é uma plataforma online de interpretação e classificação de variantes genéticas, integrando bases de dados públicas e algoritmos preditivos que aplica automaticamente os critérios da ACMG/AMP para sugerir a classificação clínica da variante. REVEL trata-se de uma ferramenta computacional que prediz o potencial patogênico de variantes missense, combinando os resultados de vários algoritmos de predição em um único score integrado (explicar o significado do score e colocar qual foi o score usado para filtrar, se for o caso). O *Cancer Genome Interpreter* (CGI) é uma plataforma online que interpreta alterações genômicas em tumores. Ela cruza as variantes com bases de dados de câncer e predições computacionais, classificando seu possível papel na oncogênese, sugerindo um papel desencadeador (*driver*) ou passageiro (*passenger*) da variante e indicando potencial

acionabilidade. ClinVar é um banco de dados público do NCBI que reúne informações sobre a relação entre variantes genéticas e fenótipos clínicos, majoritariamente associados a síndromes hereditárias. COSMIC e OncoKB são banco de dados de mutações somáticas em câncer, sendo que este último é um banco de dados clínico curado que fornece uma classificação das alterações genéticas em câncer segundo seu impacto clínico, com gestão do *Memorial Sloan Kettering Cancer Center*.

Figura 7 - Dados da verificação da concentração e pureza, quantificação e integridade do DNA extraído de amostras de tumores de glândula salivar e abordagens metodológicas realizadas.

continua

Caso	Ano do bloco	Qubit (valores em ng/ul)	Nanodrop		DIN	Painel CCP	Avaliação por <i>amplicon</i>	Avaliação <i>CTNNB1</i>
			Razão 260/280	Razão 260/230				
AP7	1997	3,02	1,98	1,56	1,60	Não	Sim	Sim
AP8	1997	12,60	1,9	2,03	1,70	Não	Sim	Sim
AP9	1997	9,74	1,94	2,00	1,20	Não	Sim	Sim
AP10	1997	8,30	1,86	2,05	1,80	Não	Sim	Sim
AP19	1999	30,80	1,85	2,18	2,10	Sim	Não avaliado	Sim
AP23	2005	91,00	1,88	2,09	4,50	Sim	Não avaliado	Sim
AP25	2005	7,52	1,94	1,92	2,30	Sim	Sim	Sim
AP26	2006	0,72	2,33	1,22	1,80	Não	Sim	Sim
MIO1	2008	48,60	1,92	2,15	2,20	Sim	Não avaliado	Sim
MIO3	2014	5,88	2,05	2,06	2,30	Sim	Sim	Sim
ACB2	2004	8,78	1,92	1,94	1,00	Não	Sim	Sim
ACB3	2009	19,30	1,97	2	1,10	Não	Sim	Sim
ACB4	2009	33,40	1,95	1,91	1,30	Não	Sim	Sim
ACB5	2016	68,00	1,88	2,19	2,70	Sim*	Sim	Sim
ACB6	2016	74,00	1,98	2,25	3,80	Sim	Sim	Sim
ACB7	2019	77,20	1,97	2,05	4,20	Sim	Sim	Sim
CAEX1	2001	26,40	1,94	2,10	1,60	Não	Sim	Sim
CAEX2	2005	3,56	1,83	1,76	3,20	Não	Sim	Sim
CAEX3	2008	67,20	1,97	2,11	2,70	Sim	Sim	Sim
CAEX4	2011	30,80	1,78	2,18	1,80	Não	Sim	Sim
CAEX5	2016	7,26	2,01	1,8	1,70	Não	Sim	Sim
CAEX6	2016	80,20	2,00	2,10	2,60	Sim	Não avaliado	Sim

CAEX7	2017	1,45	2,00	1,46	2,30	Não	Sim	Sim
CAEX8	2017	67,00	2,00	2,16	4,80	Sim	Sim	Sim
CAMIO1	1999	130,20	1,88	2,25	3,20	Sim	Não avaliado	Sim
CAMIO2	2000	78,40	1,91	2,17	2,80	Sim	Sim	Sim
CAMIO3	2017	2,02	2,06	1,61	3,00	Não	Sim	Sim
CAMIO4	2018	71,60	2,00	2,00	1,60	Não	Sim	Sim
ADCB1	1997	25,20	1,86	2,23	3,20	Sim*	Sim	Sim
ADCB2	1998	29,60	1,88	2,21	1,70	Não	Sim	Sim
ADCB3	2018	12,30	2,01	2,07	2,00	Sim	Não avaliado	Sim

conclusão

Fonte: Autoria própria.

Legenda: Os casos estão nomeados por siglas condizente com seus subtipos, sendo: AP = adenoma pleomórfico; MIO = mioepitelioma; ACB = adenoma de células basais; CAEX = carcinoma ex-adenoma pleomórfico; CAMIO = carcinoma mioepitelial; ADCB = adenocarcinoma de células basais.

*= Métricas mínimas de qualidade pós sequenciamento não alcançadas e com baixa qualidade, sendo excluída da análise de sequenciamento de painel.

Figura 8 - Informações gerais de qualidade do sequenciamento das amostras de tumores de glândula salivar que foram sequenciados utilizando o painel CCP.

Tumores	Caso	% de células tumorais	Quantidade de DNA (ng) usado na biblioteca	Integridade do DNA tumoral (DIN)	Profundidade de cobertura de bases	Leituras mapeadas	Tamanho médio das leituras	Leituras no alvo (%)	Uniformidade	Cobertura 1x	20x	100x	500x	Cobertura média
Adenoma pleomórfico	AP19	70%	80	2,1	1.772	30.745.441	109 bp	97,75%	85,21%	99,69%	98,21%	95,24%	78,83%	92,99%
Adenoma pleomórfico	AP23	90%	60	4,5	1.026	16.958.127	124 bp	98,97%	91,50%	99,72%	98,47%	95,78%	72,75%	91,68%
Adenoma pleomórfico*	AP25rec	80%	80	2,3	1.643	30.641.686	94 bp	97,11%	52,39%	91,37%	75,30%	64,62%	46,37%	69,42%
Mioepitelioma	MIO1	70%	80	2,2	700.7	12.664.942	98 bp	96,36%	77,57%	99,40%	96,26%	83,92%	39,45%	79,76%
Mioepitelioma	MIO3	80%	40	2,3	1.234	22.132.595	98 bp	97,91%	61,11%	94,27%	79,16%	70,30%	48,72%	73,11%
Adenoma de células basais	ACB6	80%	60	3,8	878,0	14.952.873	115 bp	97,69%	90,07%	99,73%	98,48%	95,07%	60,36%	88,41%
Adenoma de células basais	ACB7	80%	60	4,2	1.748	29.035.643	118 bp	98,86%	88,49%	99,70%	98,58%	96,37%	82,61%	94,32%
Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	CAEX3	80%	100	2,7	2.093	35.685.075	108 bp	98,85%	88,55%	99,78%	98,74%	96,81%	85,83%	95,29%
Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	CAEX6	70%	100	2,6	1.416	23.346.323	111 bp	99,19%	88,02%	99,65%	98,35%	95,40%	77,07%	92,62%
Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	CAEX8	70%	60	4,8	834.4	14.054.953	113 bp	98,79%	87,11%	99,57%	97,94%	92,65%	55,01%	86,29%
Carcinoma mioepitelial	CAMIO1	90%	60	3,2	695.5	11.803.331	121 bp	98,62%	89,59%	99,66%	98,11%	92,94%	50,99%	85,43%
Carcinoma mioepitelial	CAMIO2	90%	100	2,8	2.482	40.958.074	132 bp	99,13%	85,91%	99,79%	98,82%	96,47%	85,81%	95,22%
Adenocarcinoma de células basais	ADCB3	80%	80	2,0	1.815	31.806.231	101 bp	98,41%	72,93%	99,25%	95,92%	88,50%	66,78%	87,61%

Fonte: Autoria própria.

*= a porcentagem da cobertura em 100x ficou um pouco abaixo do indicado para critério de inclusão, mas neste caso, foi considerado o contexto e qualidade das leituras, pois não havia material para repetição e trata-se de um caso recidivado. Legenda: Profundidade de cobertura de bases = número médio de vezes que uma base foi sequenciada. Leituras mapeadas = correspondem à proporção de sequências alinhadas corretamente ao genoma de referência. Tamanho médio das leituras = comprimento médio dos fragmentos de DNA sequenciados. Leituras no alvo (%) = porcentagem de leituras localizadas na região de interesse. Uniformidade = consistência da cobertura ao longo das regiões-alvo. As métricas 1x, 20x, 100x e 500x mostram a porcentagem de bases cobertas por pelo menos 1, 20, 100 ou 500 leituras, respectivamente. Cobertura média = média geral de profundidade de leitura nas regiões analisadas.

4.2.4 Validação das variantes candidatas

A validação das variantes de interesse previamente identificadas pelo painel CCP foi realizada na plataforma de sequenciamento *IonGeneStudio S5 Plus*, utilizando a metodologia de sequenciamento de *amplicon* (Ion Plus Fragment Library Kit). Para isso, foram desenhados *primers* que amplificam a região da alteração de interesse das variantes.

Posteriormente, foi realizada PCR single ou multiplex das variantes e eletroforese em gel de agarose 2% para verificar o sucesso da amplificação. Os produtos de PCR foram purificados utilizando *beads* magnéticas e combinados em um *pool* de amostras (múltiplos alvos) para preparo das bibliotecas. Posteriormente, foi realizada a etapa de reparo das extremidades e ligação de adaptadores e *barcodes*. Em seguida, foi feita nova purificação com *beads* magnéticas e quantificação por qPCR. As amostras foram sequenciadas na plataforma *IonGeneStudio S5 Plus* e as variantes pontuais analisadas no software IGV, sendo confirmadas aquelas variantes em frequência alélica $\geq 2\%$ e cobertas $\geq 1000x$, além dos critérios previamente mencionados.

Além disso, por se tratar de uma abordagem eficaz para amostras de baixa qualidade, as variantes candidatas também foram investigadas em amostras que não haviam sido previamente qualificadas para a análise em painel, permitindo a utilização mais completa da casuística disponível, por meio da avaliação dessas regiões de interesse.

4.2.5 Avaliação da região de *hotspot* de *CTNNB1*

Adicionalmente, para permitir a avaliação na casuística disponível, incluindo as não qualificadas para a análise de painel, foi realizada uma investigação direcionada do éxon 3 do gene da β -catenina (*CTNNB1*), nos códons *hotspot* 41 e 45, bem como no códon 35. O produto de PCR de *CTNNB1* foi gerado utilizando o QIAGEN Multiplex PCR Plus Kit e o sucesso da amplificação foi verificado por eletroforese em gel de agarose a 2%. Para a construção das bibliotecas, foi utilizada a mesma abordagem de sequenciamento de *amplicons* citada anteriormente (Ion Plus Fragment Library Kit). O sequenciamento foi realizado na plataforma Ion GeneStudio S5 Plus, conforme as instruções do fabricante.

4.3 Análise estatística

Os 31 casos foram submetidos a uma análise descritiva, seguida da comparação da presença de mutações nos genes de seguimento pós validação: *KMT2D*, *DNMT3A*, *NOTCH1* e *CTNNB1* entre os diferentes tipos tumorais e entre os grupos benignos e malignos. As associações com características demográficas, clínicas e patológicas foram avaliadas por meio do Teste exato de Fisher-Freeman-Halton, utilizando o software SPSS. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. Adicionalmente, foram realizadas análises de hipótese e avaliação da sobrevida global.

Para a análise de *oncoplot* e *heatmap*, foi utilizado o software RStudio (versão 2025.05.01). As análises de rede de interação proteica e de enriquecimento funcional foram realizadas no software *STRING*, utilizando o plugin Gene Ontology. A inspeção visual das variantes foi conduzida no software IGV, enquanto a visualização da distribuição das variantes nos respectivos genes foi realizada por meio da ferramenta MutationMapper, disponível na plataforma cBioPortal.

5 RESULTADOS

5.1 Casuística

Para a seleção da casuística, consideramos um banco de dados construído em estudos anteriores do grupo, contando com um total de 53 casos. Desses, foram recuperados em nossos arquivos o bloco de parafina de 34 casos, do qual foi possível realizar extração de DNA de 31 casos/amostras.

Todos os casos incluídos nesta casuística foram submetidos a uma revisão prévia por patologistas, com o objetivo de selecionar exclusivamente aqueles que apresentavam características de diferenciação mioepitelial. Os casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico analisados apresentaram uma alta celularidade e evidente componente mioepitelial.

Após as avaliações de qualidade do DNA, das 31 amostras então disponíveis, 15 amostras foram consideradas aptas para o sequenciamento com o painel CCP, devido a critérios estabelecidos como: porcentagem de células tumorais, DIN e massa. Sendo assim, dessas 15 amostras, duas amostras falharam nos padrões das métricas de qualidade na etapa pós sequenciamento, sendo excluídas da análise inicial. Dessa forma, foram obtidos resultados de sequenciamento de 13 amostras: 3 de adenoma pleomórfico, 2 de mioepitelioma, 2 de adenoma de células basais, 3 de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, 2 de carcinoma mioepitelial e 1 adenocarcinoma de células basais.

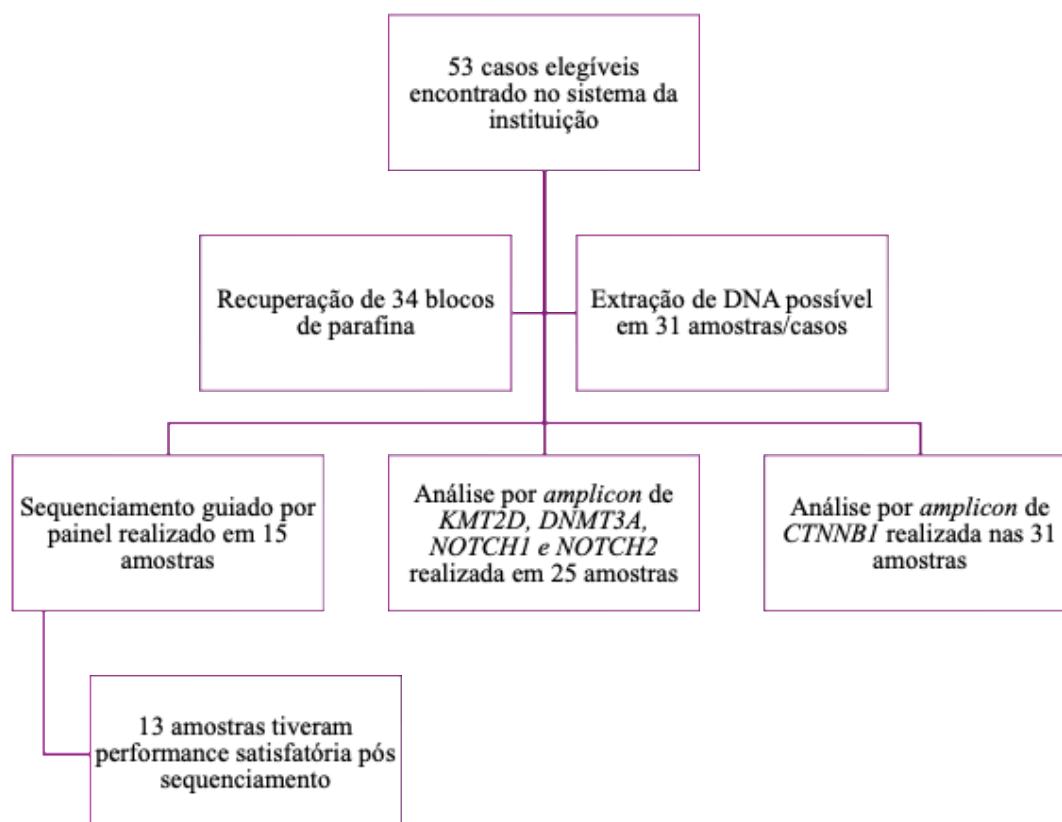
Posteriormente, considerando critérios previamente relatados, como frequência alélica, impacto na proteína, priorização de variantes potencialmente somáticas e sua classificação em bancos de dados, preditores e ferramentas bioinformáticas. Foram consideradas 33 variantes de significado incerto e do tipo *missense*, como potenciais para seguimento e validação. Dessas, selecionamos 5 variantes em 4 genes, após mais estudos relacionados a região de alteração, pesquisa na literatura e potencial de oncogenicidade, para seguimento e validação. Sendo assim, para a etapa de validação, foram selecionadas inicialmente 5 amostras que apresentavam as alterações previamente identificadas no painel CCP.

Paralelamente, com o objetivo de ampliar a casuística, considerando as 31 amostras disponíveis, optamos por realizar a busca dessas mesmas 5 variantes, das regiões específicas em 20 amostras sem resultado do painel CCP, por serem consideradas de menor qualidade para abordagem de painel, mas suficiente para investigação por *amplicon*.

Para a avaliação do gene *CTNNB1* (beta-catenina), como o objetivo foi investigar possíveis alterações em regiões *hotspot*, todas as 31 amostras com DNA disponível foram incluídas e submetidas ao sequenciamento e análise desse gene.

O fluxo de uso das amostras pode ser observado na Figura 9.

Figura 9 - Fluxograma do total de casos disponíveis/utilizados em cada etapa realizada.



Fonte: Autoria própria.

Entre os 31 casos avaliados, 51,6% eram benignos e 48,4% malignos. Em relação aos subtipos tumorais, 25,8% AP, 6,5% MIO, 19,4% ACB, 25,8% CAEX, 12,9% CAMIO e 9,7% ADCB. Do total, 64,5% dos pacientes eram mulheres e 35,5% homens. A média da idade ao diagnóstico foi de 51,26 anos. A glândula parótida foi o local mais acometido, correspondendo a 77,4% dos casos. Os dados demográficos, clínicos e patológicos dos 31 casos estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores benignos e malignos de glândula salivar: adenoma plemórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais, carcinoma ex-adenoma plemórfico, carcinoma mioepitelial e adenocarcinoma de células basais utilizados nas diferentes etapas desse projeto.

Características	Categoria	Adenoma Plemórfico	Mioepitelioma	Adenoma de células basais	Carcinoma ex- adenoma pleomórfico	Carcinoma mioepitelial	continua
							Adenocarcinoma de células basais
Idade (em anos)	≤40	4	1	1	2	0	1
	>40	4	1	5	6	4	2
Sexo	Feminino	5	0	4	5	4	2
	Masculino	3	2	2	3	0	1
Local do tumor	Parótida	6	2	6	6	1	3
	Submandibular	1	0	0	1	1	0
	Glândulas menores	1	0	0	1	2	0
Grau histológico	Baixo	0	0	0	3	3	3
	Intermediário	0	0	0	0	0	0
	Alto	0	0	0	1	1	0
	NI*	8	2	6	4	0	0
Embolia vascular	Sim	-	-	-	0	0	0
	Não	-	-	-	5	1	2
	NI	-	-	-	3	3	1
Invasão Perineural	Sim	-	-	-	1	0	0
	Não	-	-	-	5	1	2

	NI	-	-	-	2	3	1
Linfonodo comprometido	Sim	-	-	-	2	0	0
	Não	-	-	-	4	1	2
	NI	-	-	-	2	3	1
Recidiva	Sim	1	0	0	0	2	0
	Não	3	0	0	7	2	3
	NI	4	2	6	1	0	0
Metástase	Sim	-	-	-	2	0	0
	Não	-	-	-	5	4	0
	NI	-	-	-	1	0	3

*NI = Dado não informado no prontuário. Fonte: Autoria própria.

conclusão

5.2 Avaliação dos resultados do painel CCP

Ao total, considerando todos os casos, 107 alterações foram encontradas após a filtragem inicial na chamada de variantes. Depois, considerando algumas análises preliminares, e novamente, considerando aspectos de qualidade, algumas alterações foram revistas através de inspeção visual dessas regiões e eliminadas as que estivessem em regiões com *Tandem repeat* ou com alto índice de artefatos (alterações, inserções e/ou deleções tipicamente observadas em amostras parafinadas e que não representam a realidade), restando 94 variantes em 79 genes (Figura 10).

Em sua maioria, trata-se de alterações do tipo missense e de classificação “Variante de Significado Incerto” (VUS, do inglês *Variant of Uncertain Significance*) quanto a seu potencial de oncogenicidade. Uma variedade ampla de vias e genes foram observados nos tumores e, de maneira geral, nenhuma alteração recorrente foi observada nos casos avaliados, sendo todas mutações do tipo *missense*.

Ainda assim, dentro dessa identificação de variantes inicial, foi possível verificar que, os casos com maior carga mutacional foram 3 casos benignos (2 mioepiteliomas e 1 adenoma de células basais), como pode ser observado no Oncoplot (Figura 10). Além disso, o gene alterado em mais casos foi o *ADAMTS20* em 23% dos casos, seguido de *EPHB6*, *ITGA10*, *KAT6A*, *NOTCH1*, *PDE4DIP*, *PLEKHG5*, *SYNE1* e *TAF1L* que foram observados em 15% dos casos, sendo as demais variantes observadas em apenas 1 caso cada (8%).

Posteriormente, considerando o contexto dos grupos de tumores objeto desse estudo, e assumindo que não há alterações germinativas ou síndromes associadas ao desenvolvimento de tumores de glândula salivar, foram estabelecidos critérios que selecionassem as variantes potencialmente somáticas, uma vez que nessa casuística não teríamos o leucócito dos pacientes disponíveis para comparação.

Sendo assim, foram filtradas as variantes com Frequência Alélica (F.A.) $\leq 40\%$ ou $\geq 60\%$, verificando quanto a classificação em bancos de dados como Franklin, OncoKB, Cosmic, entre outros e a classe de gene, além de uma avaliação quanto aos potenciais vias de interesse para as neoplasias estudadas e que pudessem impactar o desenvolvimento desses tumores, baseado em informações gerais na literatura.

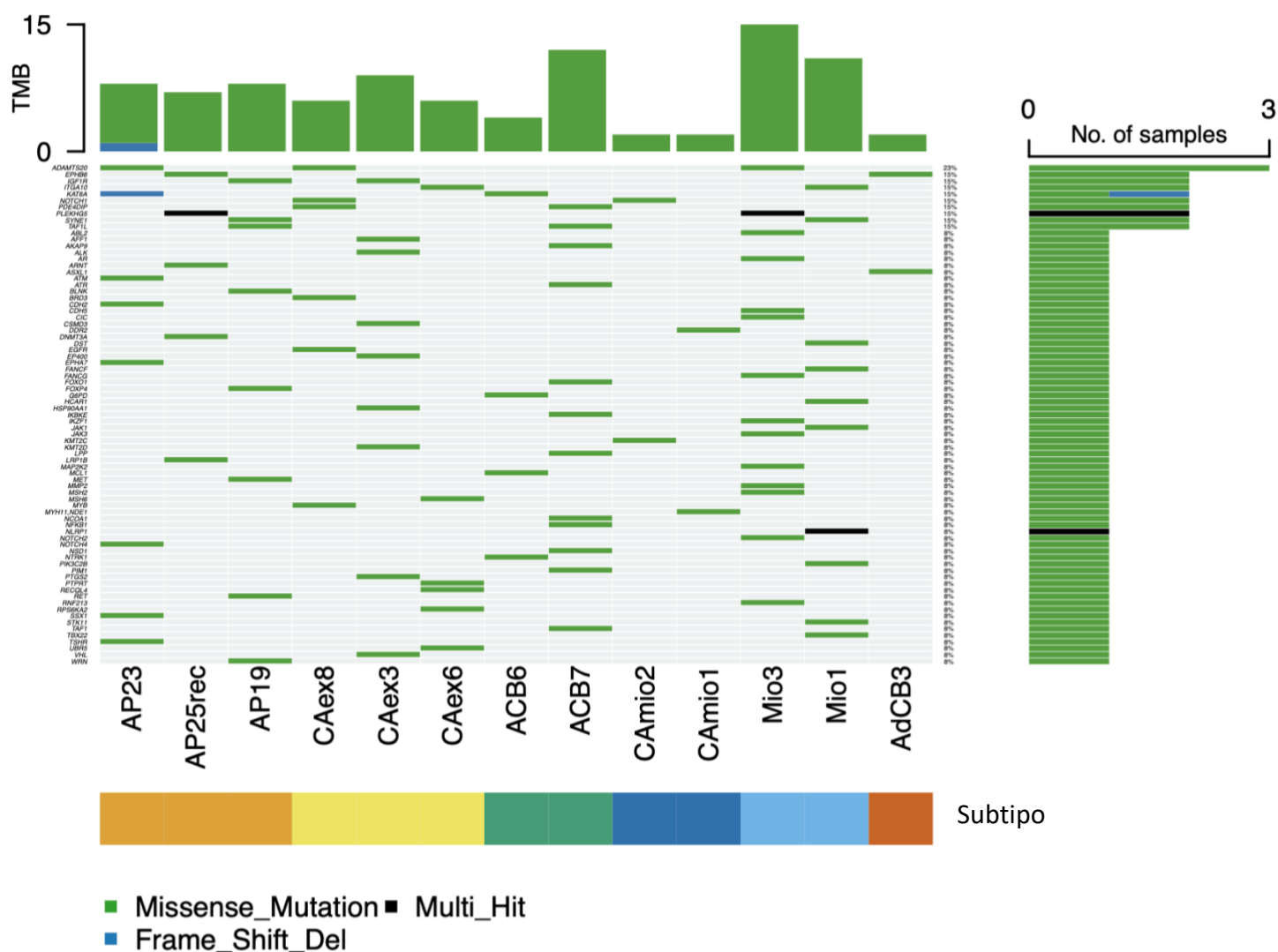
O critério de busca na plataforma Franklin foi a pesquisa da variante na categoria somática, em neoplasias de glândulas salivares e referência hg19. No OncoKB e Cosmic foi a

identificação da variante e, mediante ao reconhecimento desta na plataforma, foi realizada a busca pelo grupo de “tumores de glândula salivar”.

Dentre as alterações identificadas nesta fase, foram pré-selecionadas um total de 33 variantes nos seguintes genes: *NOTCH1*, *NFKB2*, *VHL*, *KMT2D*, *IGF1R*, *BRD3*, *ADAMTS20*, *PLEKHG5*, *NOTCH2*, *ABL2*, *IKZF*, *IL21R*, *CDH5*, *MAP2K2*, *JAK3*, *AR*, *SYNE1*, *NLRP1*, *TBX22*, *PDE4DIP*, *ARNT*, *DNMT3A*, *RET*, *RECQL4*, *DDR2*, *MYB*, *ADAMTS20*, *RNF213*, *G6PD* e *TAF1L* (informações adicionais na Tabela 2).

Considerando os aspectos mencionados e a rede de interação proteica apresentada na Figura 11, observa-se, na região destacada em vermelho, um grupo de genes funcionalmente relacionados. Nesses genes foram observadas duas variantes em *NOTCH1* (CAEX e CAMIO) e uma variante em *NOTCH2* (MIO), *KMT2D* (CAEX) e *DNMT3A* (AP recidivado). Esses genes exibem evidências de coexpressão e vizinhança gênica, indicando possível correlação funcional entre eles, sendo assim, selecionados para seguimento de validação. Informações detalhadas sobre essas interações podem ser consultadas no link permanente: [STRING - Network](#). Nessa mesma plataforma, foi realizada, baseado em dados gerais da literatura relacionada aos genes, uma análise de enriquecimento biológico, onde é possível observar os principais processos biológicos para os quais o conjunto de genes analisado está associado (apresentado na Figura 12). Os processos com destaque (em azul escuro) são aqueles com maior relevância estatística, como “resposta celular a células tumorais”. Porém, pode-se observar que a maioria dos genes em nossa casuística estão principalmente relacionados com “Regulação positiva do processo de desenvolvimento e de proliferação”.

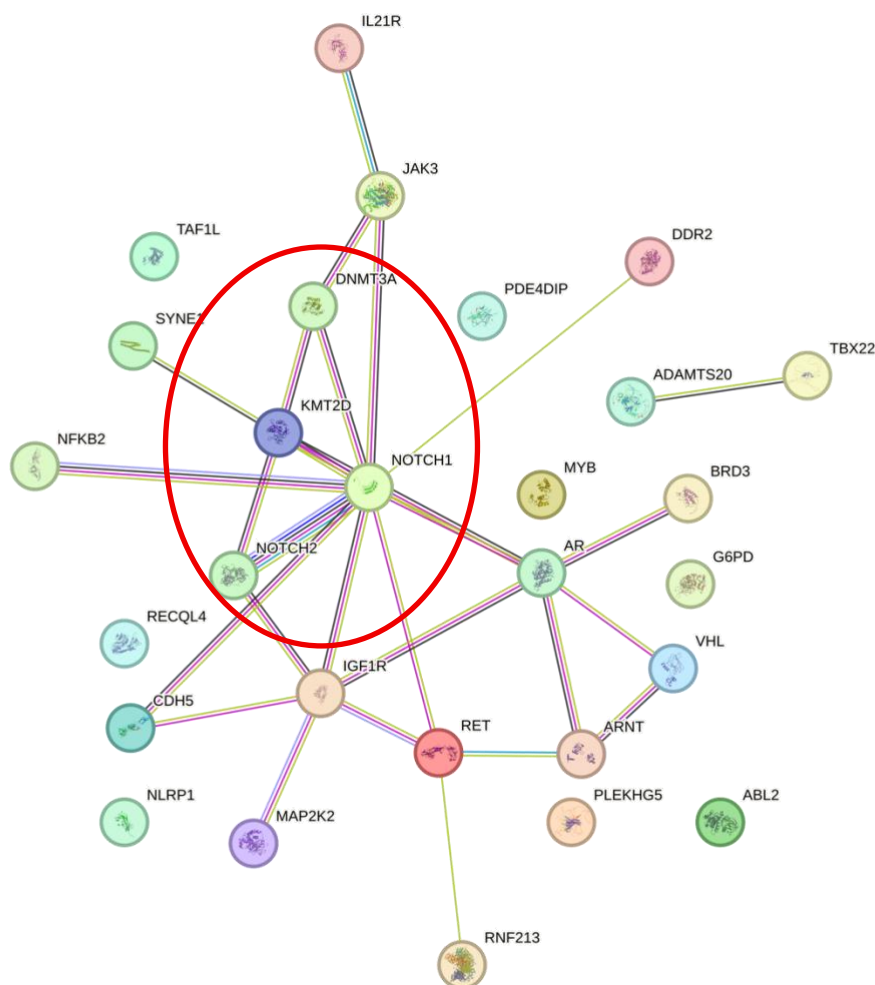
Figura 10 - Perfil mutacional das amostras de tumores de glândula sequenciadas pelo painel CCP.



Fonte: Autoria própria. Análise realizada no software R.

Legenda: Os subtipos indicados são: AP = adenoma pleomórfico (laranja); ACB = adenoma de células basais (verde); MIO = mioepitelioma (azul claro); CAEX = carcinoma ex-adenoma pleomórfico (amarelo); CAMIO = carcinoma mioepitelial (azul escuro) e ADCB = adenocarcinoma de células basais (vermelho). Onde, os casos com maior carga mutacional foram ACB7, Mio1 e Mio3. No gráfico: verde = uma variante do tipo missense; azul = variante do tipo *Frame Shift* e Preto = múltiplas variantes em um mesmo gene no mesmo caso.

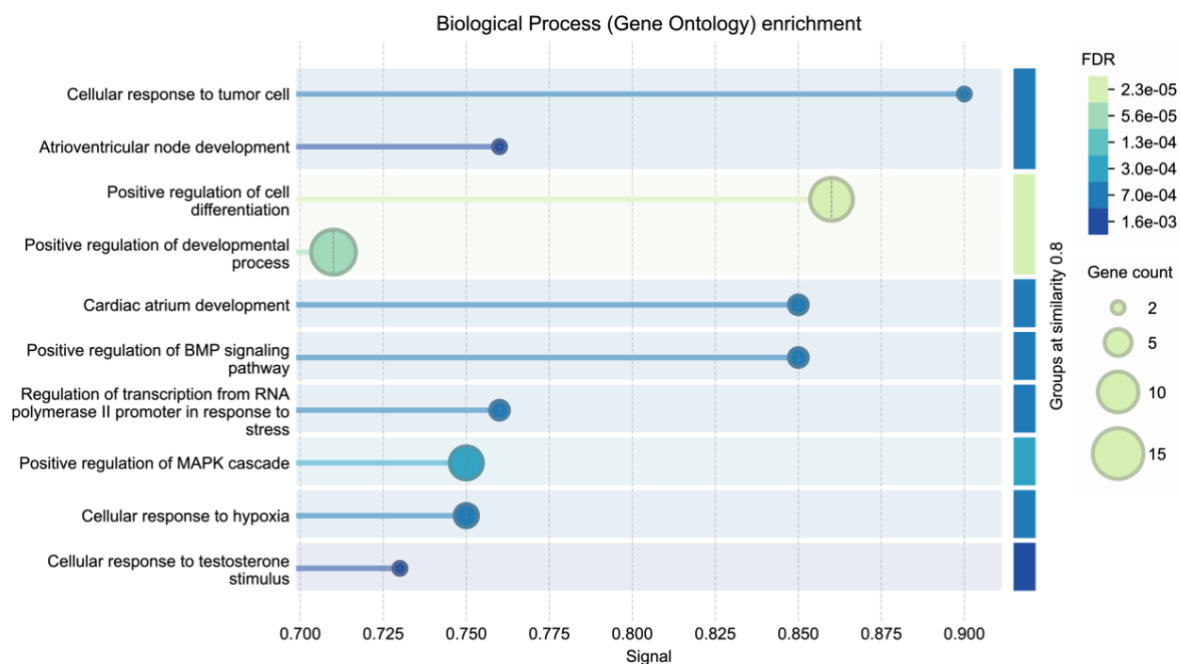
Figura 11 - Rede de interação proteica gerada pelo STRING evidenciando conexões funcionais entre seus principais parceiros moleculares considerando os genes inicialmente identificados nas amostras de tumores de glândula salivar analisadas por sequenciamento guiado por painel. Em vermelho, destacando a interação entre *NOTCH1*, *NOTCH2*, *KMT2D* e *DNMT3A*.



Fonte: Imagem de resultados gerada pelo Software STRING e plugin Gene Ontology. Autoria própria.

Legenda: Rede de interações proteína-proteína gerada com base em evidências funcionais. Cada nó representa uma proteína codificada por um gene; isoformas e modificações pós-traducionais são agrupadas. As arestas indicam associações funcionais: azul claro (bases curadas), magenta (dados experimentais), verde (vizinhança gênica), vermelho (fusões gênicas), azul escuro (co-ocorrência gênica), amarelo (textmining), preto (co-expressão) e lilás claro (homologia proteica).

Figura 12 - Análise de enriquecimento funcional demonstrando as principais vias biológicas associadas ao conjunto de 79 genes identificados com alterações nas amostras de tumores de glândula salivar que realizaram análise de sequenciamento guiado por painel.



Fonte: Imagem de resultados gerada pelo Software STRING. Autoria própria.

Legenda: O gráfico apresenta os principais processos biológicos para os quais o conjunto de genes analisado está associado. No eixo vertical estão as categorias dos processos biológicos, enquanto no eixo horizontal aparece o escore de relevância para cada processo. O tamanho de cada círculo representa a quantidade de genes envolvidos naquela função biológica (círculos maiores indicam mais genes), e a cor reflete o nível de significância estatística (FDR), variando do verde-claro (menor significância) ao azul-escuro (maior significância). Os processos com destaque (em azul escuro) são aqueles com maior relevância estatística, como “resposta celular a células tumorais”. Porém, pode-se observar que a maioria dos genes em nossa casuística estão principalmente relacionados com “Regulação positiva do processo de desenvolvimento”.

Tabela 2 - Perfil das 33 variantes genéticas identificadas por sequenciamento em tumores de glândula salivar consideradas potencialmente somáticas.

continua

Subtipo tumoral	Caso	Gene	Chr:Pos	F.A. (%)	Leituras	Transcrito (NM)	p.	c.
Adenoma pleomórfico	AP19	<i>TAFIL</i>	9:32635307	61%	638	NM_153809.2	p.Gly91Ser	c.271G>A
		<i>RET</i>	10:43595999	37%	260	NM_020975.6	p.Leu56Met	c.166C>A
		<i>IGF1R</i>	15:99251264	38%	181	NM_000875.5	p.Pro190Ser	c.568C>T
Adenoma pleomórfico	A25rec	<i>ARNT</i>	1:150789864	27%	1655	NM_001668.4	p.Asp517Glu	c.1551T>G
		<i>DNMT3A</i>	2:25463286	6%	360	NM_175629.2	p.Arg736His	c.2207G>A
Mioepitelioma	MIO1	<i>SYNE1</i>	6:152545774	38%	126	NM_033071.4	p.Lys7055Arg	c.21164A>G
		<i>NLRP1</i>	17:5424906	34%	232	NM_033004.4	p.Val1241Ile	c.3721G>A
		<i>TBX22</i>	X:79279642	19%	147	NM_001109878.2	p.Pro146Leu	c.437C>T
Mioepitelioma	MIO3	<i>PLEKHG5</i>	1:6530358	16%	134	NM_020631.6	p.Glu580Lys	c.1738G>A
		<i>PLEKHG5</i>	1:6535135	17%	267	NM_020631.6	p.Val92Ile	c.274G>A
		<i>NOTCH2</i>	1:120467982	16%	324	NM_024408.4	p.Thr1486Met	c.4457C>T
		<i>ABL2</i>	1:179077176	20%	162	NM_007314.4	p.Ala1076Thr	c.3226G>A
		<i>IKZF1</i>	7:50367275	16%	397	NM_006060.6	p.Asp28Asn	c.82G>A
		<i>ADAMTS20</i>	12:43819318	73%	783	NM_025003.5	p.Ser1428Leu	c.4283C>T
		<i>CDH5</i>	16:66436866	16%	125	NM_001795.5	p.Asp717Asn	c.2149G>A
		<i>RNF213</i>	17:78341554	62%	413	NM_001256071.3	p.Arg3960Ter	c.11878C>T
		<i>MAP2K2</i>	19:4090612	19%	104	NM_030662.4	p.Thr396Met	c.1187C>T
		<i>JAK3</i>	19:17953887	7%	339	NM_000215.4	p.Arg172Gln	c.515G>A
Adenoma de células basais	ACB6	<i>AR</i>	X:66765589	15%	100	NM_000044.6	p.Ala201Thr	c.601G>A
		<i>G6PD</i>	X:153762360	67%	311	NM_001042351.3	p.Ile220Met	c.660C>G
Adenoma de células basais	ACB7	<i>PDE4DIP</i>	1:144857653	30%	5473	NM_001350520.1	p.Ser2296Cys	c.6887C>G

Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	CAEX3	<i>ALK</i>	2:29416753	40%	380	NM_004304.5	p.Glu1400Asp	c.4200A>C
		<i>VHL</i>	3:10183685	8%	252	NM_000551.4	p.Glu52Lys	c.154G>A
		<i>KMT2D</i>	12:49434634	11%	197	NM_003482.4	p.Val2307Ile	c.6919G>A
		<i>IGF1R</i>	15:99251264	33%	204	NM_000875.5	p.Pro190Ser	c.568C>T
Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	CAEX6	<i>RECQL4</i>	8:145737331	66%	122	NM_004260.4	p.Met1119Thr	c.3356T>C
Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	CAEX8	<i>MYB</i>	6:135520156	63%	338	NM_001130173.2	p.Asp559Glu	c.1677C>A
		<i>BRD3</i>	9:136906967	39%	470	NM_007371.4	p.Arg441His	c.1322G>A
		<i>NOTCH1</i>	9:139399976	76%	153	NM_017617.5	p.Ala1458Thr	c.4372G>A
		<i>ADAMTS20</i>	12:43821128	35%	462	NM_025003.5	p.Tyr1364Asn	c.4090T>A
Carcinoma mioepitelial	CAMIO1	<i>DDR2</i>	1:162741817	66%	548	NM_006182.4	p.Cys503Ser	c.1508G>C
Carcinoma mioepitelial	CAMIO2	<i>NOTCH1</i>	9:139402490	11%	245	NM_017617.5	p.Glu1143Lys	c.3427G>A
		<i>NFKB2</i>	10:104159413	4%	1661	NM_001077494.3	p.Leu473Alafs*32	c.1416_1417delGC

conclusão

Fonte: Autoria própria.

5.3 Validação das variantes selecionadas

Para esta etapa, foram desenhados primers para regiões específicas dos genes *KMT2D*, *DNMT3A*, *NOTCH2* e as duas regiões de *NOTCH1*, a fim de identificar especificamente as variantes previamente identificadas no painel CCP e descritas na Tabela 3.

Em todas as amostras, foi realizada PCR multiplex (utilizando o pool de primers das regiões específicas dos genes selecionados), eletroforese em gel de agarose a 2% e sequenciamento, foi realizada a inspeção visual dos arquivos BAM por meio do software IGV (exemplo apresentado na Figura 13). Nesse ambiente, cada variante foi analisada em sua posição genômica específica, considerando os seguintes critérios: frequência alélica semelhante à observada previamente no painel, cobertura mínima de 1.000 leituras e ausência (ou mínima presença) de artefatos de sequenciamento. A partir dessa análise, foi verificado se a variante correspondia a uma alteração genuína em cada caso.

Nos resultados obtidos, das cinco variantes testadas, apenas duas foram validadas (Tabela 3).

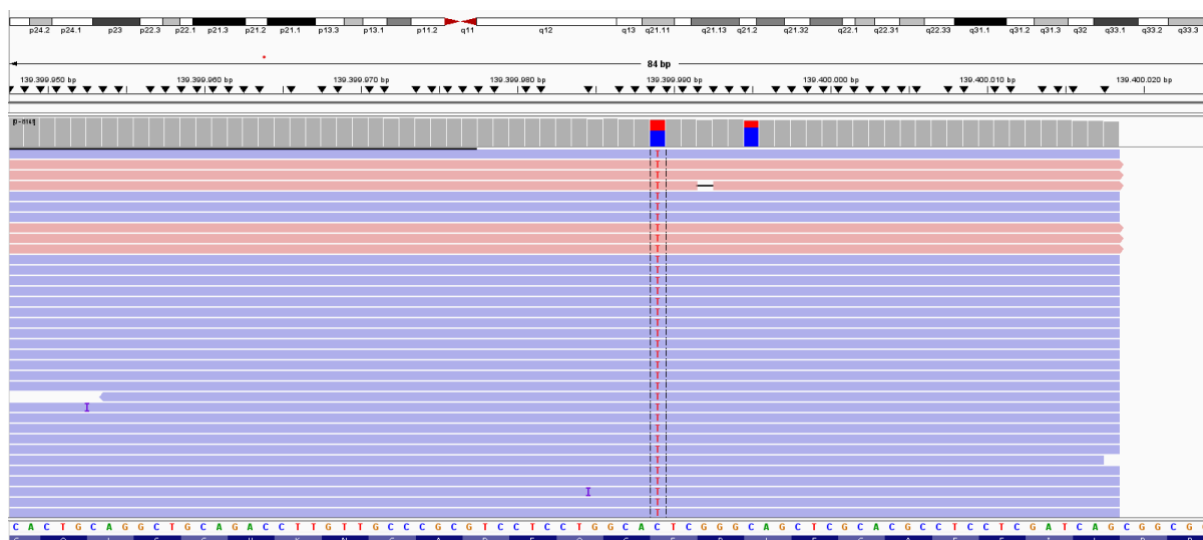
Tabela 3 - Informações gerais das variantes consideradas para validação por *amplicon* e seus resultados no painel e na região alvo.

Casos	Alteração observada no painel CCP			F.A. painel	F.A. <i>amplicon</i>	Resultado
MIO3	<i>NOTCH2</i>	c.4457C>T	p.Thr1486Met	16%	0%	Não validada
CAEX3	<i>KMT2D</i>	c.6919G>A	p.Val2307Ile	11%	0%	Não validada
CAEX8	<i>NOTCH1</i>	c.4372G>A	p.Ala1458Thr	76%	97%	Validada
CAMIO2	<i>NOTCH1</i>	c.3427G>A	p.Glu1143Lys	11%	1.4%	Validada
AP25rec	<i>DNMT3A</i>	c.2207G>A	p.Arg736His	6%	0%	Não validada

Fonte: Autoria própria.

Ambas as variantes de *NOTCH1* foram observadas em casos malignos, sendo um carcinoma ex-adenoma pleomórfico e outro de carcinoma mioepitelial. Ao analisarmos a localização dessas alterações, verificamos que elas se encontram nos éxons 21 e 25, correspondendo aos domínios funcionais *EGF like* e *LNR*, respectivamente (Figura 14). Esses domínios estão situados na região extracelular do receptor codificado por esse gene. Atualmente, para tumores de cabeça e pescoço, são classificadas como Variantes de Significado Incerto e não reportadas no OncoKB, mas quando aplicadas buscas na plataforma *Cancer Genome Interpreter* (CGI), são classificadas como alterações *drivers*, ou seja, tem potencial oncogênico, podendo assim contribuir diretamente para o surgimento ou progressão da neoplasia.

Figura 13 - Exemplo de inspeção visual de alterações observadas nas amostras de tumor de glândula salivar estudadas via análise de *amplicon*. Sendo possível observar um arquivo BAM gerado após sequenciamento sendo analisado no Software IGV a fim de realizar a inspeção visual de maneira manual para validar potenciais mutações encontradas.



Fonte: Autoria própria. Análise realizada no software IGV.

Legenda: A imagem exibe a região do genoma onde uma variante foi identificada, alinhada ao genoma de referência (na parte superior) e acompanhada pelo quadro de códons e pelos aminoácidos correspondentes (na parte inferior). No topo, observa-se a barra de cobertura (em cinza), que ao ser selecionada exibe a profundidade total de sequenciamento e a proporção de leituras para cada base (A, T, C, G). Cada linha horizontal representa uma leitura da região: as leituras no sentido *forward* são mostradas em vermelho, enquanto as leituras no sentido *reverse* aparecem em azul. Bases que diferem do genoma de referência surgem destacadas por cores dentro das leituras, permitindo visualizar claramente o alelo alternativo. A variante analisada está marcada no centro, possibilitando avaliar a consistência do suporte, a qualidade das leituras e sua distribuição entre as duas fitas. Neste exemplo, observa-se uma variante com alta frequência alélica do nucleotídeo T, em uma posição onde o genoma de referência apresenta a base C.

5.4 Identificação das variantes em outros casos

Nesta etapa, considerando que tínhamos muitos casos que não puderam ser submetidos a análise do painel CCP devido a sua baixa quantificação de massa e/ou da integridade do DNA, identificamos na abordagem por *amplicon*, uma oportunidade de ampliar a casuística, pois nesta técnica podemos utilizar amostras de menor qualidade, já que se trata de pesquisa de regiões específicas.

Foram avaliados: 6 casos de adenoma de células basais, 2 casos de adenocarcinoma de células basais, 5 casos de adenoma pleomórfico, 5 casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico e 2 casos de carcinoma mioepitelial. Destes, alguns casos não amplificaram e outros não tiveram nenhuma alteração identificada nas regiões pesquisadas.

Os casos ACB6, CAEX5 e AP25rec apresentaram a mesma variante em *NOTCH1* (p.Glu1143Lys) previamente validada em CAMIO2. E o AP25rec apresentou também a outra variante em *NOTCH1* (p.Ala1458Thr) previamente validada no caso CAEX8.

Ampliando as análises, foram identificadas outras alterações *missenses*, seguindo todos os critérios previamente estabelecidos: frequência alélica, cobertura mínima de leituras, qualidade e uniformidade das leituras nas fitas *forward* e *reverse*.

Dessa forma, foram observadas outras variantes em *NOTCH1*, categorizadas como VUS, nos casos: ACB7 (p.Cys1142Tyr) e CAEX2 (p.Gly1459Asp). Essas variantes também se encontram no domínio funcional EGF like ou LNR pertencentes a região extracelular do receptor. Também foram observados 2 pontos de alterações diferentes no gene *KMT2D*, sendo cada um em um subtipo tumoral, nos casos: AP8 (p.Pro2301Leu) e ACB2 (p.Pro2310Ser), sendo ambas VUS e que por mais que não sejam identificadas em uma região de domínios funcionais conhecidos, no cBioPortal é possível identificar que nessa região do éxon 31 há uma alta taxa de modificações pós traducionais relatadas, principalmente do tipo fosforilação e acetilação.

Dois casos apresentaram variantes em *DNMT3A*, sendo o caso AP8 (p.Arg729Trp) identificada no COSMIC (COSV53036577), considerada driver no CGI, porém VUS para tumores de cabeça e pescoço e inconclusiva no OncoKB. Já no caso ACB3 (p.Arg749Cys), variante classificada como Tier3/provavelmente patogênica na plataforma Franklin, driver pela avaliação no CGI, identificada no COSMIC (COSV53037963) e no ClinVar como patogênica germinativa, porém, os tumores de glândulas salivares não correspondem ao fenótipo esperado causado por essa alteração, que de acordo com os bancos de dados é associada a neoplasias hematológicas. Já no OncoKB para tumores de glândula salivar é anotada como provavelmente oncogênica e com provável perda de função. Sendo as variantes em *DNMT3A* presentes no domínio DNA metilase (éxon 19) que é responsável pela atividade catalítica da enzima codificada.

Foi realizada uma tentativa de agrupar os tumores de acordo com as alterações selecionadas para validação ou identificação, conforme ilustrado na Figura 15. No entanto, devido ao baixo número de variantes detectadas, não foi possível observar uma separação clara entre tumores benignos e malignos, nem entre os diferentes subtipos tumorais, que apresentaram perfis genéticos bastante heterogêneos. Por fim, nenhum dos casos apresentou variantes no gene *NOTCH2* nesta análise por *amplicon* e por este motivo foi excluído da análise

de *Heatmap*. Em resumo, todas as alterações identificadas estão descritas em maior detalhe na Tabela 4, e as respectivas regiões dos domínios dos genes podem ser visualizadas na Figura 14.

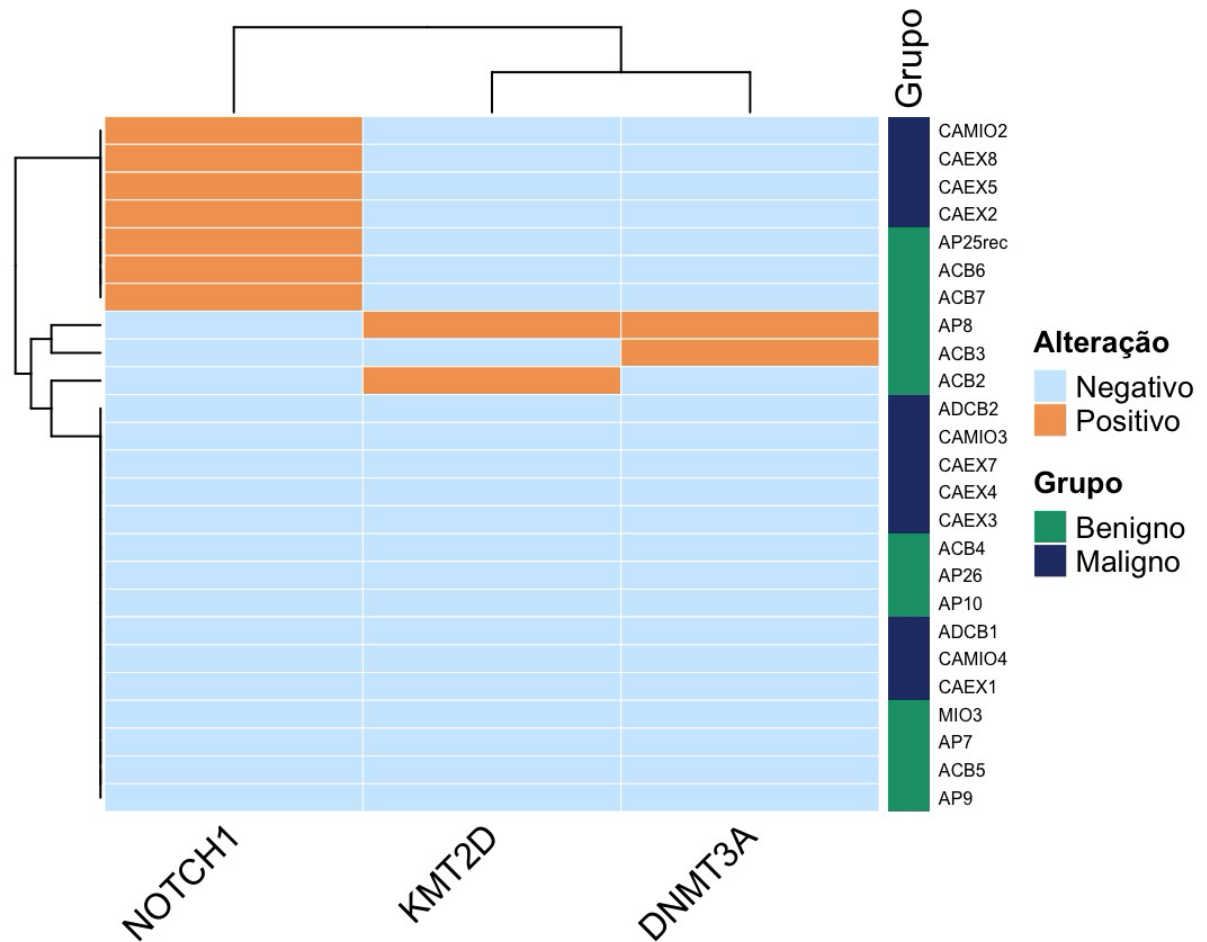
Figura 14 - Distribuição das variantes validadas ou identificadas ao longo das estruturas dos genes *NOTCH1*, *DNMT3A* e *KMT2D*, destacando a localização específica de cada alteração em seu respectivo domínio funcional, éxon correspondente e região da estrutura proteica a que pertence.



Fonte: imagens obtidas no site cBioPortal através da ferramenta *MutationMapper*. Autoria própria.

Legenda: Cada gene é representado com seus principais domínios funcionais, incluindo regiões extracelulares, transmembrana e intracelulares (*NOTCH1*), bem como domínios catalíticos e de reconhecimento de cromatina (*DNMT3A* e *KMT2D*). Os marcadores indicam a posição exata das variantes observadas nos casos analisados, com cores representando o tipo de alteração. Em *NOTCH1*, as variantes concentram-se em domínios relacionados à ativação e regulação da sinalização, enquanto em *DNMT3A* e *KMT2D* as alterações localizam-se em regiões associadas à modulação epigenética.

Figura 15 - *Heatmap* representando o perfil de alterações nos genes *NOTCH1*, *KMT2D* e *DNMT3A* em amostras de tumores benignos e malignos de glândulas salivares que passaram pela análise de *amplicon* e tiveram alguma variante identificada nos genes mencionados.



Fonte: Autoria própria.

Legenda: O agrupamento hierárquico foi realizado com base na similaridade do padrão mutacional entre as amostras e entre os genes. Sendo, laranja = positivo e azul = negativo. Na lateral direita constam os 25 casos que foram analisados, sendo os casos malignos identificados pela cor azul escuro e os casos benignos identificados pela cor verde. Análise realizada no software R.

Tabela 4 - Informações sobre as alterações moleculares identificadas nas regiões de pesquisa por *amplicon* em amostras de tumor de glândula salivar.

Caso	Gene	Chr:Pos	F.A. (%)	Reads	Transcrito (NM)	p.	c.	Franklin + tumores de glândula salivar	OncoKB	CGI
ACB2	<i>KMT2D</i>	chr12-49434625 G>A	94%	2629	NM_003482.4	p.Pro2310Ser	c.6928C>T	VUS	Não identificado	<i>passenger</i>
ACB3	<i>DNMT3A</i>	chr2-25463248 G>A	56%	8439	NM_022552.5	p.Arg749Cys	c.2245C>T	Tier 3/ likely pathogenic	provavelmente oncogênico	<i>driver</i> / patogênica no ClinVar (germinativa)
ACB6	<i>NOTCH1</i>	chr9-139402490 C>T	39%	1931	NM_017617.5	p.Glu1143Lys	c.3427G>A	VUS	Não identificado	<i>driver</i>
ACB7	<i>NOTCH1</i>	chr9-139402492 C>T	10%	1075	NM_017617.5	p.Cys1142Tyr	c.3425G>A	VUS	Não identificado	<i>driver</i>
AP25rec	<i>NOTCH1</i>	chr9-139402490 C>T	15%	1847	NM_017617.5	p.Glu1143Lys	c.3427G>A	VUS	Não identificado	<i>driver</i>
AP25rec	<i>NOTCH1</i>	chr9:139399976 C>T	7%	4812	NM_017617.5	p.Ala1458Thr	c.4372G>A	VUS	Não identificado	<i>passenger</i>
AP8	<i>KMT2D</i>	chr12-49434651 G>A	33%	4249	NM_003482.4	p.Pro2301Leu	c.6902C>T	VUS	Não identificado	<i>NI</i>
AP8	<i>DNMT3A</i>	chr2-25463308 G>A	23%	15466	NM_022552.5	p.Arg729Trp	c.2185C>T	VUS	Inconclusivo	<i>driver</i>
CAEX2	<i>NOTCH1</i>	chr9-139399972 C>T	21%	15247	NM_017617.5	p.Gly1459Asp	c.4376G>A	VUS	Não identificado	<i>passenger</i>
CAEX5	<i>NOTCH1</i>	chr9-139402490 C>T	14%	6500	NM_017617.5	p.Glu1143Lys	c.3427G>A	VUS	Não identificado	<i>driver</i>

Fonte: Autoria própria.

5.5 Avaliação do gene *CTNNB1*

Estudo anterior do grupo já havia avaliado a expressão imunoistoquímica da beta-catenina e, nesta etapa do projeto, foi avaliada a presença de alterações moleculares no gene *CTNNB1* que codifica a proteína beta-catenina. Assim, foi avaliado o éxon 3 do gene *CTNNB1*, por se tratar de uma região conhecida por concentrar *hotspots* mutacionais.

Na literatura, a alteração c.104T>C presente no códon 35 deste gene, vem sendo estudada e associada a expressão diferencial em casos de adenoma de células basais. Mesmo ainda sendo classificada como VUS, sua classificação no OncoKB (no mesmo códon) é como provavelmente oncogênica e com ganho de função.

No presente estudo, foram avaliados os 31 casos disponíveis, dos 6 subtipos tumorais da casuística (todas as variantes consideradas encontram-se com detalhes na Tabela 5). Através das análises, foi possível detectar a presença da variante p.Ile35Thr em 3 dos 6 casos de adenoma de células basais avaliados. Além disso, 1 caso de adenocarcinoma de células basais apresentou a mesma variante. Os casos com esta alteração apresentaram expressão nuclear da proteína por IHQ (também observada no estroma tumoral) e padrão membrana descontínuo, além de estarem abundante em todos os casos por toda a área tumoral.

Algumas variantes diferentes foram observadas em outros subtipos tumorais da casuística. Dois casos de adenoma pleomórfico apresentaram a variante c.101G>A no códon 34 e classificada no OncoKB como provavelmente oncogênica e com provável ganho de função. Quanto a expressão em IHQ desses casos, um dos casos apresentou marcação fraca e focal na área tumoral, enquanto o outro foi negativo. Um outro caso de adenoma pleomórfico apresentou uma variante stop códon (c.74G>A) no códon 25 classificada como VUS e não reportada no OncoKB.

Ainda nessa situação de classificação VUS e não previamente reportadas no OncoKB, temos algumas variantes diferentes identificadas em nossa casuística: um caso de mioepitelioma apresentou uma variante c.115G>A presente no códon 39. Em um caso de carcinoma ex-adenoma pleomórfico foi observada a variante c.119C>T presente no códon 40. E um caso de carcinoma mioepitelial a variante c.59C>T no códon 20. Todas as variantes identificadas foram observadas no éxon 3 do gene, sendo que os casos de adenoma pleomórfico apresentaram uma variante de *CTNNB1* considerada como provavelmente oncogênica.

Tabela 5 - Informações gerais das variantes observadas no gene *CTNNB1*.

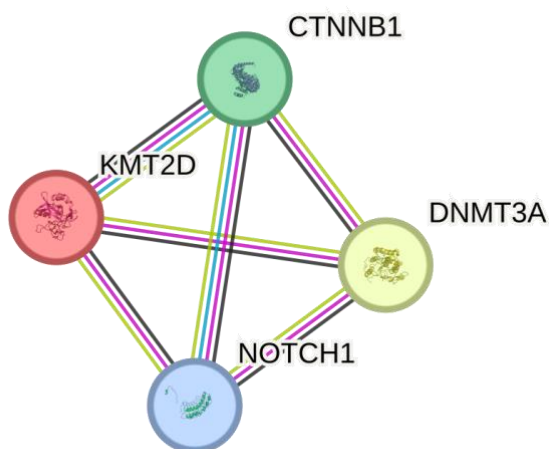
Caso	Chr:Pos	HGVS c.	HGVS p.	VAF (%)	Cobertura	NM	OncoKB
AP7	chr3:41266077	c.74G>A	p.Trp25*	5%	424254	NM_001904.4	NI
AP8	chr3:41266104	c.101G>A	p.Gly34Glu	20%	52854	NM_001904.4	provavelmente oncogênico
AP9	chr3:41266104	c.101G>A	p.Gly34Glu	40%	61964	NM_001904.4	provavelmente oncogênico
MIO3	chr3:41266118	c.115G>A	p.Ala39Thr	9%	811694	NM_001904.4	NI
ACB3	chr3:41266107	c.104T>C	p.Ile35Thr	27%	4470	NM_001904.4	provavelmente oncogênico
ACB6	chr3:41266107	c.104T>C	p.Ile35Thr	36%	130006	NM_001904.4	provavelmente oncogênico
ACB7	chr3:41266107	c.104T>C	p.Ile35Thr	29%	152575	NM_001904.4	provavelmente oncogênico
CAEX1	chr3:41266122	c.119C>T	p.Thr40Ile	42%	66560	NM_001904.4	NI
CAMIO4	chr3:41266062	c.59C>T	p.Ala20Val	2%	37619	NM_001904.4	NI
ADCB1	chr3:41266107	c.104T>C	p.Ile35Thr	28%	80040	NM_001904.4	provavelmente oncogênico

Fonte: Autoria própria.

Legenda: na tabela constam informações como posição cromossômica das variantes, as informações de troca de base e aminoácido, frequência alélica da variante, cobertura no sequenciamento, o transcrito (NM) e a classificação da variante no banco de dados OncoKB, sendo NI = não identificado/Não reportado.

Considerando os genes com alterações validadas (*DNMT3A*, *KMT2D* e *NOTCH1*) em conjunto com o gene *CTNNB1*, foi realizada uma análise de interação proteína-proteína, sendo possível verificar que todos apresentam interações entre si, apresentando coexpressão e vizinhança gênica (Figura 16). Dentre os casos com alterações em *NOTCH1*, dois casos de adenoma de células basais apresentaram variantes identificadas em *NOTCH1* e *CTNNB1* concomitantemente, curiosamente, nenhum caso maligno apresentou essa co-ocorrência. Os dois casos que apresentaram alteração em *DNMT3A* também apresentaram alteração em *CTNNB1*. E um dos dois casos com variante identificada em *KMT2D* também apresentou alteração em *CTNNB1*.

Figura 16 - Rede de interação proteica gerada pelo STRING evidenciando conexões funcionais entre *NOTCH1*, *KMT2D*, *DNMT3A* e *CTNNB1*.



Fonte: Imagem de resultados gerada pelo Software STRING. Autoria própria.

Legenda: As arestas indicam associações funcionais: azul claro (bases curadas), magenta (dados experimentais), verde (vizinhança gênica), vermelho (fusões gênicas), azul escuro (co-ocorrência gênica), amarelo (textmining), preto (co-expressão) e lilás claro (homologia proteica).

5.6 Dados da análise estatística

Quanto às alterações moleculares, 6,5% dos casos avaliados apresentaram variantes em *KMT2D*, 22,6% em *NOTCH1*, 6,5% em *DNMT3A* e 32,3% em *CTNNB1*.

Quanto aos dados demográficos, clínicos e patológicos foi possível observar que a idade ao diagnóstico não apresentou a mesma distribuição entre os casos com e sem alterações nos genes *KMT2D* e *DNMT3A*. Observou-se diferença estatisticamente significativa para ambos ($p=0,047$ e $p=0,032$, respectivamente), indicando que as alterações nesses genes ocorreram predominantemente em pacientes com mais de 70 anos.

Observou-se diferença estatisticamente significativa entre o estado atual do paciente e a presença ou ausência de alteração em *NOTCH1* ($p = 0,015$). Nesse caso, a presença da variante esteve associada a pior desfecho clínico.

Na análise de sobrevida global, foi observada diferença significativa ($p=0,012$) entre os casos com e sem alteração em *NOTCH1* considerando a casuística total. Os pacientes que apresentaram variantes nesse gene evoluíram desfavoravelmente. As demais análises envolvendo dados clínicos, patológicos e demográficos não apresentaram significância estatística.

6 DISCUSSÃO

Os tumores de glândulas salivares, especialmente aqueles originados no ducto intercalar, constituem um grupo heterogêneo de neoplasias caracterizado por ampla diversidade arquitetural e morfológica. Esses tumores apresentam presença parcial ou completa de células mioepiteliais, que, na literatura, são descritas como células de comportamento dual, podendo atuar tanto como supressoras quanto como promotoras da progressão tumoral através da secreção de citocinas e fatores de crescimento, bem como a produção de matriz extracelular e proteínas atuantes como supressores tumorais (inibidores de proteinase e fatores anti-angiogênese) (Ianez et al. 2010; Chitturi et al. 2015; Shah et al. 2016). Consequentemente, essas células são frequentemente apontadas como potenciais células pluripotentes da glândula salivar e, portanto, possivelmente responsáveis por grande parte dessa diversidade (Shah et al. 2016; de Paula et al. 2017).

Diante desse cenário, surge uma dúvida recorrente na literatura: esses tumores representam entidades realmente distintas ou seriam composições morfológicas distintas dentro de um mesmo espectro tumoral? Em um estudo prévio realizado pelo nosso grupo, que buscou identificar um perfil imunoistoquímico capaz de auxiliar nessa diferenciação, foi observado um padrão de expressão distinto entre tumores benignos e malignos, embora não tenha sido possível diferenciar subtipos. Na sequência, com o objetivo de aprofundar a compreensão dos mecanismos envolvidos na composição tumoral e de refinar a busca por um perfil que indicasse se esses subtipos compartilham características comuns, conduzimos o presente estudo para investigar o perfil molecular desses tumores.

Primeiramente, foi realizada uma análise exploratória em 13 casos de tumores de glândula salivar do ducto intercalar utilizando o painel CCP contendo 409 genes frequentemente associados ao câncer. Essa análise revelou um conjunto diversificado de alterações genéticas nos tumores de glândulas salivares, contando com a predominância de mutações do tipo missense e classificadas como de significado incerto (VUS) nos bancos de dados consultados. Esses fatores geram complexidade na interpretação funcional dessas variantes, especialmente quando observadas em neoplasias raras como as de glândulas salivares, com poucas informações na literatura.

Foram observadas 94 alterações em 79 genes, mas não foi observado nenhum padrão de alteração ou mutação recorrente nos casos estudados, o que reforça a ideia da diversidade de genes e vias afetadas refletindo a heterogeneidade biológica desses tumores e sugerindo que

possam representar espectros diferentes de um único tipo tumoral. Os casos que apresentaram maior carga mutacional, foram tumores benignos (adenoma de células basais e mioepitelioma), geralmente considerados de comportamento menos agressivo e de crescimento lento. Esses tumores representam os dois extremos da participação mioepitelial em sua composição histológica tumoral.

Considerando a literatura atual, pode-se verificar de maneira sintetizada o que se sabe sobre as alterações moleculares no artigo publicado por Skálová e colaboradores (2022) que relata uma atualização geral quanto aos parâmetros atualmente recomendados no diagnóstico diferencial dos tumores de glândula salivar, feita pela WHO, detalhando os critérios patológicos e genéticos. Relacionados ao grupo de tumores foco desse estudo, pode-se observar: em adenoma pleomórfico Fusões/amplificação *PLAG1* com prevalência de >50% e Fusões/amplificação de *HMGA2* com prevalência de 10-20%. Em adenoma de células basais mutações *CTNGB1* (prevalência de 37–80%), mutações *CYLD* (prevalência de 36%) e as com menos de 10% de prevalência está identificação de mutação em *AXIN1* e *APC*. Em mioepitelioma (de subtipo oncocítico) fusão *PLAG1* tem a prevalência média de 40%. Em carcinoma ex-adenoma pleomórfico Fusões/amplificação *PLAG1* são de maior prevalência (73%) e é seguida por Fusões/amplificação de *HMGA2* (prevalência de 14%) e mutações *TP53* tem prevalência correspondente a 60%. Em adenocarcinoma de células basais a mutações *CYLD* é citada com uma prevalência de 29%. E por fim, em carcinoma mioepitelial as fusões *PLAG1* tem prevalência de 38% e Rearranjo *EWSR1* corresponde a uma média de 13%.

Ao observarmos os marcadores destacados para cada subtipo, podemos ver que, a maioria se concentra em fusões ou rearranjos e que não há uma ou um conjunto de alterações específicas para tipo tumoral, onde, na verdade, observamos a repetição (como por exemplo, de *PLAG1*) em mais de um subtipo, o que reforça a necessidade de mais estudos, para melhor entendimento de potenciais alterações nessas neoplasias.

Na segunda etapa do estudo, selecionamos algumas das variantes identificadas (nos genes *KMT2D*, *DNMT3A*, *NOTCH1* e *NOTCH2*) para validação utilizando PCR multiplex e sequenciamento de *amplicon* das regiões específicas alteradas.

A análise por *amplicon* revelou que apenas as variantes em *NOTCH1* puderam ser efetivamente validadas. De modo geral, observamos que menos da metade dos casos apresentou alguma variante validada ou identificada, sendo a maioria em tumores benignos, especialmente nos genes *KMT2D* e *DNMT3A*. Em contraste, *NOTCH1* foi o gene com o maior número de variantes identificadas, incluindo aquelas previamente detectadas no painel CCP e confirmadas

na análise por *amplicon*. Já para *NOTCH2*, nenhuma variante foi validada, e não foram identificadas novas alterações nas análises subsequentes. Neste contexto, foram exploradas informações relacionadas especialmente a *KMT2D*, *DNMT3A*, *NOTCH1* e adicionalmente na região *hotspot* de *CTNNB1*.

O gene Lisina Metiltransferase 2D (***KMT2D***) é codificador de uma metiltransferase de histonas relacionada a lisina 4 da histona H3 (H3K4me1), sendo assim, envolvido com a regulação epigenética e controle transcricional. Em condições fisiológicas, este gene participa da ativação gênica por meio da deposição de marcas ativadoras em potenciadores (ativação das regiões de metilação, por exemplo), promovendo o recrutamento de coativadores transcricionais como p300/CBP e facilitador para o acesso da RNA polimerase II. Além disso, atua em complexos multiproteicos, promovendo a remoção de marcas repressivas e garantindo o equilíbrio entre ativação e repressão transcricional (Wang et al. 2016; Froimchuk et al. 2017). Porém, no contexto tumoral, mutações em *KMT2D* tem sido associada a alterações epigenéticas significativas, como por exemplo, a redução global de H3K4me1/2, desorganização de potenciadores, e com sua perda, o silenciamento de genes envolvidos na diferenciação celular e no controle do ciclo celular (Wang et al. 2016; Froimchuk et al. 2017).

Por mais que não haja estudos relacionados aos tumores avaliados neste estudo, um outro subtipo tumoral (carcinoma adenoide cístico) apresenta mutações neste gene em cerca de 9-15% dos casos, sendo frequentemente associadas à progressão tumoral e a perfis genéticos de tumores recorrentes e metastáticos (Ho et al. 2019). O carcinoma adenoide cístico também se origina no ducto intercalar da glândula salivar. Estudo recente identificou que mutações em *KMT2D* e outros genes de remodelamento da cromatina em tumores metastáticos de glândulas salivares, sugerindo seu papel na agressividade tumoral (Ho et al. 2019). O estudo de Liu et al. (2024) demonstra que a perda da metiltransferase de histonas *KMT2D*, no carcinoma de células escamosas, contribui para a progressão tumoral ao intensificar a glicólise aeróbica e ao reprogramar o estado epigenético de genes da via de reparo de DNA Fanconi/BRCA. Sendo assim, sob restrição glicolítica ou tratamento com 2-DG, a deficiência de *KMT2D* leva à redução da expressão desses genes, associada a alterações em marcadores de cromatina ativa em promotores e *enhancers*, levaria a disfunção da via de reparo e aumento da sensibilidade a medicação como cisplatina e MMC, bem como a inibidores de PARP. Um estudo recém-publicado e realizado por Wang e colaboradores (2025) sobre o papel do *KMT2D* em tumores de cabeça e pescoço destaca a importância de entender o papel deste gene no contexto tumoral relacionado, visto que sua função poderá variar significativamente entre diferentes tipos de

tumores. Em alguns tipos, como o de mama, sua alta expressão pode promover a progressão da neoplasia, enquanto para câncer de bexiga a alta expressão pode suprimir a progressão. Considerando os exemplos dados, torna-se importante ter a atenção para classificar e analisar os papéis específicos das mutações do *KMT2D* nos diferentes tipos de câncer.

O gene *DNMT3A*, é codificador da enzima DNA metiltransferase 3 alfa, responsável por adicionar grupos metil ao DNA e silenciar alvos específicos. Gerando potencial de modificação epigenética através de metilação de CpG (Tajima et al. 2022). Variantes neste gene são amplamente estudadas em neoplasias hematológicas, mas seu papel em tumores sólidos ainda está sendo explorado, dentre eles, os tumores carcinoma adenoide cístico e mucoepidermoide de glândula salivar (Manou et al. 2023; Magno Guimarães et al. 2020). Em nossa casuística identificamos duas variantes neste gene, que são consideradas drivers e com potencial de oncogenicidade, mas ambas foram em neoplasias benignas.

Na literatura, embora estudos específicos sobre *DNMT3A* em câncer de glândula salivar sejam limitados, pesquisas em outros tipos de câncer, como a leucemia mieloide, sugerem que mutações em *DNMT3A* podem contribuir para a progressão tumoral, pior prognóstico e resistência a tratamentos, indicando a necessidade de investigações adicionais nesse contexto (Tang et al. 2017). Outro estudo, como o de Magno Guimarães e colaboradores (2020) também realizado em carcinoma mucoepidermoide, observou a imunoeexpressão diferencial de *DNMT1*, *DNMT3A* e *DNMT3B* e que estaria significativamente associada ao aumento da proliferação celular. Manou e colaboradores (2023) encontraram níveis aumentados de mRNA de *DNMT3A* em casos de carcinoma adenoide cístico, sendo relacionado ao estabelecimento de novas marcas de metilação, inativando a expressão gênica, mas ainda assim sem mais informações das implicações dessas alterações em tumores de glândula salivar.

Para este gene, observamos variantes em nossa casuística nos subtipos adenoma pleomórfico e adenoma de células basais o que, considerando as informações da literatura relacionadas ao potencial da perda de função deste gene, poderia representar um potencial auxílio na plasticidade e diferenciação das células desses tumores contribuindo para amplitude morfológica e comportamento clínico. Mas o contexto por completo das possíveis correlações de funcionalidade na participação da progressão tumoral necessita de estudos mais aprofundados. É importante ressaltar que, esses achados tratam de tumores com diferenciação mioepitelial e essas células têm alto potencial de diversidade morfológica e comportamento dual (que pode ser protetivo ou agressivo) no ambiente tumoral, como mencionado na revisão de Scarini e colaboradores (2021).

Os genes *NOTCH1* e *NOTCH2* fazem parte da via de sinalização Notch, crucial na regulação da diferenciação celular e desenvolvimento tumoral, tendo um papel dual, podendo agir como supressor tumoral ou oncogene, a depender do seu contexto e alteração.

Em nossa casuística, nenhuma variante foi validada ou identificada em *NOTCH2*, enquanto *NOTCH1* foi o gene que apresentou o maior número de variantes dentre os genes selecionados previamente por identificação no painel, porém sem um padrão específico de distribuição entre os subtipos tumorais, sendo observadas em casos de adenoma de células basais, adenoma pleomórfico, carcinoma ex-adenoma pleomórfico e carcinoma mioepitelial.

O gene *NOTCH1* tem sido amplamente estudado em glândulas análogas, como mama e lacrimal, e, entre os tumores de glândulas salivares, destaca-se por sua investigação em carcinoma adenoide cístico (CAC), no qual, mutações são relatadas em aproximadamente 20% dos casos. Esses achados reforçam o potencial de *NOTCH1* como alvo para a exploração de fatores prognósticos e terapêuticos, especialmente considerando que pacientes com neoplasias de glândulas salivares ainda carecem de opções sistêmicas de tratamento eficazes e bem estabelecidas.

Neste sentido, alguns estudos presentes na literatura atual demonstram que, mutações ativadoras em *NOTCH1* estão associadas a subgrupos de carcinoma adenoide cístico (CAC) com prognóstico desfavorável e tendência a metástases ósseas e hepáticas (Ferrarotto et al. 2017). Ou que a superexpressão de *NOTCH1* está associada a maior risco de metástase e recorrência (Li et al. 2014). Outros estudos demonstraram que a ativação da via Notch está presente em aproximadamente 40% dos casos de CAC recorrentes ou metastáticos, correlacionando-se com pior sobrevida global (Ferrarotto et al. 2022; Parikh et al. 2022). Além disso, a sinalização Notch influencia a diferenciação das células mioepiteliais nas glândulas salivares, sendo a inibição dessa via associada à manutenção de características mioepiteliais (Yasuhara et al. 2022).

No estudo de Ho e colaboradores (2018), mutações em *NOTCH1* foram identificadas em 26% dos casos recorrentes/metastáticos de carcinoma adenoide cístico, enquanto apenas 8,5% dos tumores primários apresentaram essas alterações, sugerindo um papel na progressão tumoral (Ho et al. 2018). Ainda no estudo realizado por Ho e colaboradores, é mencionada uma possível colaboração entre *NOTCH1* e vias de remodelamento da cromatina devido a alteração em genes chave como o caso do *KMT2D* para a progressão tumoral.

Um estudo recém-publicado por Church e colaboradores (2025), realizou o sequenciamento de genoma completo (WGS) em pacientes com câncer de glândula salivar que

tiveram recorrência ou metástase. Foram utilizados nove casos de carcinoma adenoide cístico, e um caso de cada subtipo, sendo: adenoide cístico/adenocarcinoma sem outras especificações, carcinoma ex-adenoma pleomórfico (subtipo ducto salivar), carcinoma mioepitelial de células claras e mioepitelial, epitelial e de carcinoma de células acinares. Dentre os resultados, foi possível observar que a maioria dos casos apresentou rearranjos ou fusões, e muitas alterações somáticas em genes de modificação de histona e vias de remodelamento da cromatina e que alterações em *NOTCH1* demonstraram ser exclusivas. Além disso, após as informações fornecidas pelo sequenciamento de genoma completo, três neoplasias foram reclassificadas como o diagnóstico diferencial do adenoide cístico/adenocarcinoma sem outras especificações, que foi reclassificado como carcinoma mioepitelial de alto grau, gerando uma alteração na conduta terapêutica causando benefícios significativos ao paciente. Isso demonstra a importância do estudo genômico e da medicina de precisão em casos de tumores raros, como os de glândula salivar e o estudo genômico.

No presente estudo, curiosamente, as alterações em *NOTCH1* também foram exclusivas quando comparadas com alterações relacionadas a *KMT2D* e *DNMT3A*. Outro ponto que se destaca, é a presença de características específicas dentre os casos que apresentaram variantes em *NOTCH1*: o caso CAMIO2 apresentou recidiva tumoral, enquanto o caso AP25rec, trata-se de um tumor benigno recidivado, sendo este, portador de ambas as variantes em *NOTCH1*.

Além disso, outras variantes no mesmo gene foram observadas nos casos CAEX2 e CAEX8, localizadas no mesmo códon, mas resultando em substituições de aminoácidos distintas. Ambos os casos apresentaram características clínicas e patológicas sugestivas de maior agressividade tumoral: em CAEX2, houve invasão perineural e comprometimento de linfonodo, enquanto em CAEX8 foi observada metástase. Este último caso é particularmente interessante, pois inicialmente se tratava de um carcinoma *in situ*, que, ao longo dos anos, demonstrou progressão para um comportamento de alto grau. Essas observações juntamente com os dados estatísticos, sugerem que as mutações em *NOTCH1* podem estar associadas a mecanismos de progressão tumoral em outros subtipos além do CAC. Embora, sejam necessários estudos complementares e o uso de outras abordagens metodológicas para confirmar e aprofundar a compreensão dessas possíveis associações.

O gene *CTNNB1* apresenta alterações associadas a diversos tipos de câncer, e que ocorrem tipicamente no éxon 3, geralmente sob a forma de mutações do tipo missense. Essas mutações afetam os sítios consenso de fosforilação da GSK3 β , especificamente em uma região essencial para a interação com o domínio de ubiquitinação que regula a degradação da beta-

catenina acumulada no citoplasma, e o não cumprimento desta ação, causada por alterações, levam a acúmulo no núcleo, resultando na ativação aberrante da via canônica de sinalização Wnt/ β -catenina ao atuar como fator de transcrição e regulando genes envolvidos com a proliferação e sobrevivência celular. Essas mutações têm sido amplamente descritas em câncer colorretal e endometrial, onde estão associadas a maior risco de recorrência e progressão tumoral (Johnson et al., 2005; Kurnit et al., 2017; Yu et al., 2021).

Inicialmente, buscamos mutações *hotspot* nos códons 35, por ter sido previamente descrito na literatura como expressão diferencial em adenoma de células basais, 41 e 45, por serem bem conhecidos e reportados como oncogênicos e ganho de função. Porém, além de algumas variantes de significado incerto, foi observada uma variante presente no códon 34 relatada como provavelmente oncogênica e com ganho de função, em adenoma pleomórfico. Esse achado poderia representar eventos iniciais na ativação da via Wnt, contribuindo potencialmente para a manutenção do fenótipo mioepitelial ou para etapas iniciais da tumorigênese.

Na literatura, a mutação I35T é associada com o adenoma de células basais, o que poderia auxiliar no diagnóstico diferencial do adenocarcinoma de células basais. Esses dados de literatura, identificaram a presença da mutação I35T associada à expressão nuclear na imunoistoquímica. Porém, os impactos dessa relação e se há alguma relevância prognóstica para esses pacientes ainda é incerto e necessita de maior aprofundamento dessas informações (Kawahara et al. 2011; Wilson et al. 2016; Tesdahl et al. 2016; Jo et al. 2016; Sato et al. 2018; Oyama et al. 2018; Lee et al. 2018; Oh & Hong, 2023).

Um estudo recente por Mitani e colaboradores (2025) realizou um comparativo entre adenoma de células basais e adenocarcinoma de células basais por análise transcriptômica sugerindo que apenas *CTNNB1* e *CYLD* não conseguiriam diferenciar esses tumores, sendo assim, através de suas análises de RNA indicam a separação entre graus e não como tumores diferentes, sendo então neoplasias de células basais salivares grau I ou II a depender do perfil encontrado no estudo deles.

Por tratar-se de neoplasias raras e pouco estudadas devido a dificuldades de construção de casuísticas expressivas, existem poucos dados para comparar na literatura. Em uma busca no PubMed por estudos realizados entre 2020-2025, pesquisando sobre a aplicação de NGS nas mais diversas neoplasias de glândula salivar, foram encontrados 95 artigos publicados. No que se trata dos mesmos subtipos dessa casuística, separadamente, um total máximo de 12 artigos foram observados até o momento, sendo que nenhum deles está focado no mesmo contexto

deste estudo. É importante ressaltar que, o sequenciamento neste estudo foi realizado em amostras de FFPE e que vem de longos anos de armazenamento. Isso traz dificuldades para o aproveitamento das amostras disponibilizadas em nossos arquivos. Sendo assim, com o protocolo desenvolvido, com foco principalmente em purificação e integridade do DNA, conseguimos o aproveitamento da maioria das amostras com massa suficiente e com DIN entre 2,0 e 5,0. O que demonstra bom aproveitamento em meio as limitações deste estudo.

Os achados deste estudo, abrem perspectivas para o avanço da compreensão dos mecanismos moleculares envolvidos na tumorigênese dos tumores originados do ducto intercalar das glândulas salivares. A identificação de variantes em genes relacionados à regulação epigenética e à sinalização celular, como *KMT2D*, *DNMT3A*, *NOTCH1* e *CTNNB1*, sugere possíveis vias de interesse para investigações funcionais, a fim de elucidar o impacto dessas alterações na biologia tumoral. Pesquisas futuras podem incluir análises funcionais *in vitro* e *in vivo*, que permitam verificar o efeito das variantes sobre a diferenciação celular, proliferação e comportamento das células mioepiteliais nestes contextos.

A ampliação da casuística e a integração de abordagens multiômicas, incluindo transcriptômica e proteômica, poderão oferecer uma visão mais abrangente das redes de interação que sustentam a heterogeneidade fenotípica dos tumores de glândulas salivares. Além disso, a correlação entre os achados genéticos e os desfechos clínicos poderá contribuir para o desenvolvimento de biomarcadores para o diagnóstico diferencial e potencialmente, em outros momentos, como fatores prognósticos e para a identificação de potenciais alvos terapêuticos, especialmente em neoplasias malignas com poucas opções sistêmicas eficazes.

De modo geral, nossos achados nesse conjunto de tumores, são inéditos. Como essas alterações influenciam os tumores de glândula salivar, ainda é desconhecido, mas quando unificamos os dados desta pesquisa, com pesquisas na literatura, a possibilidade de que possam participar na recorrência de tumores benignos ou até mesmo participar do processo de malignização pode ser especulada. Porém, mais pesquisas devem ser realizadas para melhor entendimento da participação funcional destas alterações.

As análises de rede de interação proteína-proteína, enriquecimento funcional e co-expressão gênica, revelaram potenciais correlações dos genes envolvidos em processos como regulação epigenética, sinalização e proliferação celular, sugerindo que, embora não recorrentes, as mutações em cada um dos genes avaliados demonstram ação influente na composição da heterogeneidade tumoral, uma vez que o *CTNNB1* translocado para o núcleo atua como fator de transcrição. Mutações em *KMT2D* podem gerar o silenciamento inadequado

de supressores tumorais. Em *DNMT3A* e provável perda de função podem levar a ativação inadequada de oncogenes. Enquanto em *NOTCH1* aparenta estar relacionado a uma ativação constitutiva, perdendo a necessidade de um ligante para sua ação proliferativa.

Em síntese, os resultados obtidos neste trabalho contribuem para o entendimento, mesmo que inicial, do papel da diferenciação mioepitelial e das alterações genéticas associadas na diversidade biológica e comportamental heterogêneo desses tumores de glândulas salivares. As análises realizadas indicam que modificações em genes reguladores, particularmente *NOTCH1* e *CTNNB1*, podem atuar como moduladores da progressão tumoral, com impacto potencial na morfologia e evolução desses tumores. Esses achados reforçam o papel da diferenciação mioepitelial como elemento chave na heterogeneidade dos tumores de glândulas salivares, destacando a importância de compreender como fatores genéticos e fenotípicos se integram na definição do comportamento biológico dessas neoplasias, ampliando um pouco mais quanto ao entendimento sobre a complexa biologia das glândulas salivares. Esse conjunto de tumores, do ducto intercalar da glândula salivar, podem sim representar um espectro diferente de um mesmo tipo tumoral, tendo a células mioepiteliais como principal articuladora de formações morfológicas e comportamentos clínicos distintos.

7 CONCLUSÕES

Em nosso estudo não foi possível identificar perfis mutacionais diferenciais para cada subtipo tumoral benigno e maligno estudado.

Comparando os casos com alterações moleculares e dados demográficos, clínicos e patológicos foi possível identificar que os casos com alterações em *NOTCH1*, em sua maioria, tiveram o pior desfecho relacionado e estatisticamente significativo, mesmo com uma casuística limitada.

Foi possível ainda, realizar a validação de duas variantes em *NOTCH1* identificadas previamente no sequenciamento guiado por painel e posteriormente em uma análise por *amplicon*.

REFERÊNCIAS

- Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. *Oral Oncol*. 2013 Sep;49(9):845-853.
- Alali F, Kochaji N. Proliferative Activity of Myoepithelial Cells in Normal Salivary Glands and Adenoid Cystic Carcinomas Based on Double Immunohistochemical Labeling. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2018 Jul 27;19(7):1965-1970.
- Almeslet AS. Pleomorphic Adenoma: A Systematic Review. *Int J ClinPediatr Dent*. 2020 May-Jun;13(3):284-287.
- Andreasen S, Kiss K, Mikkelsen LH, Channir HI, Plaschke CC, Melchior LC, Eriksen JG, Wessel I. An update on head and neck cancer: new entities and their histopathology, molecular background, treatment, and outcome. *APMIS*. 2019 May;127(5):240-264.
- Athwal KH, Lombaert MAI. Salivary Gland Embryology, Physiology, and Stem Cell Complexity. In: Witt RL, editor. *Witt. Surgery of the Salivary Glands*. New York: Elsevier; 2020. p.12-18.
- Bewicke-Copley F, Arjun Kumar E, Palladino G, Korfi K, Wang J. Applications and analysis of targeted genomic sequencing in cancer studies. *ComputStructBiotechnol J*. 2019 Nov 7; 17:1348-1359.
- Cheuk W, Chan JKC. Tumors of the Salivary Glands. In: Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 5thed. New York: Elsevier; 2020. p.301-410.
- Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BV. Myoepithelial Cells (MEC) of the Salivary Glands in Health and Tumours. *J ClinDiagn Res*. 2015 Mar;9(3): ZE14-8.
- Covinsky M, Cai Z, Ambelil M, Liu J, Zhu H. Low Grade Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma: Diagnosis and Diagnostic Challenges Caused by Fine Needle Aspiration: Report of Three Cases and Review of Literature. *Head NeckPathol*. 2018 Mar;12(1):82-88.
- Church M, Burghel G, Betts G, Churchill SM, Schlecht HB, Jain Y, Harrington K, Metcalf R. Clinical Utility of Whole-Genome Sequencing to Aid Histologic Diagnosis and to Direct Personalized Medicine in Salivary Gland Cancer. *JCO Precis Oncol*. 2025 Oct;9:e2500490.
- da Cunha, IW, de Almeida Coudry, R., de Macedo, MP et al. A call to action: molecular pathology in Brazil. *SurgExpPathol* 4, 15 (2021).
- de Oliveira CA. Perfil do componente mioepitelial em neoplasias de glândulas salivares. [Dissertação]. São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.
- de Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Nico MMS, Lourenco SV. Overview of Human Salivary Glands: Highlights of Morphology and Developing Processes. *Anat Rec (Hoboken)*. 2017 Jul;300(7):1180-1188.

Ferrarotto R, Mitani Y, Diao L, Guijarro I, Wang J, Zweidler-McKay P, Bell D, William WN Jr, Glisson BS, Wick MJ, Kapoun AM, Patnaik A, Eckhardt G, Munster P, Faoro L, Dupont J, Lee JJ, Futreal A, El-Naggar AK, Heymach JV. Activating NOTCH1 Mutations Define a Distinct Subgroup of Patients With Adenoid Cystic Carcinoma Who Have Poor Prognosis, Propensity to Bone and Liver Metastasis, and Potential Responsiveness to Notch1 Inhibitors. *J Clin Oncol*. 2017 Jan 20;35(3):352-360.

Ferrarotto R, Mitani Y, Diao L, Guijarro MV, Wang J, Zweidler-McKay PA, et al. Activating NOTCH1 mutations define a distinct subgroup of adenoid cystic carcinoma with poor prognosis. *Cell Death Dis*. 2022;13(7):678.

Fietto JLR, Maciel TEF. Sequenciando genomas. In: Moreira LM, editor. Ciências genômicas: fundamentos e aplicações. São Paulo: Sociedade Brasileira de Genética; 2020. p. 27-64.

Fonseca FP, Sena Filho M, Altemani A, Speight PM, Vargas PA. Molecular signature of salivary gland tumors: potential use as diagnostic and prognostic marker. *J Oral Pathol Med*. 2016 Feb;45(2):101-10.

Froimchuk E, Jang Y, Ge K. Histone H3 lysine 4 methyltransferase KMT2D. *Gene*. 2017 Sep 5;627:337-342.

Ghannam MG, Singh P. Anatomy, head and neck, salivary glands. In: StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2019. Last Update: February 19, 2019. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK538325/>.

Hernandez-Prera JC, Skálová A, Franchi A, Rinaldo A, Vander Poorten V, Zbären P, Ferlito A, Wenig BM. Pleomorphic adenoma: the great mimicker of malignancy. *Histopathology*. 2020 Dec 27.

Ho AS, Kannan K, Roy DM, Morris LG, Ganly I, Katabi N, et al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. *Nat Genet*. 2013;45(7):791-

Ho AS, Ochoa A, Jayakumaran G, Zehir A, Valero Mayor C, Tepe J, Makarov V, Dalin MG, He J, Bailey M, Montesion M, Ross JS, Miller VA, Chan L, Ganly I, Dogan S, Katabi N, Tsipouras P, Ha P, Agrawal N, Solit DB, Futreal PA, El Naggar AK, Reis-Filho JS, Weigelt B, Ho AL, Schultz N, Chan TA, Morris LG. Genetic hallmarks of recurrent/metastatic adenoid cystic carcinoma. *J Clin Invest*. 2019 Oct 1;129(10):4276-4289.

Hu T, Chitnis N, Monos D, Dinh A. Next-generation sequencing technologies: An overview. *Hum Immunol*. 2021 Nov;82(11):801-811.

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

Iida Y, Serizawa M, Mukaigawa T, Kamijo T, Nakajima T, Asakura K, Kusuhara M, Yamaguchi K, Onitsuka T. Molecular profile of a pleomorphic adenoma of the hard palate: A case report. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Jul 17;99(29):e21207.

Jaeger RG, Freitas VM. Histologia das glândulas salivares. In: Oriá RB, Brito GAC, editores. Sistema Digestório: integração básico-clínica. São Paulo: Blucher; 2016. p. 227-246.

Jin J, He XY. Basal cell adenocarcinoma of the nasopharyngeal minor salivary glands: a case report and review of the literature. BMC Cancer. 2018 Sep 10;18(1):878.

Jo VY, Sholl LM, Krane JF. Distinctive Patterns of CTNNB1 (β -Catenin) Alterations in Salivary Gland Basal Cell Adenoma and Basal Cell Adenocarcinoma. Am J SurgPathol. 2016 Aug;40(8):1143-50.

Jo VY, Sholl LM, Krane JF. Distinctive Patterns of CTNNB1 (β -Catenin) Alterations in Salivary Gland Basal Cell Adenoma and Basal Cell Adenocarcinoma. Am J Surg Pathol. 2016 Aug;40(8):1143-50.

Johnson V, Volikos E, Halford SE, Eftekhar Sadat ET, Popat S, Talbot I, Truninger K, Martin J, Jass J, Houlston R, Atkin W, Tomlinson IP, Silver AR. Exon 3 beta-catenin mutations are specifically associated with colorectal carcinomas in hereditary non-polyposis colorectal cancer syndrome. Gut. 2005 Feb;54(2):264-7.

Junqueira LC, Carneiro J. Histologia básica. 13th ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2018.

Kar A, Adeniji A, Rao VUS, Ghosh M. Molecular landscape of salivary gland cancers. Oral Oncol. 2020 May; 104:104595.

Katabi N, Gomez D, Klimstra DS, Carlson DL, Lee N, Ghossein R. Prognostic factors of recurrence in salivary carcinoma ex pleomorphic adenoma, with emphasis on the carcinoma histologic subtype: a clinicopathologic study of 43 cases. Hum Pathol. 2010 Jul;41(7):927-34.

Kawahara A, Harada H, Abe H, Yamaguchi T, Taira T, Nakashima K, Mihashi H, Akiba J, Kage M. Nuclear β -catenin expression in basal cell adenomas of salivary gland. J Oral Pathol Med. 2011 Jul;40(6):460-6.

Kessler AT, Bhatt AA. Review of the Major and Minor Salivary Glands, Part 2: Neoplasms and Tumor-like Lesions. J Clin Imaging Sci. 2018 Nov 15; 8:48.

Kurnit KC, Kim GN, Fellman BM, Urbauer DL, Mills GB, Zhang W, Broaddus RR. *CTNNB1* (beta-catenin) mutation identifies low grade, early stage endometrial cancer patients at increased risk of recurrence. Mod Pathol. 2017 Jul;30(7):1032-1041.

Lassche G, van Helvert S, Eijkelenboom A, Tjan MJH, Jansen EAM, van Cleef PHJ, Verhaegh GW, Kamping EJ, Grünberg K, van Engen-van Grunsven ACH, Ligtenberg MJL, van Herpen CML. Identification of Fusion Genes and Targets for Genetically Matched Therapies in a Large Cohort of Salivary Gland Cancer Patients. Cancers (Basel). 2022 Aug 27;14(17):4156.

Lee YH, Huang WC, Hsieh MS. CTNNB1 mutations in basal cell adenoma of the salivary gland. J Formos Med Assoc. 2018 Oct;117(10):894-901.

Levy SE, Boone BE. Next-Generation Sequencing Strategies. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2019 Jul 1;9(7): a025791

Li Y, Wang J, Gao Y, Zhang W, Zhang Z, Huang C, et al. Notch1 expression is associated with metastasis and recurrence in adenoid cystic carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2014;7(11):7438–47.

Lin HH, Limesand KH, Ann DK. Current State of Knowledge on Salivary Gland Cancers. *Crit Rev Oncog*. 2018;23(3-4):139-151.

Liu, W., Cao, H., Wang, J. *et al*. Histone-methyltransferase KMT2D deficiency impairs the Fanconi anemia/BRCA pathway upon glycolytic inhibition in squamous cell carcinoma. *Nat Commun* **15**, 6755 (2024).

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Uyekita SH, Soares FA. Human salivary gland branching morphogenesis: morphological localization of claudins and its parallel relation with developmental stages revealed by expression of cytoskeleton and secretion markers. *Histochem Cell Biol*. 2007 Oct;128(4):361-9.

Magno Guimarães D, deLucas da Silva Almeida F, Moraes Castilho R, Eduardo Nor J, Dumas Nunes F. DNA methyltransferase expression is associated with cell proliferation in salivary mucoepidermoid carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2020 Nov;49(10):1053-1060.

Manou M, Loupis T, Vrachnos DM, Katsoulas N, Theocharis S, Kanakoglou DS, Basdra EK, Piperi C, Papavassiliou AG. Enhanced Transcriptional Signature and Expression of Histone-Modifying Enzymes in Salivary Gland Tumors. *Cells*. 2023 Oct 11;12(20):2437.

Meyer MT, Watermann C, Dreyer T, Ergün S, Karnati S. 2021 Update on Diagnostic Markers and Translocation in Salivary Gland Tumors. *Int J Mol Sci*. 2021 Jun 24;22(13):6771.
Miletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. *Front Oral Biol*. 2010; 14:1-20.

Mitani Y, Al-Maghrabi H, Karpinets TV, Relator RT, Hilder L, Chen IY, Goepfert RP, Bell D, Zhang J, Ferrarotto R, El-Naggar AK. Comparative transcriptomics of salivary basal cell adenoma and adenocarcinoma sustain linear neoplastic evolution and intertumor heterogeneity: classification and biological implications. *J Pathol*. 2025 Jul;266(3):258-267.

Nanci, Antonio. Salivary gland. In: Ten Cate AR, editor. *Oral histology*. 8 th ed. St. Louis: Mosby; 2013. p.290-317.

Nicholas RG, Hanson JA, Meiklejohn DA. Myoepithelial Cell Carcinoma of the Oral Tongue: Case Report and Review of the Literature. *Clin Med Insights Oncol*. 2019 Apr 2; 13:1179554919838254.

Noel L, Medford S, Islam S, Muddeen A, Greaves W, Juman S. Epidemiology of salivary gland tumours in an Eastern Caribbean nation: A retrospective study. *Ann Med Surg (Lond)*. 2018 Nov 8; 36:148-151.

Okano K, Ishida M, Sandoh K, Fujisawa T, Iwai H, Tsuta K. Cytological features of carcinoma ex pleomorphic adenoma of the salivary glands: A diagnostic challenge. *DiagnCytopathol*. 2020 Feb;48(2):149-153.

Oyama Y, Nishida H, Kusaba T, Kadowaki H, Arakane M, Wada J, et al. Difference in transducin-like enhancer of split 1 protein expression between basal cell adenomas and basal cell adenocarcinomas - an immunohistochemical study. *DiagnPathol*. 2018 Jul 27;13(1):48.

Parikh AS, Kapoor V, Luo J, Wang L, Li L, Hicks J, et al. Single-cell RNA sequencing identifies a paracrine interaction that may drive oncogenic Notch signaling in human adenoid cystic carcinoma. *Cell Rep*. 2022;41(9):111743.

Rao RS, Patil S, Amrutha N, Sanketh D, Agarwal A. The ambiguous salivary myoepithelial cells. *J Contemp Dent Pract*. 2014 Jul 1;15(4):523-8.

Rito M, Esteves S, Fonseca I. Basal Cell Adenoma and Basal Cell Adenocarcinoma: a 50-year Experience From a Single Institution. *Head Neck Pathol*. 2022 Dec;16(4):1157-1166.
Robinson RA. Basal Cell Adenoma and Basal Cell Adenocarcinoma. *SurgPatholClin*. 2021 Mar;14(1):25-42.

Sasaki E, Fujita Y, Masago K, Iwakoshi A, Hanai N, Matsushita H. S100-positive stroma in salivary gland basal cell adenomas: a neoplastic component with CTNNB1 mutations. *Virchows Arch*. 2024 Dec 26.

Scarini JF, Egal ESA, de Lima-Souza RA, Crescencio LR, Emerick C, Kowalski LP, et al. Two sides of the same coin: Insights into the myoepithelial cells in carcinoma ex pleomorphic adenoma development. *Crit Rev OncolHematol*. 2021 Jan; 157:103195.

Seok J, Hyun SJ, Jeong WJ, Ahn SH, Kim H, Jung YH. The Difference in the Clinical Features Between Carcinoma ex Pleomorphic Adenoma and Pleomorphic Adenoma. *EarNoseThroat J*. 2019 Sep;98(8):504-509.

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

Skálová A, Agaimy A, Vanecek T, Baněčková M, Laco J, Ptáková N, Šteiner P, Majewska H, Biernat W, Corcione L, Eis V, Koshyk O, Vondrák J Jr, Michal M, Leivo I. Molecular Profiling of Clear Cell Myoepithelial Carcinoma of Salivary Glands With EWSR1 Rearrangement Identifies Frequent PLAG1 Gene Fusions But No EWSR1 Fusion Transcripts. *Am J SurgPathol*. 2021 Jan;45(1):1-13.

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 NeckPathol*. 2022 Mar;16(1):40-53.

Sowa P, Goroszkiewicz K, Szydelko J, Chechlinska J, Pluta K, Domka W, et al. A Review of Selected Factors of Salivary Gland Tumour Formation and Malignant Transformation. *Biomed Res Int*. 2018 Aug 1; 2018:2897827.

Stamboni HB. Assinatura imunoistoquímica das células mioepiteliais em neoplasias benignas de glândulas salivares. [Tese] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2018.

Tajima S, Suetake I, Takeshita K, Nakagawa A, Kimura H, Song J. Domain Structure of the Dnmt1, Dnmt3a, and Dnmt3b DNA Methyltransferases. *Adv Exp Med Biol.* 2022;1389:45-68.

Tang S, Shen H, Mao X, Dai H, Zhu X, Xue S, Ding Z, Lu J, Wu D, Tang X. FLT3-ITD with DNMT3A R882 double mutation is a poor prognostic factor in Chinese patients with acute myeloid leukemia after chemotherapy or allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Int J Hematol.* 2017 Oct;106(4):552-561.

Toper MH, Sarioglu S. Molecular Pathology of Salivary Gland Neoplasms: Diagnostic, Prognostic, and Predictive Perspective. *Adv Anat Pathol.* 2021 Mar 1;28(2):81-93.

Verma M, Kulshrestha S, Puri A. Genome Sequencing. *Methods Mol Biol.* 2017; 1525:3-33. doi: 10.1007/978-1-4939-6622-6_1. PMID: 27896715.

Wang K, Russell JS, McDermott JD, Elvin JA, Khaira D, Johnson A, et al. Profiling of 149 Salivary Duct Carcinomas, Carcinoma Ex Pleomorphic Adenomas, and Adenocarcinomas, Not Otherwise Specified Reveals Actionable Genomic Alterations. *Clin Cancer Res.* 2016;22(24):6061-6068.

Wang C, Lee JE, Lai B, Macfarlan TS, Xu S, Zhuang L, Liu C, Peng W, Ge K. Enhancer priming by H3K4 methyltransferase MLL4 controls cell fate transition. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2016 Oct 18;113(42):11871-11876.

Wang K, Zhan F, Yang X, Jiao M, Wang P, Zhang H, Shang W, Deng J, Wang L. KMT2D: A key emerging epigenetic regulator in head and neck diseases and tumors. *Life Sci.* 2025 May 15;369:123523.

Weitzel M, Cohn JE, Spector H. Myoepithelioma of the Parotid Gland: A Case Report with Review of the Literature and Classic Histopathology. *Case Rep Otolaryngol.* 2017; 2017:6036179.

Wilson TC, Ma D, Tilak A, Tesdahl B, Robinson RA. Next-Generation Sequencing in Salivary Gland Basal Cell Adenocarcinoma and Basal Cell Adenoma. *Head Neck Pathol.* 2016;10(4):494-500.

Xiao CC, Baker AB, White-Gilbertson SJ, Day TA. Prognostic Factors in Myoepithelial Carcinoma of the Major Salivary Glands. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2016;154(6):1047-53.

Xu B, Katabi N. Myoepithelial Carcinoma. *SurgPatholClin.* 2021 Mar;14(1):67-73.

Yasuhara R, Kang S, Irié T, Mabuchi Y, Kujiraoka S, Yukimori A, Ishida S, Tanaka J, Mishima K. Role of Snai2 and Notch signaling in salivary gland myoepithelial cell fate. *Lab Invest.* 2022 Nov;102(11):1245-1256.

Yin LX, Ha PK. Genetic alterations in salivary gland cancers. *Cancer*. 2016 Jun 15;122(12):1822-31.

Young A, Okuyemi OT. Benign Salivary Gland Tumors. 2020 Oct 23. In: StatPearls [Internet]. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2021 Jan–. PMID: 33231965.

Zeitouni NC, Huang DD, Row D. An Unusual Presentation and Aggressive Course of Metastatic Myoepithelial Carcinoma. *J Clin Aesthet Dermatol*. 2019 Sep;12(9):46-48.

Zhang Y, Liu X, Zhou CX, Li TJ. Notch activation leads to loss of myoepithelial differentiation and poor outcome in solid adenoid cystic carcinoma. *Oral Dis*. 2020 Nov;26(8):1677-1686.

Yu F, Yu C, Li F, Zuo Y, Wang Y, Yao L, Wu C, Wang C, Ye L. Wnt/ β -catenin signaling in cancers and targeted therapies. *Signal Transduct Target Ther*. 2021 Aug 30;6(1):307.

APÊNDICE A - COMENTÁRIO SOBRE O PERÍODO SANDUÍCHE

Durante o período de maio a novembro de 2024 foi realizado período de Doutorado Sanduíche na *School of Dentistry – UNIVERSITY OF MICHIGAN* nos Estados Unidos da América, sob orientação da Prof. Dra. Cristiane Helena Squarize.

Durante as análises dos resultados obtidos no Doutorado identificamos alterações em genes *NOTCH2/4* nos tumores benignos e *NOTCH1* nos tumores malignos. Dessa forma, entendemos que estudar funcionalmente linhagens de células bem estabelecidas do carcinoma adenoide cístico seria interessante, visto que esta neoplasia também é proveniente da mesma região da glândula salivar e tem o gene *NOTCH1* comumente alterado, observado principalmente em casos de rearranjo *MYB-NFIB*. Como é o caso das linhagens da Universidade de Michigan que são uma das poucas e raras linhagens caracterizadas de tumor de glândula salivar e não disponíveis comercialmente até o momento.

Com isso, entendemos a relevância de estudar a influência dessa via de sinalização, pois há o questionamento se além das alterações a nível gênico, também há possibilidade de alterações de superexpressão do receptor e se a sua inibição levaria a diminuição da progressão tumoral.

Sendo assim, neste período no *Squarize lab*, foram realizados alguns experimentos com as linhagens celulares de carcinoma adenoide cístico (CAC) imortalizadas e originadas da Universidade (UM-HACC-2A, UM-HACC-6 e UM-HACC-14). Nosso intuito geral era realizar a análise mutacional destes casos e comparar com achados as células de cultura primária desenvolvidas no grupo de pesquisa no A.C.Camargo Cancer Center, visando entender e investigar potenciais genes e vias de sinalização alvo para aprofundar os estudos em diferentes perfis de células de CAC. Inicialmente a ideia era realizar os experimentos focados em via NOTCH, mas após os resultados preliminares, optamos por seguir uma linha que visa investigar genes relacionados à regulação epigenética no CAC. Este estudo ainda está em andamento e com artigo em preparação.

ANEXO A – CARTA DE ACEITE DE EMENDA DO PROJETO NO CEP



FUNDAÇÃO ANTÔNIO
PRUDENTE - A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 5.144.242

Benefício à comunidade por agregação de conhecimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de submissão de EMENDA 1, para solicitar a inclusão de uma aluna de Doutorado no projeto (documento Emenda_Doutorado_Carolinne, postado na plataforma Brasil em 03/11/2021). A aluna irá desenvolver em seu Doutorado o último objetivo do projeto departamental. Esse objetivo trata da determinação de um perfil de mutações nos diferentes tumores de glândula salivar.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Recomendações:

Vide item "Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações".

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Após apreciação da presente solicitação de emenda este Comitê não observa qualquer óbice ético.

Considerações Finais a critério do CEP:

O projeto em referência (registro CEP 2706/19) terá um dos objetivos desenvolvido por Caroline Alves de Oliveira, aluna de Doutorado.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	EmendaalunoCarolinne.doc	08/11/2021 12:34:42	SANDRA FABIANA DE ALMEIDA MANZANO	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1853063_E1.pdf	03/11/2021 15:23:52		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoductointercalarCEPversao2_Doutorado_Carolinne_em_realce.docx	03/11/2021 15:20:23	Cláudia Malheiros Coutinho Camillo	Aceito
Solicitação Assinada pelo Pesquisador Responsável	Emenda_Doutorado_Carolinne.pdf	03/11/2021 15:17:45	Cláudia Malheiros Coutinho Camillo	Aceito
Outros	CartarespostaCEPducto.pdf	06/06/2019 16:23:13	Cláudia Malheiros Coutinho Camillo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoductointercalarCEPversao2.docx	06/06/2019 16:19:50	Cláudia Malheiros Coutinho Camillo	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211

Bairro: Liberdade

CEP: 01.509-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)2189-5020

Fax: (11)2189-5020

E-mail: cep_accamargo@accamargo.org.br