

**AVALIAÇÃO DA VIA DO C-KIT NO ADENOMA
PLEOMÓRFICO E CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO DAS
GLÂNDULAS SALIVARES: ESTUDO DA EXPRESSÃO
DAS PROTEÍNAS DA VIA, DAS MUTAÇÕES E DA
REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DO GENE KIT**

RENATA CAROLINA FRAGA IANEZ

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

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra Silvia Vanessa Lourenço

**Co-Orientadores: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo e Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto**

São Paulo

2016

FICHA CATALOGRÁFICA
Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

lanez, Renata Carolina Fraga

Avaliação da via do c-kit no adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares: estudo da expressão das proteínas da via, das mutações e da regulação pós-transcricional do gene kit / Renata Carolina Fraga lanez – São Paulo, 2016.

115p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Silvia Vanessa Lourenço

Descritores: 1. NEOPLASIAS DAS GLÂNDULAS SALIVARES. 2. ADENOMA PLEOMORFO. 3. PROTEÍNAS PROTO-ONCOGÊNICAS C-KIT. 4. MUTAÇÃO. 5. CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO.

***“Você nunca vai chegar ao seu destino,
se parar para atirar pedras
em cada cão que late pelo caminho”.
(Winston Churchill)***

DEDICATÓRIA

Aos meus pais: Vera e Mario (*in memorian*);

Em especial a minha mãe, por ser meu porto seguro e acalmar minhas angustias; Por fazer de mim uma pessoa melhor a cada dia, por me encorajar e incentivar na luta pelos meus sonhos..... Mesmo nos momentos mais difíceis.....

À minha orientadora Dra. Silvia Lourenço

Por sempre acreditar em mim, pela paciência imensurável, pelos ensinamentos e oportunidade de amadurecimento. Sou muito grata por além de ser minha orientadora, ter se tornado amiga... Me ensinou a crescer enquanto profissional e ser humano. Você representa um exemplo de orientadora e pessoa que espero preservar o resto da vida....

AGRADECIMENTOS

Á Deus

Pelo dom da vida. Por me guiar e amparar em todos os momentos;

Á minha co-orientadora Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo;

Por todos os ensinamentos, pela dedicação e ajuda incansável. Obrigada por todas as conversas e conselhos

Ao meu co-orientador Dr. Clóvis Pinto;

Por toda ajuda e disponibilidade

Á Agatha do núcleo de estatística;

Pelo auxílio na realização de toda a análise estatística desse trabalho;

Ao Dr. Fernando Soares;

Pela oportunidade de aprendizado no laboratório de Anatomia Patológica do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);

À secretaria de pós-graduação, especialmente à Luciana Pitombeira, à Vanuza Barros Rodrigues de Oliveira e à Ana Kuninari;

Pela disponibilidade e paciência com que sempre me receberam e orientaram;

À toda equipe da biblioteca, em especial, à Suely Francisco;

Pelo auxílio na revisão e formatação deste trabalho

Aos colegas do Departamento de Anatomia Patológica do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE); em especial:

A Katia Klug, por toda ajuda na parte técnica desse trabalho;

As amigas do grupo de glândulas salivares: Agatha Nagli, Elen Alves e Gabriela Madureira, pela amizade, apoio nas conversas e toda ajuda

À duas pessoas fundamentais: Michelle Baldoni e Juliana Bartholo;
Por toda amizade, companheirismo... Por estarem presentes tanto nas fases boas como nas ruins, sempre uma dando apoio, carinho e atenção a outra;

Ao Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Câncer Center, em especial;
Ivanildo, Fátima, Simone, Carlinhos, Severino e Marina França que sempre me receberam de forma gentil e dispostos a ajudar;

À Fundação de Amparo e Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP);
Pelo apoio financeiro à esta pesquisa

À minha família, em especial:

À Renata e Adriano Borges, por todas as palavras de apoio e carinho;

À Alessandra e Raphael Fusco, por me darem um dos maiores presentes do mundo, e trazer mais cor aos meus dias

À Helena Fusco, por alegrar todos os dias da minha vida, me tornando a Dinda mais babona do mundo;

À Daniele Mardegam, pelas horas de conversas, desabafos, choros... Pelas alegrias, loucuras e por todo incentivo e apoio;

Ao meu namorado Luiz;

Por toda compreensão, paciência, carinho, apoio e incentivo, tornando meus dias mais calmos ao seu lado

Aos amigos que fiz no “doutorado sanduíche” em Londres, em especial:

À Tathyane Teshima, por ser minha companheira de aventuras, pelo apoio nos momentos de fraqueza e saudade, e claro, pelas inúmeras alegrias que desfrutamos juntas

À todos os amigos;

Por todos os momentos juntos, pelo incentivo e apoio

RESUMO

lanez RCF. **Avaliação da via do c-kit no adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares: estudo da expressão das proteínas da via, das mutações e da regulação pós-transcricional do gene kit.** São Paulo; 2016. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: As neoplasias das glândulas salivares têm amplo espectro histológico resultante da múltipla diferenciação celular tumoral. O adenoma pleomórfico (AP) e o carcinoma adenoide cístico (CAC) são as mais comuns neoplasias benignas e malignas provenientes do ducto intercalado, respectivamente, além de serem compostas por estruturas luminais e células mioepiteliais. Em estudo realizado previamente pelo nosso grupo, detectamos que a proteína c-kit está envolvida nos processos da morfogênese das glândulas salivares e no adenoma pleomórfico. A proteína c-Kit tem papel importante no desenvolvimento de muitos processos embrionários, incluindo a gametogênese, melanogênese e hematopoiese, e também na biologia de tumores. Sua ativação induz diversas respostas intracelulares através de cascatas de sinalização de vias como PI3K/AKT e MAPK. Em tumores da glândula salivar ainda há poucos estudos sobre as alterações do gene KIT e das proteínas relacionadas a sua via de sinalização, assim como sua regulação pós-transcricional, realizada principalmente por meio dos microRNAs. O presente estudo avaliou, em APs e CACs (a) a localização das proteínas das vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK por meio da técnica de imunoistoquímica; (b) a expressão dos microRNAs 221 e 222, relacionados ao gene KIT (c) a associação dos achados laboratoriais com variáveis clínicas, patológicas e sobrevida. **Resultados:** Nos casos de AP a proteína c-Kit foi identificada em formações luminais e em raras células isoladas no parênquima tumoral. Já nos CAC, observou-se positividade na membrana das células ductais. Para a via de

PI3K/AKT/mTOR, no AP, a proteína PI3K beta mostrou-se parcialmente positiva no citoplasma das células próximas à capsula tumoral, e as proteínas AKT e mTOR fosforiladas, foram expressas especialmente nas células epiteliais e em poucas células mioepiteliais. Já no CAC, a proteína PI3K beta e AKT fosforilada mostraram-se negativas na maioria dos casos, e a proteína mTOR fosforilada foi expressa no citoplasma das células epiteliais e em algumas células mioepiteliais. Para a via MAPK, as proteínas RAS, MEK-1 fosforilada e ERK 1/2 foram negativas na maioria dos AP e CAC; B-Raf e MEK-2 fosforilada foram observadas nas células luminais dos AP. Nos CAC, estruturas luminais neoplásicas foram positivas para a proteína MEK-2 fosforilada; B-Raf foi positivo nas células luminais e mioepiteliais. Além disso, os pacientes que expressaram as proteínas mTOR e MEK-2 fosforilada apresentaram sobrevida câncer-específica significativamente aumentada ($p=0,040$ e $p=0,005$, respectivamente). Na análise do microRNAs, a expressão do miR-221 foi variável nas 13 amostras analisadas, tendo baixa expressão em 30,77% dos casos, expressão normal em 38,46 e expressão aumentada em 30,77% dos casos. Já nos APs o miR-221 foi detectado em 19 amostras, sendo 36,84% com baixa expressão, 52,63% com expressão normal e expressão aumentada foi vista em 10,53% dos casos. A expressão do miR-222 foi detectada em 14 CACs, sendo que a maioria dos casos (8 casos – 57,1%) a expressão do miR-222 foi semelhante ao observado nas amostras não neoplásicas. Nos APs, o miR-222 foi detectado em 22 amostras, sendo 31,8% com baixa expressão, 31,8% com expressão normal e 36,4% com expressão aumentada.

Conclusão: Apesar de a proteína c-Kit ser expressa em ambas as neoplasias – AP e CAC, sua influência sobre as vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT/mTOR ainda permanece por ser estabelecida. Ainda, os microRNAs 221 e 222 não mostram correlação consistente com a expressão de c-Kit nos tipos tumorais estudados.

SUMMARY

lanez RCF. [c-Kit signaling cascade in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma of salivary glands: evaluation of cascade proteins, mutations and post-transcriptional regulation of gene Kit]. São Paulo; 2015. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Salivary gland tumors present broad histological spectrum resulting from multiple tumor cell differentiation. Pleomorphic adenoma (PA) and adenoid cystic carcinoma (ACC) are the commonest benign and malignant salivary gland neoplasms originated from the intercalated duct region, respectively, and are composed by luminal structures and myoepithelial cells. In a previous study we detected that protein c-kit is involved in the process of salivary gland morphogenesis and PA. c-Kit protein is important during embryogenesis, including gametogenesis, melanogenesis and hematopoiesis as well as in tumorigenesis. Its activation induces various intracellular responses through pathways such as MAPK and PI3K/AKT/mTOR signaling cascades. In salivary gland neoplasms, only a few reports have shown that alterations in KIT gene are present and proteins related to its signaling pathway as well as its post-transcriptional regulation. This study has aimed at evaluating in PA and ACC: (a) the proteins location of PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways using immunohistochemistry (IHC); (b) expression of miR-221 and miR-222, related to KIT gene; and (c) the association of these findings with clinical, pathological and survival data of patients. **Results:** In PA c-kit was positive in isolated luminal cells; in ACC, neoplastic luminal structures were positive for c-Kit. In PA, PI3K beta protein was shown to be partially positive in the cytoplasm of cells near the tumor capsule and phosphor AKT and phospho mTOR, are specifically expressed in epithelial cells and in a few myoepithelial. In ACC, PI3K and phosphor AKT protein showed to be negative in most of cases. Phospho mTOR protein was expressed in the cytoplasm of epithelial cells and some myoepithelial cells. In

MAPK pathway, Ras, ERK1/2 and phosphor MEK-1 proteins were negative in most PAs and CACs; B-Raf and phospho MEK-2 were detected in luminal cells of PA. In ACC neoplastic luminal structures were positive for phospho MEK-2; B-Raf was also positive in myoepithelial and epithelial cells. In addition, cases with expressed phospho-mTOR and phosphor MEK-2 proteins were significantly associated with higher cancer-specific survival ($p = 0.040$ and $p = 0.005$, respectively). Moreover, expression of miR-221 was detected in 13 CAC samples and 19 PA samples. In CAC, expression of miR-221 was downregulated in 30,77% of the samples, upregulated in 30,77% samples, and normal in 38,46% samples. In PA, miR-221 expression was downregulated in 36,84% samples, upregulated in 10,53% samples, and normal in 52,63% samples. Expression of miR-222 was detected in 14 CAC samples and 22 PA samples. In the majority of CAC samples, the expression of miR-222 was similar to that observed in non-neoplastic samples. In PA samples, expression of miR-222 was downregulated in 31,8% samples, upregulated in 36,4% samples, and normal in 31,8% samples. **Conclusion:** Although c-Kit expression is detected in PA and ACC, its influence on the MAPK e PI3K/AKT/mTOR signaling cascades remains to be established. miR-221 e -222 did not show a robust correlation with c-Kit expression in the tumors studied.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação didática da estrutura da glândula salivar.....	1
Figura 2	Estrutura do gene KIT.....	8
Figura 3	A Via de sinalização do c-Kit.....	13
Figura 4	Imunoexpressão dos marcadores c-kit no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta.....	18
Figura 5	Biossíntese do miRNA.....	22
Figura 6	Exemplos dos aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico.....	37
Figura 7	Exemplos dos aspectos histopatológicos do carcinoma adenoide cístico.....	41
Figura 8	Imunoexpressão do marcador c-Kit.....	44
Figura 9	Imunoexpressão do marcador PI3K beta.....	46
Figura 10	Imunoexpressão dos marcadores AKT fosforilada e mTOR fosforilada.....	48
Figura 11.1	Imunoexpressão do marcador B-Raf no Adenoma Pleomórfico.....	50
Figura 11.2	Imunoexpressão do marcador B-Raf no Carcinoma Adenoide Cístico.....	51

Figura 12	Imunoexpressão do marcador MEK-1 fosforilado.....	52
Figura 13.1	Imunoexpressão do marcador MEK-2 fosforilado no Adenoma Pleomórfico.....	53
Figura 13.2	Imunoexpressão do marcador MEK-2 fosforilado no Carcinoma Adenoide Cístico.....	54
Figura 14	Imunoexpressão do marcador ERK1/2 fosforilado.....	55
Figura 15	Sobrevida câncer-específica dos pacientes com carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares avaliados na presente série.....	64
Figura 16	Curvas de Sobrevida Câncer Específica de pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico de acordo com marcadores imunoistoquímicos estudados com diferença estatisticamente significativa.....	65
Figura 17	Expressão do miRNA-221 nos tumores de glândula salivar estudados.....	74
Figura 18	Expressão do miRNA-222 nos tumores de glândula salivar estudados.....	76

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Anticorpos utilizados e sua procedência.....	31
Quadro 2	Comparação da expressão dos microRNAs 221 e 222 e da proteína c-kit.....	77
Tabela 1	Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico.....	36
Tabela 2	Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico.....	39
Tabela 3	Resultados da expressão imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana nas amostras de adenoma pleomórfico.....	42
Tabela 4	Resultados da expressão imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana nas amostras de carcinoma adenoide cístico.....	42
Tabela 5	Análise da associação das proteínas c-Kit e PI3K beta com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico.....	57
Tabela 6	Análise da associação das proteínas AKT fosforilada e mTOR fosforilado com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico.....	58
Tabela 7	Análise da associação das proteínas B-Raf e MEK-1 fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico.....	59

Tabela 8	Análise da associação da proteína MEK-2 fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico.....	60
Tabela 9	Análise da associação das proteínas c-Kit e PI3K beta com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico.....	61
Tabela 10	Análise da associação das proteínas AKT fosforilada e mTOR fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico.....	62
Tabela 11	Análise da associação das proteínas MEK-1 fosforilada e MEK-2 fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico.....	63
Tabela 12	Correlação entre a sobrevida câncer-específica e variáveis imunoistoquímicas dos casos de carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares.....	65
Tabela 13	Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico.....	67
Tabela 14	Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico.....	69
Tabela 15	Resultados da leitura espectrofotométrica do RNA extraído após tratamento com DNase: quantificação das amostras de RNA total provenientes de pacientes com CAC e AP.....	71
Tabela 16	Expressão do miRNA-221 nos tumores de glândula salivar estudados.....	74

Tabela 17	Expressão do miRNA-222 nos tumores de glândula salivar estudados.....	75
Tabela 18	Análise da associação dos miRNAs com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico.....	79
Tabela 19	Análise da associação dos miRNAs com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico.....	80

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

4EBP1	“Translational inhibitor eIF-4E inhibitory protein”
μl	Unidade de medida de volume microlitros
μm	Unidade de medida de tamanho micrometros
%	Unidade de valor percentual
AP	Adenoma Pleomórfico
Akt	“Protein Kinase B
ATP	Adenosina Trifosfato
CAC	Carcinoma adenoide cístico
cDNA	“complementary DNA”, traduzido como DNA complementar
DAB	Diaminobenzindine
dATP	“Deoxyadenosine triphosphate”
dCTP	“Deoxyguanosine triphosphate”
dGTP	“Deoxyguanosine triphosphate”
dUTP	“Deoxyguanosine triphosphate”
EDTA/Tris	“Ethylenediamine Tetraacetic Acid/Hidroxymethyl aminomethane”
EGFR	“epidermal growth fator receptor”
GIST	“Gastrointestinal stromal tumors”
H&E	Hematoxilina e Eosina
HRP	“Horse raddish peroxidase”
IGF-1R	“insulina-like growth fator-1 receptor
KIT	“v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog”
MAPK	“ <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i> ”
Mol/L	é a razão da quantidade de matéria do soluto (<i>mol</i>) por volume de solução (em litros)
mTOR	“mammalian target of rapamycin”
ng	Unidade de medida de peso nanograma
PDGF	“Platelet-derived growth factor

PBS	“phosphate buffered saline”
pH	potencial de hidrogênio iônico
PI3-Kinase	“phosphoinositide-3-kinase”
PLZF	“Promyelocytic leukaemia zinc finger”
PTEN	“phosphatase and tensin homolog
RNA	“Ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucléico
RNAm	RNA mensageiro
RTK	“receptor tyrosine Kinase
RT-PCR	“Reverse Transcriptase-Polimerase Chain Reaction”
SCF	“stem-cell fator”
SCE	Sobrevida Câncer-específica
SPSS	Statistical Package for Social Science
S6K	“p70 ribosomal S6 Kinase”
Tris- HCL	Tris-hidroxymethyl aminomethane – hydrochloric acid
TSC	“tuberous sclerosis complex”
Tween 20	“Surfact-Amps Detergent Solution”

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Glândulas Salivares.....	1
1.1.1	Adenoma Pleomórfico	2
1.1.2	Carcinoma Adenoide Cístico	4
1.2	Cascata Moleculares	6
1.2.1	Via MAPK - <i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>	9
1.2.2	Via PI3K/ mTOR/ AKT - <i>phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B</i> ..	10
1.3	Função do c-Kit em tumores.....	14
1.4	Regulação Pós-transcricional da expressão do c-Kit	20
1.4.1	Biogênese do Mirna.....	20
1.4.2	miRNA e Câncer.....	23
2	PROPOSIÇÃO	27
3	MATERIAIS E MÉTODOS	28
3.1	Imunoistoquímica	29
3.2	miRNA	32
3.2.1	Extração do RNA.....	32
3.2.2	Síntese do cDNA	32
3.2.3	Amplificação do cDNA e análise da expressão de microRNAs	33
3.3	Análise Estatística	34
4	RESULTADOS.....	35
4.1	Imunoistoquímica	35
4.1.1	Adenoma Pleomórfico	35
4.1.1.1	Dados Clínicos-Demográficos.....	35
4.1.1.2	Análise Histopatológica	36
4.1.2	Carcinoma Adenoide Cístico	38
4.1.2.1	Dados Clínicos-Demográficos.....	38

4.1.2.2	Análise Histopatológica	40
4.1.3	Reações Imunoistoquímicas.....	41
4.1.3.1	c-Kit.....	43
4.1.3.2	PI3K beta	45
4.1.3.3	AKT fosforilada.....	47
4.1.3.4	mTOR fosforilada	47
4.1.3.5	Ras.....	49
4.1.3.6	B-Raf.....	49
4.1.3.7	MEK-1 fosforilada.....	52
4.1.3.8	MEK-2 fosforilada.....	53
4.1.3.9	ERK1/2 fosforilada	54
4.1.4	Análise de associação das proteínas estudadas com as variáveis clínico-demográficas.....	55
4.1.5	Análise de sobrevida câncer-específica (SCE).....	64
4.2	miRNA	66
4.2.1	Adenoma Pleomórfico	66
4.2.1.1	Dados Clínico-Demográficos.....	66
4.2.2	Carcinoma Adenoide Cístico	67
4.2.2.1	Dados Clínico-Demográficos.....	67
4.2.3	Extração de RNA.....	70
4.2.4	Síntese do cDNA	72
4.2.5	Amplificação do cDNA e análise da expressão de microRNAs	72
4.2.5.1	miRNA-221.....	73
4.2.5.2	miRNA-222.....	75
4.2.6	Análise de associação dos miRNAs com as variáveis clínico- demográficas.....	77
4.2.7	Análise de comparação dos miRNAs em relação á sobrevida dos casos de carcinoma adenoide cístico	81
5	DISCUSSÃO	82
6	CONCLUSÕES	95

7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	96
----------	---	-----------

ANEXO

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são estruturas complexas formadas por um sistema de ductos e ácinos (Figura 1). A estrutura do sistema ductal é composta por células luminais e não-luminais (células basais e células mioepiteliais). As unidades secretoras acinares e os ductos intercalados são envolvidos pelas células mioepiteliais enquanto que as outras porções do sistema ductal contam com a presença das células basais (RAUBENHEIMER et al. 1987; REDMAN 1994).

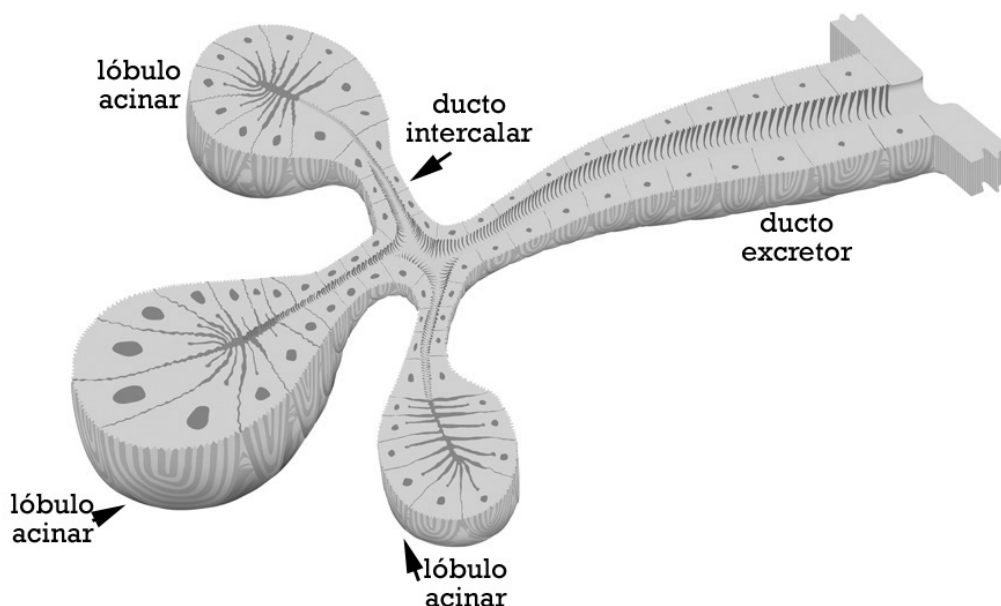


Figura 1 - representação didática da estrutura da glândula salivar

As neoplasias das glândulas salivares constituem cerca de 3% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço e são derivadas dos diversos segmentos glandulares. De forma geral, essas neoplasias relacionam-se com os compartimentos glandulares por meio da semelhança das suas características fenotípicas e moleculares. Tumores que possuem em sua composição células epiteliais e mioepiteliais desenvolvem-se a partir do ducto intercalado; entre eles destacam-se o adenoma pleomórfico como neoplasia benigna mais comum e o carcinoma adenoide cístico como uma das neoplasia malignas mais frequentes (REGEZI e BATSAKIS 1977; CARLSON et al. 2008; TETSU et al. 2010; ADELSTEIN et al. 2012).

1.1.1 Adenoma Pleomórfico

A maioria dos tumores das glândulas salivares compreendem neoplasias benignas, das quais, cerca de 70% correspondem a adenomas pleomórficos (WAL et al. 1998).

O adenoma pleomórfico ocorre principalmente nas glândulas maiores (a parótida é a glândula mais acometida), mas também acomete as glândulas menores (mucosas), especialmente as localizadas no palato (LINGAM et al. 2011). Esta neoplasia predomina no sexo feminino, principalmente entre 3^a e a 4^a décadas de vida (ELLIS e AUCLAIR 1996). Apresentações clínicas, radiológicas e histológicas são diversas: podem ocorrer em diferentes localizações anatômicas e terem aspectos histopatológicos variados graças a diferentes proporções dos elementos epiteliais e mesenquimais, o que lhes garante o nome alternativo de tumor misto das glândulas salivares (LINGAM et al. 2011).

Clinicamente trata-se de uma massa nodular circunscrita de capsulação e tamanhos variáveis, que pode apresentar-se solitário, de crescimento lento, indolor, de comum recorrência e, raramente leva o paciente a óbito (MENDENHALL et al. 2008; LINGAM et al. 2011). A excisão cirúrgica é o tratamento de escolha para o adenoma pleomórfico, que pode crescer a proporções maiores, caso não seja tratado. Assim, a longevidade e recidiva são fatores de risco de transformação maligna, que pode ocorrer de 3% a 4% dos casos (LINGAM et al. 2011).

Do ponto de vista microscópico, o adenoma pleomórfico é uma neoplasia bifásica, composta por células epiteliais e mioepiteliais arranjadas em uma grande variedade de padrões, em meio a um estroma escasso ou abundante, do tipo mucóide, fibroso, condróide, vascular ou mixocondróide. Há também uma grande variação na disposição celular, com formações celulares difusas e compactas até a apresentação de células isoladas; formações ductiformes e padrões trabeculares, basalóide e císticos são freqüentes (ELLIS e AUCLAIR 1996). Essas características de diversidade fenotípica dos componentes lhe conferem o aspecto histológico de pleomorfismo arquitetural (SEIFERT et al. 1990).

Estudos mostraram que a maioria dos adenomas pleomórficos são formados por proliferação de células mioepiteliais modificadas, de morfologia do tipo plasmocitóide, fusiforme, poligonal ou hialino. Em meio a esses agrupamentos celulares se fazem presentes estruturas ductiformes e estroma (REGEZI e BATSAKIS 1977).

1.1.2 Carcinoma Adenoide Cístico

As neoplasias malignas das glândulas salivares são relativamente incomuns, totalizando menos de 7% dos cânceres de cabeça e pescoço. O carcinoma adenoide cístico (CAC) é a segunda neoplasia maligna mais comum das glândulas salivares (CARLSON et al. 2008; TETSU et al. 2010; ADELSTEIN et al. 2012) podendo se desenvolver em uma variedade de localizações anatômicas, entre as mais comuns estão a glândula parótida, submandibular e as glândulas salivares menores (NEVILLE et al. 1995; ALTMAN et al. 1997; KOKEMUELLER et al. 2004).

Diversos artigos mostram igual distribuição de incidência em relação ao sexo. No entanto, alguns relatam predileção pelo sexo feminino. Essa neoplasia acomete mais freqüentemente adultos entre a quinta e a sétima décadas de vida, sendo raro em pessoas menores de 20 anos. (NEVILLE et al. 1995; ELLIS e AUCLAIR 1996; TOMMASI e LIMA 2002; REGEZI et al. 2008).

O CAC origina-se das células ductais e mioepiteliais provenientes dos ductos intercalados e forma três distintos padrões microscópicos: tubular, cribriforme e sólido. A variante cribriforme é a mais prevalente sendo composta por ilhas de pequenas células com núcleo basofílico, citoplasma claro e muitos espaços pseudocísticos lembrando o aspecto de um “queijo suíço”. Na forma tubular observam-se estruturas semelhantes a ductos ou túbulos. Além disso, essas duas formas arquiteturais são caracterizadas pela participação das células mioepiteliais e epiteliais e são conhecidas pelo comportamento indolente. Já a forma sólida é caracterizada por mostrar

discreta tendência de formar ductos ou espaços pseudocísticos o que a diferencia dos dois outros padrões, sendo também associado à perda das células mioepiteliais (atribuídas como “supressoras de tumor”) e grande atividade mitótica o que lhe confere o comportamento biológico agressivo (REGEZI e BATSAKIS 1977; JONES e BAITON 1990; ELLIS e AUCLAIR 1996; ALTMAN et al. 1997; ALVES et al. 2005; CARLSON et al. 2008; BELL e HANNA 2012).

Clinicamente, é uma neoplasia de crescimento lento e infiltrativo que se apresenta com aumento de volume ou nódulo lobulado de consistência endurecida. (COUP et al. 1997; MCFALL et al. 1997).

O estadio clínico, a localização e o tipo histológico são fatores de importante valor prognóstico. Carcinomas diferenciados, com características tubulares ou cribriformes, têm melhor prognóstico do que as neoplasias sólidas, pouco diferenciadas. Tumores avançados podem infiltrar os nervos, causando dor, parestesia e/ ou paralisia completa, com extensão em estruturas vitais, incluindo o cérebro (NEVILLE et al. 1995; USTÜNDAĞ et al. 2000; COCA-PELAZ et al. 2015).

A natureza infiltrativa do CAC é responsável pela característica tumoral de disseminação local recorrente, a qual pode ocorrer anos após o tratamento cirúrgico e a radioterapia inicial (USTÜNDAĞ et al. 2000; LAURIE e LICITRA 2006; CARLSON et al. 2008; COCA-PELAZ et al. 2015).

Metástase à distância é comum, particularmente tardia, sendo o pulmão o órgão mais comumente afetado, seguido de ossos, fígado e cérebro (CHEN et al. 2007; TETSU et al. 2010; PHUCHARON et al. 2014).

Há descrições de que mesmo pacientes com bom controle local podem desenvolver metástases à distância após 10 anos da primeira terapia. Assim, o CAC é considerado por alguns como sendo uma doença sistêmica virtualmente incurável (CHEN et al. 2007; TETSU et al. 2010; COCA-PELAZ et al. 2015).

A terapia é a ressecção cirúrgica com margem de segurança e radiação pós-operatória. Além disso, a irradiação pode ser útil no controle da doença microscópica após cirurgia inicial ou no tratamento de recorrência local. O tumor, em geral, é pouco responsivo ao tratamento quimioterápico (LAURIE e LICITRA 2006; CHEN et al. 2007; CARLSON et al. 2008; TETSU et al. 2010; ADELSTEIN et al. 2012; COCA-PELAZ et al. 2015).

1.2 CASCATAS MOLECULARES

Durante as últimas décadas importantes avanços tecnológicos vêm auxiliando as diversas áreas de investigação científica a compreender processos biológicos e patológicos de vários sistemas. Nessa linha, o estudo de neoplasias vem sendo beneficiado pela compreensão de cascatas moleculares e alterações genéticas, que por vezes caracterizam determinados padrões de comportamento de diversas neoplasias. A identificação e caracterização sistemática de muitas dessas alterações tem sido, ao longo dos estudos, aplicadas na rotina de manejo dos pacientes para se determinar com maior precisão o diagnóstico, prognóstico e tratamento das neoplasias.

Nesse amplo leque tecnológico, as características histológica e imunoistoquímica de perfis de expressão proteica nos diversos tumores ainda permanecem como padrão-ouro (*gold-standard*) na avaliação de cada caso. A identificação de genes supressores de tumores, oncogenes, cascatas de sinalização, marcadores de proliferação, de angiogênese e de moléculas de adesão têm sido considerados relevantes como ferramentas adicionais no estudo dos tumores em âmbito acadêmico e aplicado. Entretanto, estudos comprobatórios de sua relevância e que apoiem seu emprego na rotina da oncologia ainda são necessários.

Das cascatas sinalizadoras apontadas como importantes na biologia das neoplasias, destaca-se a via do receptor c-kit tirosina quinase, que está relacionado em processos neoplásicos de diversos órgãos (ANDREADRIS et al. 2006; LENNARTSSON e RÖNNSTRAND 2012; PHUCHAREON et al. 2014). Kit (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) foi identificado pela primeira vez em humanos, como marcador de superfície celular na leucemia mielóide aguda (GADD e ASHMAN 1985). Esse gene foi mapeado em humanos no cromossomo 4q12 (MIETTINEN e LASOTTA 2005; ANDREADIS et al. 2006, VILA et al. 2009; LIU et al. 2013).

Desde sua identificação na década de 80, c-Kit é considerado um proto-oncogene, dada sua estreita ligação entre alterações na sua expressão/atividade e desenvolvimento do câncer (PITTONI et al. 2011). Esse gene, também conhecido como CD117, é um receptor transmembrânico tirosina-quinase do tipo III, que tem estrutura semelhante ao receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas – PDGF.

A estrutura do receptor c-Kit, produto do gene Kit, é caracterizada por regiões de ligação extracelulares contendo cinco repetições de imunoglobulinas (codificado pelo éxon 9 do gene Kit), uma sequência transmembrânica com domínio adjacente a membrana (exon 11), dois domínios tirosina quinase intracelular: um nicho ligante de ATP – *ADENOSINA TRIFOSFATO* (exon 13 e 14) e elo de ativação kinase (exon 17) (LIU et al. 2007) (Figura 2).

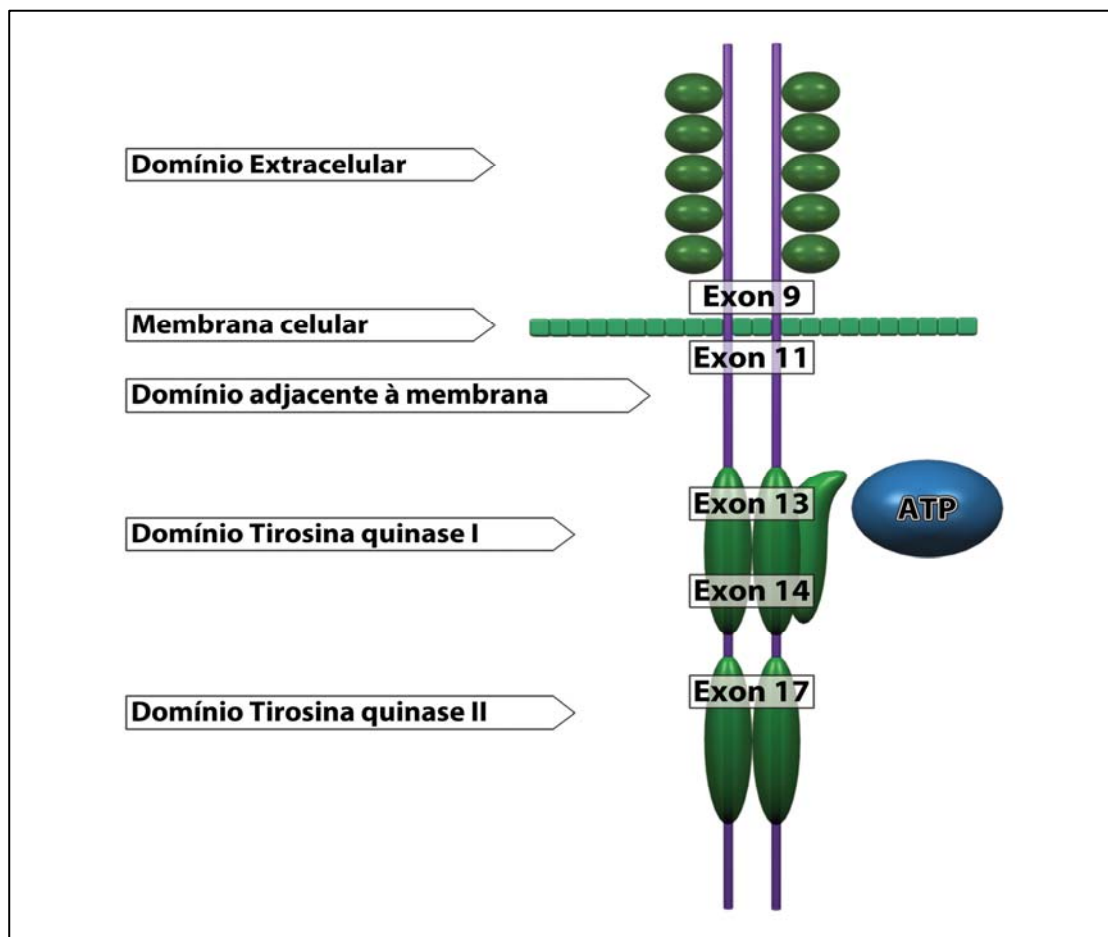


Figura 2 - Estrutura da proteína c-Kit – localização dos éxons

A ativação de Kit é realizada pela dimerização do receptor sob estímulo do seu ligante, o fator de célula-tronco (SCF), também conhecido como ligante de KIT. Depois de ativado, o c-kit induz diversas respostas intracelulares através de cascatas de sinalização de vias como PI3K/AKT - *phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B* e MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase* (RAS - *rat sarcoma viral oncogene homolog*, RAF - *effector of Ras*, MEK - *MAP kinase-ERK kinase* e ERK- *Extracellular Regulated Kinase*) que regulam a proliferação, diferenciação e a sobrevivência celular, além de estimular a hematopoiese e outras células, incluindo melanócitos e células germinativas (LASOTA et al. 2000; VILA et al. 2009; TETSU et al. 2010; LIU et al. 2013; PHUCHAREON et al. 2014).

1.2.1 Via MAPK - *Mitogen-Activated Protein Kinase*

As MAPKs fazem parte de um grupo de enzimas citoplasmáticas da família das proteínas quinases serina-treonina, que transmitem sinais mitogênicos e de diferenciação celular, além de funcionarem como principal efetor da oncoproteína Ras (MCKAY e MORRISON 2007).

Ras e a via ERK/MAPK são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, tais como: fatores de crescimento, neurotransmissores, hormônios polipeptídicos, quimiocinas, entre outros (JOHNSON e LAPADAT 2002; MCKAY e MARRISON 2007; MENDOZA et al. 2011). As MAPK constituem um módulo de três quinases, formando um sistema regulatório que estabelece uma via seqüencial de ativação de proteínas quinase: a MAP tripla quinase (MAPKKK), a MAP dupla quinase

(MAPKK) e a MAP quinase (MCKAY e MORRISON 2007). Na via ERK-MAPK, esses componentes são Ras GTPase e as proteínas quinases Raf, Mek e Erk (MCKAY e MORRISON 2007; MENDOZA et al. 2011).

Quando o receptor tirosina quinase (RTK) é estimulado, O primeiro componente, Raf (que é uma MAPKKK) pode ser ativado tanto por fosforilação quanto por interação com uma proteína de ligação chamada GTP da família Ras (GTPase Ras) próximo a membrana. Esse por sua vez, fosforila a próxima quinase intermediária, MEK 1/2 (que é uma MAPKK). MEK 1/2 forma um complexo citoplasmático com ERK 1/2 (MAPK) inativada; quando MEK 1/2 fosforila ERK 1/2, as duas se separam, e ERK 1/2 ativada transloca-se rapidamente para o núcleo, onde regula a atividade de proteínas nucleares, incluindo fatores de transcrição, como c-myc, c-Jun, etc. A inativação de ERK requer a sua desfosforilação por fosfatases específicas, tais como MKP-1. A forma desfosforilada retorna ao citoplasma e se associa novamente à MEK 1/2 (DHILLON et al. 2007; MENDOZA et al. 2011). A via da MAPK, uma vez fosforilada está envolvida com diversas funções celulares como a proliferação, crescimento, diferenciação, migração e apoptose (Figura 3) (DHILLON et al. 2007; TETSU et al. 2010; MENDOZA et al. 2011).

1.2.2 Via PI3K/ mTor/ Akt - *phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B*

Outro mecanismo também ativado pelo c-kit para o controle da sobrevivência, divisão e metabolismo celular é a via PI3K/Akt/mTOR. Uma vez ativada, a via PI3K/Akt/mTOR pode ser propagada para vários

substratos, incluindo mTOR, um regulador mestre na síntese e tradução de proteínas (ENGSTRÖM et al. 2003; HANELINE et al. 2006; EDLING e HALLBERG 2007; LOPICCOLO et al. 2008; ALTOMARE e KHALED 2012).

Ativação inicial da via ocorre na membrana celular, através de receptores de tirosina quinase após ligação com fatores crescimento, tais como fator de células-tronco e seu receptor c-Kit, receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR) e IGF-1R (insulina-like growth fator-1 receptor), proteína de junção de ancoragem – GAB (GBR2- associated binder), moléculas de adesão celular tais como as integrinas, e oncogenes tais como o Ras (LOPICCOLO et al. 2008; COURTNEY et al. 2010; MENDOZA et al. 2011).

A via PI3K ativada converte seu substrato fosfatidilinositol-4,5-bifosfato (PIP2) ao lipídico fosfatidilinositol-3,4,5-trifosfato (PIP3), processo que pode ser revertido pela proteína PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), que recruta a proteína AKT quinase para a membrana plasmática, onde ela é fosforilada e ativada pela proteína quinase dependente de 3-fosfatidilinositol (PDK-1) e pelo segundo complexo mTOR – mTOR2 (mammalian target of rapamycin 2) (SARBASSOV et al. 2005; LOPICCOLO et al. 2008; MENDOZA et al. 2011). AKT fosforila fatores de sobrevivência, proliferação, e de motilidade celular, bem como o TSC2 (TSC 2 –*tuberous sclerosis complex*), que atua como proteína ativadora de GTPase (GAP) sobre *Ras homologue enriched in brain* (Rheb), permitindo o acúmulo de RhebGTP e consequente ativação de mTORC1 (SANCAK et al. 2007; SENGUPTA et al. 2010; MENDOZA et al. 2011). Uma vez ativado, mTORC1

promove a fosforilação de seus efetores S6K (*p70 ribosomal S6 Kinase*) 4EBP1 (*Translational inhibitor eIF-4E inhibitory protein*) – proteínas envolvidas na biogênese do ribossomo e da tradução de proteína - induzindo à regulação e síntese proteica, angiogênese, crescimento e proliferação celular (HANELINE et al. 2006; EDLING e HALLBERG 2007; EFEYAN e SABATINI 2010; SENGUPTA et al. 2010; MENDOZA et al. 2011).

O mTORC2, regula a sobrevivência, anabolismo e proliferação celular, através da fosforilação de AKT. Foi proposto que mTORC2 seja ativado por fatores de crescimento ou diretamente por PIP3, e diferente do observado em relação ao mTORC1, estudos revelaram que o complexo TSC1/TSC2 promove atividade de mTORC2 por interação com RICTOR de forma independente de Rheb. Contudo, o mecanismo de ativação de mTORC2 não está completamente elucidado, (JACINTO et al. 2004; SARBASSOV et al. 2004, 2005; HUANG et al. 2008; ALESSI et al. 2009).

A via de sinalização do gene Kit está ilustrada na Figura 3.

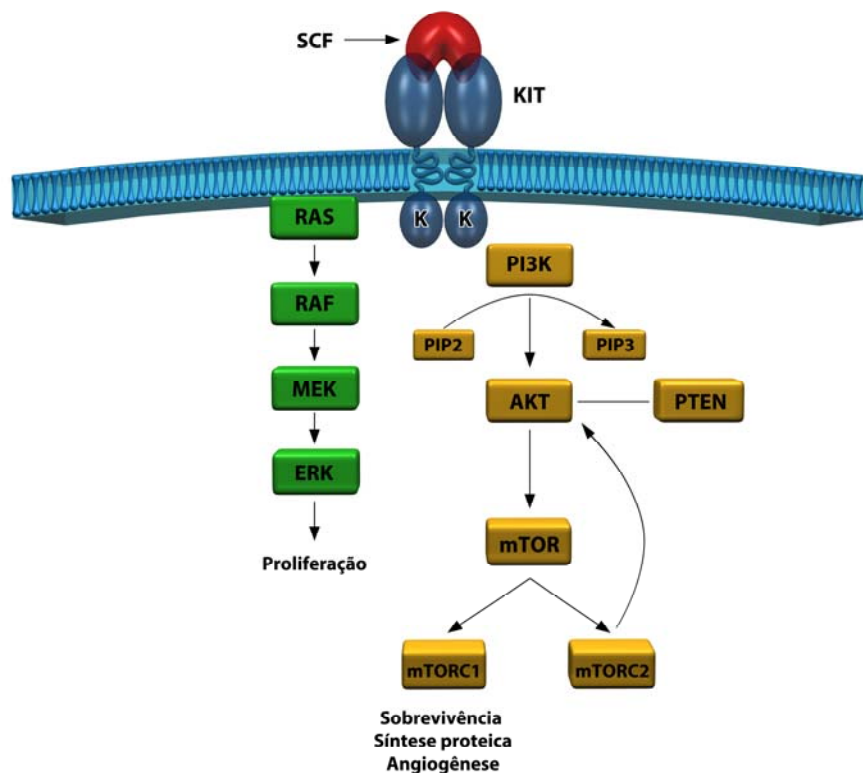


Figura 3 - Via de sinalização do c-kit

Ambas as vias MAPK e PI3K são distintamente ativadas pelo c-kit, mas podem, em alguns casos, estar intimamente relacionadas e co-ativadas; como exemplo, os componentes da via Ras-ERK podem regular positivamente a via PI3K- mTOR1, já que Ras-GTP pode ligar-se diretamente a PI3K. Ou ainda, a proteína AKT pode atuar fosforilando fatores de motilidade, sobrevivência e proliferação celular, como o TSC2 que, por sua vez, pode atuar ativando GTPase sobre Ras (SUIRE et al. 2002; EDLING e HALLBERG 2007; MENDOZA et al. 2011).

Segundo alguns pesquisadores (MIETTINEN e LASOTTA 2005; DHILLON et al. 2007; McCUBREY et al. 2007; LOPICCOLO et al. 2008), em

processos neoplásicos, ambas as vias podem estar hiperativas, resultantes de:

- componentes da via estarem mutados ou superexpressos, como por exemplo Ras, B-Raf, PI3K, PTEN (supressor tumoral), AKT
- Receptores de tirosina quinase podem estar superexpressos ou mutados, como no caso do receptor c-Kit.

Esses eventos, culminam na redução da apoptose, acarretando um aumento da capacidade proliferativa das células e um descontrole nos eventos fisiológicos como é detectado no câncer do pulmão, mieloma múltiplo, câncer da mama, câncer do ovário, câncer do cólon, câncer da próstata, melanoma, carcinoma de células renais, câncer gástrico, câncer de cabeça e pescoço, entre outros (ALKAN e IZBAN 2002; DAVIES et al. 2002; HORIGUCHI et al. 2003; NAM et al. 2003; TERAOKA et al. 2003; KREISBERG et al. 2004; BLOETHNER et al. 2005; DAI et al. 2005; DHILLON et al. 2007; PEREZ-TENORIO et al. 2007; LOPICCOLO et al. 2008).

1.3 FUNÇÃO DO C-KIT EM TUMORES

A proteína c-kit tem papel importante no desenvolvimento de muitos processos embrionários, incluindo a gametogênese, melanogênese e hematopoiese. A ativação patológica da proteína c-kit através ganho de função por mutações pontuais, deleções e duplicações no gene KIT pode desorganizar o crescimento celular e resultar na formação de tumores, como

tem sido demonstrado em neoplasias hematopoiéticas (mastocitose, leucemia mielóide aguda), melanomas, neoplasias ginecológicas, da tireóide, do pulmão, tumores de células germinativas (seminomas) e tumores do estroma gastrointestinal (GIST) (NAEEM et al. 2002; EDWARDS et al. 2003; GUERRIERE-KOVACH et al. 2004; FREIER et al. 2005; MIETTINEN e LASOTTA 2005; VILA et al. 2009; TANG et al. 2010).

PITTONI et al. (2011) dividiram os tumores que apresentam mutações em KIT em 2 grupos distintos:

- Os tumores do primeiro grupo são aqueles derivados da transformação de células que usualmente expressam c-kit, e são geralmente caracterizados por ganho de função em KIT, conferindo fosforilação ligante-independente e ativação da cascata. Nesses tumores, a ativação aberrante de c-kit é o evento fundamental molecular para determinar seu desenvolvimento. Foram incluídos nesse grupo: tumores de células germinativas, tumores do estroma gastrointestinal (GIST), leucemias mielóide aguda e melanomas.
- O segundo grupo de tumores expressando c-kit, compreende neoplasias derivadas de células que usualmente não expressam c-Kit. A esse grupo pertencem: tumores de pequenas células do pulmão, carcinoma adenoide cístico, carcinoma de cólon e tumores do cérebro. Mutações em KIT são descritas como raras nessas neoplasias, mas em vários casos, têm sido observado que os tumores são capazes de fornecer estimulação a c-kit através de sua própria produção de SCF.

Em geral, as neoplasias das glândulas salivares – benignas ou malignas – têm morfologia diversa e complexa, o que reflete a complexidade do próprio órgão. No passado, a análise dos diferentes tipos de neoplasias das glândulas salivares focou-se na sua complexa histologia e tipos celulares. Nesse contexto, a hipótese mais popular advogada pelo renomado patologista BATSAKIS et al. (1989), versava na presença de células-tronco progenitoras na região proximal e distal do sistema ductal, e que cada porção da glândula salivar daria origem a tipos distintos de tumores. Esta teoria, ainda muito útil para a compreensão das neoplasias das glândulas salivares, não explica mais completamente os fenômenos patogénéticos das neoplasias que acometem essas glândulas. Apesar disso, buscam-se, nos dias de hoje, evidências mais concretas acerca da localização das células-tronco das glândulas salivares, o que auxiliaria sobremaneira na compreensão de seus fenômenos regenerativos. Ainda, baseada nessa teoria, a comunidade científica, especialmente os patologistas, balizam as classificações dos tumores salivares, o que norteia as condutas clínico-cirúrgicas dos pacientes acometidos por esse diverso grupo de doenças: a maioria dos tumores derivados dos segmentos principais dos ductos das glândulas salivares, são, em geral, mais agressivos, ao passo que aqueles derivados do segmento terminal, tem características de “baixo grau” (MILANO et al. 2007).

Com a evolução dos conhecimentos em biologia básica e molecular, a teoria morfológica associada aos entendimentos a respeito da diferenciação celular e à classificação dos tumores aliou-se a estudos da expressão

diferencial de genes relacionados a células-tronco, deu origem a novos campos na compreensão destes tumores: a presença de duas populações celulares na evolução biológica e heterogeneidade de alguns dos tumores das glândulas salivares. Assim também surgiu uma nova corrente na pesquisa das neoplasias das glândulas salivares, que pauta a sua heterogeneidade morfológica e de comportamento biológico a alterações genéticas distintas em cada grupo tumoral. Essa linha de pensamento une agora os conhecimentos angariados e sedimentados no passado, as pesquisas do presente e as possibilidades de um melhor manejo deste grupo de doenças com benefícios para os pacientes no futuro.

O nosso grupo, vem ao longo dos anos investigando processos biológicos no desenvolvimento e nas neoplasias das glândulas salivares (LOURENÇO e KAPAS 2005; LOURENÇO et al. 2007a e b; IANEZ et al. 2010; TESHIMA et al. 2011). Muitas neoplasias das glândulas salivares têm sua origem reputada ao ducto intercalado, entre elas, as mais comuns: adenoma pleomórfico (AP) e o carcinoma adenoide cístico (CAC) (VAN DER WAL et al. 1998; MILANO et al. 2007). Em trabalho recente de dissertação de mestrado, observamos que a expressão de c-Kit está relacionada ao compartimento considerado como nicho de células-tronco das glândulas salivares – o ducto intercalado. Além disso, foi observada a presença de c-Kit em formações luminais pequenas de permeio aos lençóis de células mioepiteliais neoplásicas e em algumas regiões, notou-se células isoladas para o marcador c-Kit no adenoma pleomórfico, o que foi intrigante, pois a origem dessas células permanecem por ser esclarecidas (Figura 4).

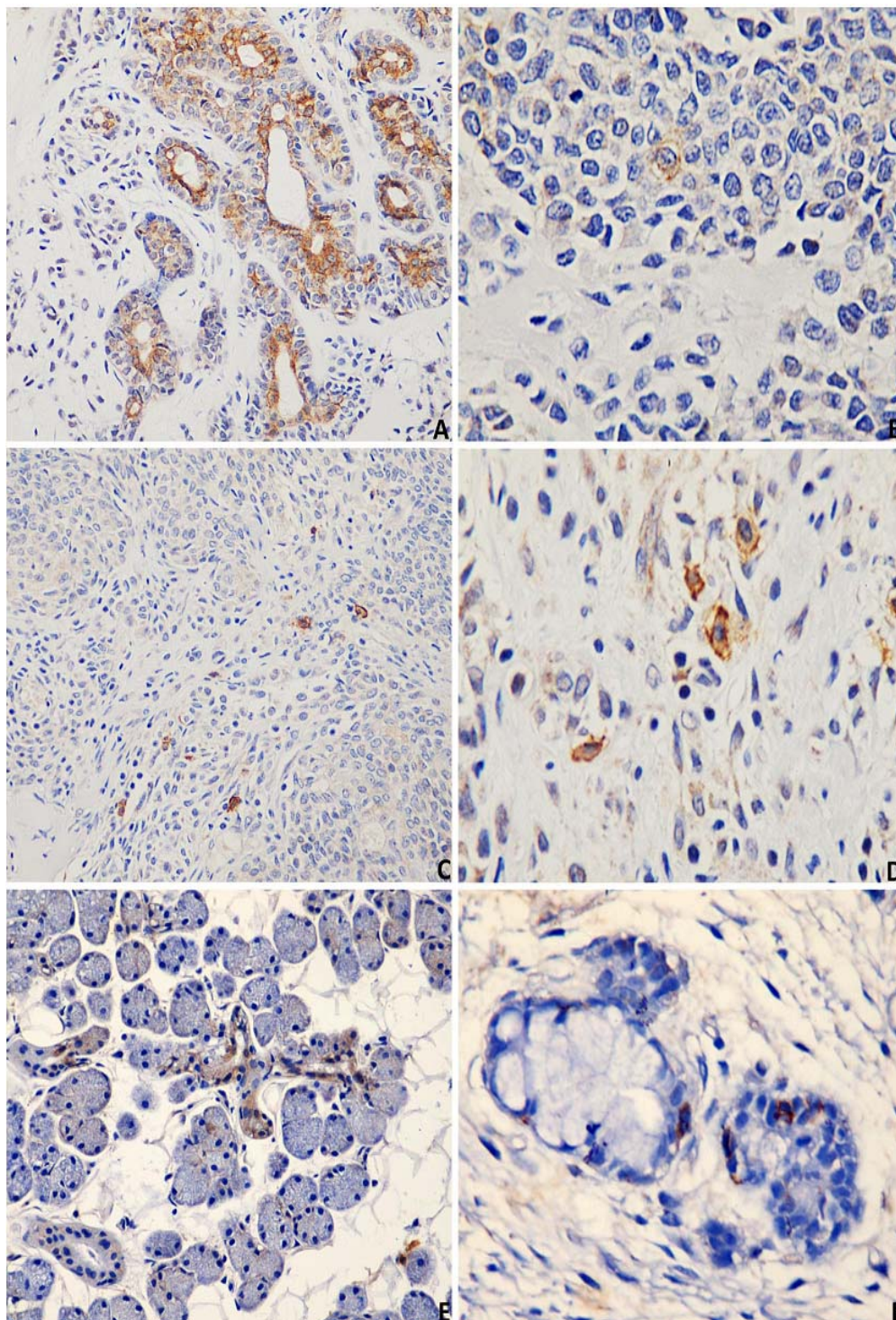


Figura 4 - Imunoexpressão dos marcadores c-kit no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta. A: Formações luminais positivas para c-kit, de permeio a lençol de células mioepiteliais neoplásicas (aumento original X250). B-D: Expressão da proteína c-kit em células isoladas no parênquima neoplásico e matriz mixóide. (aumento original X400; X250; X400, respectivamente). E: Expressão do c-kit nas células luminais dos ductos intercalares na glândula salivar adulta. (aumento original X250). F: Expressão do c-kit nas células luminais dos ductos intercalares rudimentares na junção com lóbulos acinares na fase de botão terminal da morfogênese glandular. (aumento original X400).

Recentemente, a expressão de KIT foi identificada em sete tipos de tumores das glândulas salivares e, dentre eles, o carcinoma adenoide cístico têm sido o mais documentado com uma frequência de expressão de KIT que varia de 67 a 100% (AZOULAY et al. 2005; FREIER et al. 2005; VILA et al. 2009). Em contraste, a expressão de c-kit é raramente aumentada em outros tumores de cabeça e pescoço. Por essa razão, a avaliação da expressão de c-kit é utilizada para auxiliar o diagnóstico de CAC.

A explicação genética para a superexpressão de KIT no carcinoma adenoide cístico de glândula salivar ainda é alvo de investigação. Alguns pesquisadores têm procurado mutações ativadoras no gene c-kit neste tipo tumoral (HOLST et al. 1999; JENG et al. 2000; LIN et al. 2005; SØRENSEN et al. 2006; VILA et al. 2009). HOLST et al. (1999) e JENG et al. (2000), demonstraram a expressão da proteína KIT em 27 de 30 (90%) e 20 a 25 (80%) casos, respectivamente, de carcinoma adenoide cístico de glândula salivar. Já em tumores estromais gastrointestinal, 65-92% dos tumores são relatados ativação/mutação de KIT, a maioria dos quais estão localizados à região adjacente a membrana envolvendo o éxon 11.

No estudo de VILA et al. (2009), mutações pontuais de ganho de função no éxon 11 foram observados em 7 dos 8 casos estudados, sendo menos frequentes mutações nos éxons 9, 13 e 17, o que pode explicar o envolvimento na superexpressão de KIT em carcinomas adenoide cístico de glândulas salivares.

1.4 REGULAÇÃO PÓS-TRANSCRICIONAL DA EXPRESSÃO DO C-KIT

A regulação da expressão do c-kit envolve diversas interações com proteínas e receptores da membrana celular e do meio extracelular. Além da interação com outras proteínas, a regulação pós-transcricional da expressão do c-kit também é considerada importante. Esse tipo de regulação é principalmente realizado por meio de pequenos RNAs não-codificantes que regulam a expressão gênica, os microRNAs (miRNAs) (LYNAM-LENNON et al. 2009; IHLE et al. 2015).

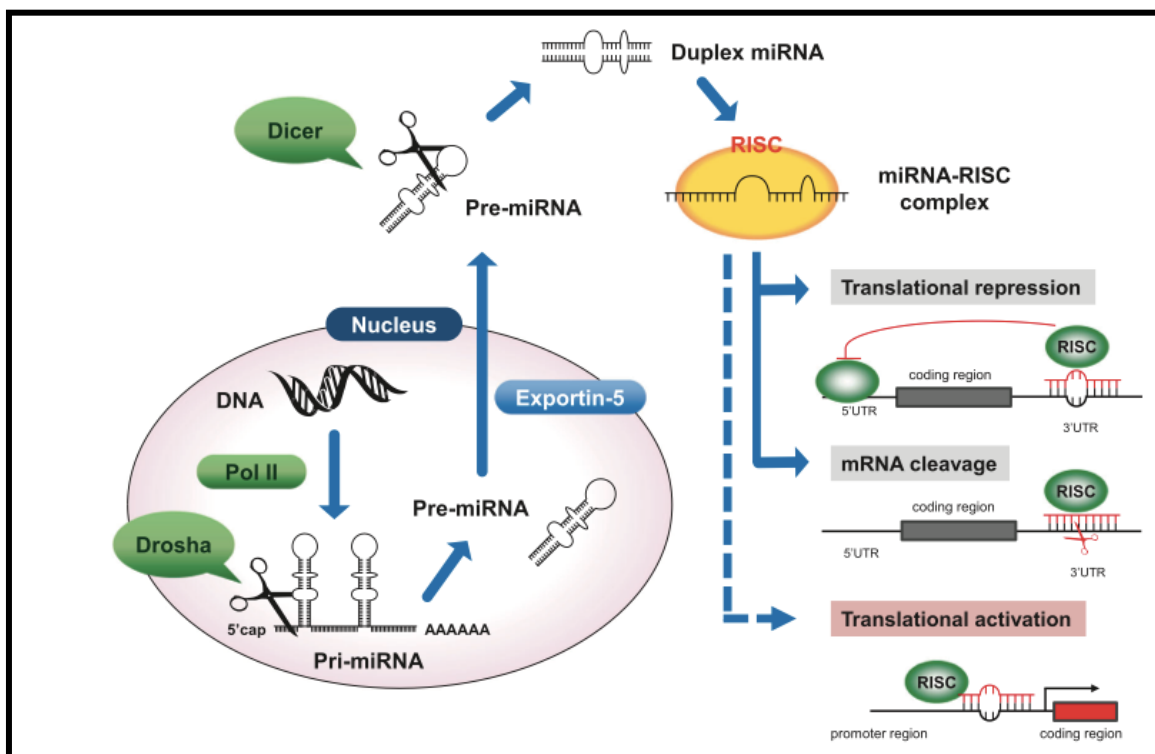
Essas moléculas possuem cerca de 22 nucleotídeos e exercem seus efeitos inibitórios ligando-se principalmente à região 3' UTR não traduzida de RNAs mensageiros específicos (RNAs alvo). O RNA mensageiro ligado ao miRNA não é traduzido, levando a baixos níveis de proteína, ou então o RNA pode ser degradado, resultando em baixo nível do próprio RNA mensageiro (VOLINIA et al. 2006; LYNAM-LENNON et al. 2009).

1.4.1 Biogênese do miRNA

A biogênese dos miRNAs é um processo sob o controle de várias enzimas e complexos enzimáticos. Este processo inicia-se no núcleo, onde ocorre a transcrição dos genes codificadores de miRNAs, na maioria dos casos, mediada pela RNA polimerase II (SCHMITTGEN 2008). Os nucleotídeos dos transcritos primários dos miRNAs (pri-miRNA) formam estruturas secundárias (SUN e TSAO 2008) que são compostas pelas

regiões “*stem*” onde dois segmentos de RNA com bases complementares são pareados, e as regiões “*loop*” nas quais os pares de bases não são complementares, constituindo, assim, alças circulares (*hairpin*) (SUN e TSAO 2008). Os pri-miRNA são processados por um complexo que inclui a Drosha e uma proteína de ligação de RNA de dupla fita, resultando em uma estrutura menor designada miRNA precursor (pre-miRNA), sendo em seguida exportada para o citoplasma por meio da exportina-5 (SINGH et al. 2008; IORIO e CROCE 2012).

Ao nível citoplasmático, os pre-miRNAs são processados pela Dicer, que remove a alça na estrutura *stem-loop*, resultando na formação de um RNA de cadeia dupla de aproximadamente 22 nucleotídeos. Este dúplex de RNA é incorporado ao complexo de silenciamento induzido por RNA (RISC), que inclui a proteína argonauta como figura central na biogênese do miRNA (SCHMITTGEN 2008; SUN e TSAO 2008). Assim, as duas fitas de miRNA são separadas: uma das fitas é degradada e a outra permanece associada ao RISC e constitui o miRNA maduro. Como parte deste complexo, a cadeia-simples madura liga seus sítios complementares ao mRNA alvo (SCHMITTGEN 2008). Os miRNAs que se ligam perfeitamente aos seus alvos de mRNA na região 3’ não traduzida induzem a degradação do mesmo ao passo que a repressão da tradução é induzida quando essa ligação ocorre de forma imperfeita (figura 5). Em contrapartida, alguns miRNAs ligam-se na região promotora dos genes e ativam os níveis de transcrição de genes alvo (Figura 5) (CALIN e CROCE et al. 2006; LYTLE et al. 2007; GOTO et al. 2015).



Fonte: Modificado de GOTO et al. (2015).

Figura 5 - Biossíntese do Mirna. Genes do miRNA são transcritos no núcleo, mediado principalmente pela RNA polimerase II, gerando transcritos primários (pri-miRNA). Drosha cliva o pri-miRNA, produzindo o precursor molecular (pré- miRNA). O pré-miRNA é transportado para o citoplasma pelo Exportina-5 e pelo Ran-GTP. Ocorre então o processamento do pré-miRNA pela Dicer, que gera um RNA de aproximadamente 22 nucleotídeos, composta pela fita única de miRNA maduro e uma molécula de miRNA fragmentado*. O complexo miRNA/miRNA* é incorporado ao complexo indutor de silenciamento de RNA (RISC). O fragmento de miRNA* é degradado, ao passo que a molécula de miRNA maduro orienta o RISC com o mRNA alvo.

Existem centenas de miRNAs codificados no genoma humano – mais de 25000 miRNAs maduros em humanos (<http://www.mirbase.org/>, Release 21) e milhares de mRNAs alvo, e, apesar de não terem suas funções totalmente esclarecidas, a descoberta dos miRNAs sugere que seu papel seja fundamental em diversos processos biológicos como hematopoiese, proliferação, apoptose, diferenciação (GAROFALO et al. 2012; SU et al.

2016).

Estudos recentes demonstraram o envolvimento de miRNA em todos os principais processos biológicos, incluindo o desenvolvimento tumoral como consequência de expressões aberrantes, o que eventualmente pode representar um novo alvo para apontar novas abordagens terapêuticas, particularmente em câncer, já que os miRNAs modulam múltiplas vias oncogênicas (LYNAM-LENNON et al. 2009; GAROFALO et al. 2012).

1.4.2 miRNA e Câncer

Diversos trabalhos têm demonstrado alterações na expressão de miRNAs em câncer colorretal, mama, linfomas, câncer do pulmão, glioblastoma, câncer da próstata, câncer da mucosa oral, entre outros (METZLER et al. 2004; VOLINIA et al. 2006; YANAIHARA et al. 2006; TRAN et al. 2007; ZHANG et al. 2007; KONDO et al. 2008; SASSEN et al. 2008; ZHANG et al. 2009; GOTO et al. 2015).

De fato, tanto a perda como o ganho de função dos miRNAs, podem contribuir para o desenvolvimento de neoplasias através de uma série de diferentes mecanismos, favorecendo por exemplo, a proliferação descontrolada e sobrevivência celular, resultando em um comportamento tumoral invasivo. Pesquisas revelam que os miRNAs podem atuar nos processos neoplásicos como oncogenes (*oncomiRs*) ou como genes supressores tumorais/ genes oncosupressores (*oncosupressor-miRs*) (GASCHE e GOEL 2012; SU et al. 2016). Os miRNAs oncogênicos podem encontrar-se superexpressos em tumores malignos, estimulando a

proliferação celular e inibindo a ação de genes supressores tumorais e genes que controlam a apoptose (COWLAND et al. 2007; ZHANG et al. 2007; GASCHE e GOEL 2012). Por outro lado, alguns miRNAs apresentam expressão reduzida em tumores malignos, sendo considerados supressores tumorais. Estes miRNAs atuam contra o desenvolvimento de neoplasias através da inibição de oncogenes (COWLAND et al. 2007; SASSEN et al. 2008; GASCHE e GOEL 2012).

Levando esse aspecto em consideração, alguns microRNAs podem ter funções distintas em células ou situações diferentes: pode ser oncogênico em uma célula ou tecido específico, mas supressor de tumor em outro, dependendo do contexto celular e genes alvos (GAROFALO et al. 2012; GASCHE e GOEL 2012). Nesse contexto, sabe-se que os miR-221/-222 são superexpressos na maioria dos tumores epiteliais, por outro lado, esses miRNAs podem desempenhar um papel de supressor tumoral em células eritroleucêmicas por inibição da eritropoiese através da diminuição da expressão do receptor c-Kit (FELLI et al. 2005; VOLINIA et al. 2006; GAROFALO et al. 2012).

FELICETTI et al. (2008a), relataram o gene PLZF (*Promyelocytic leukaemia zinc finger*) como um repressor de miR-221 e miR-222 por ligação direta a sua região reguladora. Especificamente, o silenciamento do gene PLZF em melanomas desbloqueia o miR-221 e miR-222, que por sua vez controla a progressão da neoplasia através de diminuição da expressão de p27Kip1/CDKN1B e do receptor de c-kit, levando aumento da proliferação e diferenciação das células do melanoma. Estudo funcionais *in vitro* e *in vivo*,

confirmaram o papel fundamental do miR-221/-222 na regulação da progressão do melanoma humano, sugerindo então, que terapias direcionadas à supressão do miR-221 e miR-222 podem ser benéficas em pacientes com melanoma avançado (FELICETTI et al. 2008a e b).

Outros estudos em GIST, mostraram que a superexpressão dos miR-222 e miR-17/20A, que tem como alvo o KIT, inibiram significativamente a proliferação celular e induziram a apoptose em linhagens celulares de GIST-T1 (GITS et al. 2013). Ainda nesse contexto, HE et al. (2005), demonstraram um aumento da regulação desses dois miRNAs no carcinoma papilar da tireóide caracterizada pela perda de c-Kit. Contudo, os efeitos funcionais desses miRNAs ainda não são completamente compreendidos (IHLE et al. 2015).

Contudo, poucos estudos têm avaliado o papel dos miRNAs no desenvolvimento dos tumores de glândula salivar, e vale ressaltar que são demasiadamente escassos estudos avaliando a expressão do miRNAs em tumores de glândulas salivares (CHIOSEA et al. 2008; ZHANG et al. 2009; MATSE et al. 2013; KISS et al. 2015).

Apenas MATSE et al (2013) investigaram os perfis de miRNAs na saliva de pacientes com tumores malignos e de pacientes com tumores benignos da glândula parótida. Eles observaram que a expressão de quatro miRNAs, entre eles o miRNA-222, foi maior em amostras de saliva de pacientes com tumor maligno em comparação com a expressão em amostras de saliva de pacientes com um tumor benigno (sensibilidade 69%, especificidade de 95%). Esses resultados mostraram-se promissores para o

desenvolvimento de uma ferramenta de diagnóstico não invasivo para o diagnóstico de tumores nas glândulas salivares.

Baseados nos estudos supracitados e considerando a importância da via do c-kit em neoplasias, nos propomos responder as seguintes indagações:

- 1) A expressão do c-kit e vias relacionadas com a proliferação celular é comum em neoplasias derivadas do ducto intercalado das glândulas salivares?
- 2) Há regulação pós-transcricional do c-kit em neoplasias benignas e malignas das glândulas salivares?

Para responder essas questões, utilizamos como modelo de estudo o adenoma pleomórfico e o carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares.

2 PROPOSIÇÃO

Os mecanismos de Patologia Geral descritos em vários estudos têm enfatizado a importância de oncogenes na iniciação e progressão do desenvolvimento de tumores de glândulas salivares. A mutação de oncogenes e a superexpressão de fatores de crescimento ou de receptores de fatores de crescimento, como c-kit, têm sido identificados com fatores importantes na gênese dos tumores dessas glândulas. Contudo, há evidências contraditórias na literatura sobre a expressão de c-kit e seu valor nos tumores das glândulas salivares.

Para esclarecer os achados de nossas pesquisas prévias acerca do c-kit (IANEZ 2011) e dos fatores relacionados de sua via, particularmente as vias MAPK e PI3K/AKT, nos tumores das glândulas salivares adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico, pretendemos:

- Avaliar a localização das proteínas das vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK utilizando a técnica de imunoistoquímica;
- Avaliar a expressão de miRNA na tentativa de identificar a participação de mecanismos pós-transcricionais na expressão da proteína c-Kit;
- Associar a expressão das proteínas e dos miRNAs com os dados clínico-patológicos e demográficos de cada caso.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Foram selecionados 50 casos de adenoma pleomórfico operados entre os anos de 1991 a 2010, e 47 casos de carcinoma adenoide cístico operados entre os anos de 1989 a 2011, provenientes dos arquivos da Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center para o processo de imunoistoquímica. Desses 47 casos selecionados, 9 casos foram cedidos pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/ Ribeirão.

Para a expressão dos miRNAs foram selecionados 25 casos de adenoma pleomórfico operados durante os anos de 2000 a 2006 e 14 casos de carcinoma adenoide cístico operados durante os anos de 2000 a 2012, provenientes de tecidos congelados, provenientes do Banco de Tumores do A.C. Camargo Cancer Center, estes foram submetidos à análise histológica por um patologista qualificado para avaliação da porcentagem do tecido de interesse.

Foi realizada a coleta de dados clínico-demográficos dos prontuários médicos.

Critérios de inclusão:

1. Foram incluídos na amostra do trabalho todos os casos que apresentaram dados clínico-demográficos nos prontuários para posterior análise estatística;
2. Foram incluídos todos os casos que apresentaram material embocado em parafina, correspondente a peça cirúrgica inicial,

armazenados nos arquivos do Departamento de Patologia Cirúrgica do A.C.Camargo Cancer Center.

3. Somente amostras de tecido congeladas com pelo menos 70% de células tumorais foram incluídos no estudo e seguiram para a extração do RNA no Laboratório de Extração de Macromoléculas do A.C.Camargo Câncer Center, para a realização da técnica de RT-PCR (miRNA).

Critérios de exclusão:

Casos que não apresentaram material suficiente, em avaliação prévia, para serem submetidos às análises propostas no trabalho foram excluídos.

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de cada caso foram recuperadas dos arquivos do Departamento de Patologia Cirúrgica do A.C.Camargo Câncer Center e foram reanalisadas por 2 patologistas para checagem das estruturas neoplásicas presentes.

3.1 IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes de 3 μ m preparados em lâminas de vidro silanizadas, foram desparafinizados em dois banhos de xilol a temperatura ambiente por 10 minutos cada. A seguir os cortes foram re-hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 70%, respectivamente) para a remoção de pigmentos formólicos, e posteriormente, água corrente por 5 minutos.

Recuperação dos epítomos antigênicos e outras peculiaridades do protocolo foram determinados durante a etapa experimental do trabalho, conforme observado no quadro 1.

Após a lavagem em água corrente e água destilada, realizou-se a imersão do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) 3 vezes por 5 minutos cada, com o intuito de se bloquear a peroxidase endógena tecidual.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, as lâminas foram incubadas com solução *Protein block* (DakoCytomation, Carpinteria, USA) por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais.

Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário diluído em diluente contendo 0,05mol/L de tampão Tris-HCL e 0,1% de Tween 20 (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*, DakoCytomation, Carpinteria, USA) e colocadas a 4°C, *overnight* em câmara úmida. Informações sobre os anticorpos e etapas específicas do protocolo estão descritas no quadro 1.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em tampão PBS pH 7.4, durante 5 minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com anticorpo secundário, contendo *pool* de anticorpo anti-camundongo e anti-coelho, utilizando o *kit Advanced™ HRP* (DakoCytomation, Carpinteria, USA) em 2 etapas de 30 minutos cada.

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador 3´3- diaminobenzidina - DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) que evidencia a reação por meio de coloração castanha.

Os cortes foram lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafinizados em três banhos de xilol, e montados em resina *permountTM* para o exame ao microscópio de luz.

Os controles negativos das reações supracitadas foram realizados por meio da incubação de espécimes com soro não-imune. Os controles positivos foram utilizados de acordo com informações do fabricante de cada anticorpo. Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

As reações foram analisadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa e semi-quantitativa, onde foram considerados negativos, < 5% de células positivas.

Os dados foram fotografados com equipamento fotográfico digital.

Quadro 1 - Anticorpos utilizados e sua procedência

Anticorpos	Clone	Protocolo	Diluição	Controle positivo	Fabricante
c-Kit	T595	Edta- Tris	1:500	Pele	Abcam
PI3K Beta	Policlonal	Citrato pH;6,0	Pronto p/ uso	Placenta	Abcam
AKT fosforilada	587F11	Citrato pH;6,0	1:50	Ca Cólon	Cell Signaling
mTOR fosforilada	49F9	Citrato pH;6,0	1:100	Mama Normal	Cell Signaling
Ras	F132-62	Citrato pH;6,0	1:20	Pele	Abcam
B-Raf	1H12	Citrato pH;6,0	1:500	Pele	Abcam
MEK-1 fosforilada	E237	Citrato pH;6,0	1:100	Pele	Abcam
MEK-2 fosforilada	T394	Citrato pH;6,0	1:300	Pele	Abcam
ERK 1/2 fosforilada	T202/T185	Edta- Tris	1:600	Tu Tireóide/ Baço	Epitomics

3.2 MIRNA

3.2.1 Extração do RNA

O RNA foi extraído de amostras de tumor de glândula salivar utilizando-se o kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Venlo, Netherlands) de acordo com as recomendações do fabricante. A avaliação da qualidade dessas amostras foi feita através de leitura espectrofotométrica no equipamento Nanodrop ND-1000 (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) e também através de corrida eletroforética utilizando-se *chip* RNA 6000 Nano do equipamento Bioanalyzer (Agilent Technologies).

3.2.2 Síntese do cDNA

A reação de síntese do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” TaqMan MicroRNA RT Reverse Transcription (Applied Biosystems), conforme descrição a seguir:

A reação foi feita em um volume final de 15,0µl contendo 10 ng de RNA total; 1,5 µl de RT Buffer; 0,15µl de dNTP Mix (100 mM); 3,0µl de RT Primer (*stem-loop* primer, específico para miRNAs maduros); 1,0µl da enzima MultiScribe Reverse Transcriptase; 0,19µl de inibidor de RNase. A reação foi incubada a 16°C por 30 minutos, 42°C por 30 minutos e 85°C por 5 minutos em um termociclador.

3.2.3 Amplificação do cDNA e análise da expressão de microRNAs

O ensaio de amplificação foi realizado de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” TaqMan Universal PCR Master Mix (2X), conforme descrição a seguir:

A reação foi feita em um volume final de 20,0µl contendo 1,33µl de cDNA, 10,0µl do TaqMan Universal Master Mix (2X) (contendo MgCl₂, dATP, dCTP, dGTP, dUTP, enzima DNA polimerase modificada (AmpliTaqGold)), 1,0µl de cada ensaio (TaqMan MicroRNA Assays contendo a sonda e os oligonucleotídeos específicos para os miRNAs a serem estudados). Foram analisados os miRNAs miR-221 e miR-222, descritos como relacionados ao c-Kit (FELICETTI et al. 2008b).

A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto, precedidos por um período de 50 °C por 2 minutos e 95 °C por 10 minutos. A amplificação foi feita no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido. Dessa forma, os valores quantitativos (Ct) são obtidos a partir do ciclo limiar onde o aumento do sinal fluorescente associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

O nível de expressão dos microRNAs foi quantificado relativamente à expressão de dois *small nucleolar RNAs* (RNU44 e RNU48) e também foi normalizado de acordo com uma amostra calibradora (*Pool* de 10 amostras de glândula salivar não-neoplásica). O resultado final (n_{microRNA}) foi expresso

como um aumento ou diminuição da expressão de um microRNA em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma: $n_{\text{microRNA}} = 2^{-(\Delta\text{Ct amostra} - \Delta\text{Ct calibrador})}$, onde ΔCt da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do microRNA estudado do valor médio de Ct do microRNA usado como controle.

As amostras que apresentarem valores de Ct acima de 38 foram desconsiderados da análise.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre a expressão das proteínas c-Kit, Ras, B-Raf, MEK-1 fosforilada, MEK-2 fosforilada, ERK1/2 fosforilada, PI3K beta, AKT fosforilada e mTOR fosforilado e os parâmetros clínico-demográficos foram avaliados por meio do teste de qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. O mesmo teste foi realizado para a associação dos miRNAs 221 e 222 e os parâmetros clínicos-demográficos.

Para o cálculo das probabilidades de sobrevida câncer-específica considerou-se o intervalo de tempo transcorrido entre a data da cirurgia e a data do óbito (evento de interesse) ou do último seguimento (censura). As taxas de sobrevida foram calculadas pelo estimador de Kaplan-Meyer, sendo as curvas comparadas pelo teste de Log-rank.

Todos os valores de p (*p-values*), foram baseados em análise estatística bi-caudal e $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa SPSS 20.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

4 RESULTADOS

4.1 IMUNOISTOQUÍMICA

4.1.1 Adenoma pleomórfico

Foram utilizados 50 casos com diagnóstico confirmado de adenoma pleomórfico com material disponível nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Câncer Center.

4.1.1.1 Dados clínico-demográficos

Os casos de adenoma pleomórfico incluídos no estudo acometeram 32 mulheres e 18 homens de idades que variaram entre 12 e 78 anos de idade, com maior incidência durante as 3^a e 6^a décadas de vida (média de idade de 43,8). Dos 50 pacientes acometidos pela neoplasia, 24 (48,0%) eram da raça branca. A parótida foi a glândula salivar mais acometida, (35 casos), seguida da glândula submandibular (9 casos). Três casos foram diagnosticados na cavidade oral (palato – 3 casos). A localização do adenoma pleomórfico não foi detalhada em 3 casos. O tamanho dos adenomas pleomórficos operados variou de tumores com até 4cm no maior eixo (33 casos) e tumores acima de 4cm no seu maior eixo (17 casos).

Do total de casos, apenas 8 adenomas pleomórficos recidivaram (16% dos casos): estes casos acometeram mulheres, sendo 7 na parótida e 1 no palato. Apenas 2 destes tumores eram maiores que 4cm (Tabela 1).

Tabela 1 - Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico.

Dados Clínicos-Demográficos	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
	32 (64%)	18 (36%)	50 (100)
Idade			
Até 40 anos	13 (26,0)	12 (24,0)	25 (50,0)
Acima de 40 anos	19 (48,0)	6 (12,0)	25 (50,0)
Raça			
Branco	16 (32,0)	8 (16,0)	24 (48,0)
Não Brancos	3 (6,0)	3 (6,0)	6 (12,0)
Sem informação	8 (16,0)	12 (24,0)	20 (40,0)
Localização			
Parótida	25 (50,0)	10 (20,0)	35 (70,0)
Submandibular	4 (8,0)	5 (10,0)	9 (18,0)
Palato	2 (4,0)	1 (2,0)	3 (6,0)
Outro	1 (2,0)	2 (4,0)	3 (6,0)
Tamanho			
Eixo menor que 4,0 cm	24 (48,0)	9 (18,0)	33 (66,0)
Eixo maior que 4,0 cm	8 (16,0)	9 (18,0)	17 (34,0)
Recidiva			
Parótida	7 (87,5)	0 (0,0)	7 (87,5)
Submandibular	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Palato	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (12,5)
Total	8 (100)	0 (0,0)	8 (100)

4.1.1.2 Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos adenomas pleomórficos revelou que morfológicamente os adenomas pleomórficos incluídos no estudo eram compostos por células mioepiteliais de fenótipos plasmocitóide, fusiforme, epitelióide e estrelária, bem como células epiteliais (ductais). Estas células mostravam-se arranjadas em formações arquiteturais diversas – lençol, ninhos e formações luminais, bem como células isoladas. Metaplasia

escamosa, condróide, mixóide, hialina e calcificações foram observadas nos tumores analisados.

Exemplos desses padrões estão ilustrados na Figura 6.

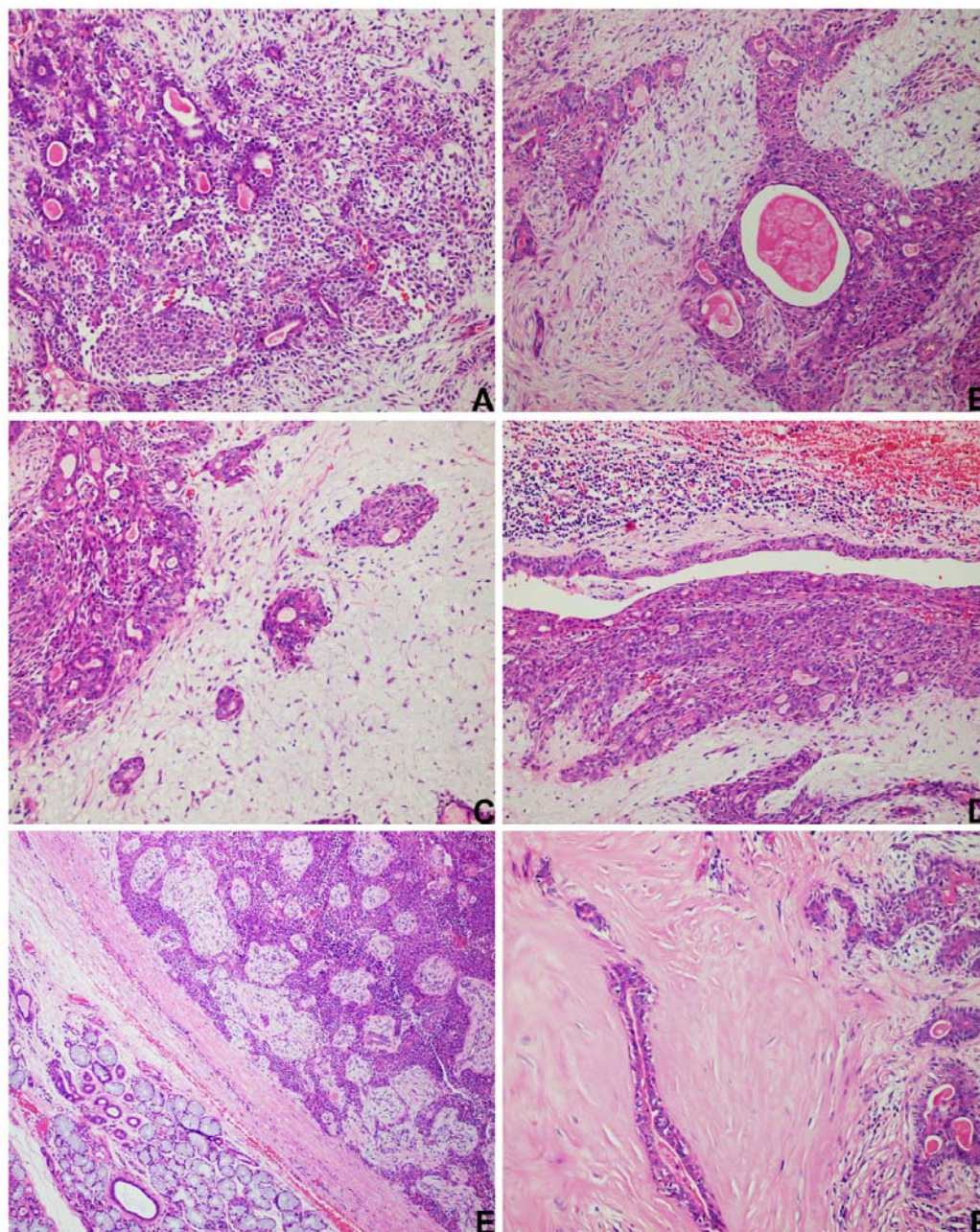


Figura 6 - Exemplos dos aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico. A e B: Células mioepiteliais e epiteliais arranjadas em lençol/ ductos neoplásicos. (H/E, aumento original X250); C e D e E: Células epiteliais e mioepiteliais em arranjos compactos e ductais e estroma mixóide. Observar em D e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

4.1.2 Carcinoma adenoide cístico

Foram utilizados 47 casos diagnosticados como carcinoma adenoide cístico, sendo 38 casos provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Câncer Center, e, 9 casos provenientes da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto.

4.1.2.1 Dados clínico-demográficos

Os casos de carcinomas adenoide cístico incluídos no estudo acometeram 30 mulheres e 17 homens de idades que variaram entre 14 e 76 anos de idade, com maior incidência durante a 5ª e 6ª décadas de vida (média de idade de 48,7). O tumor foi mais frequente na glândula submandibular (16 casos), seguida da glândula parótida (11 casos). O tamanho dos CACs operados variou de tumores com até 4cm no maior eixo (26 casos) e tumores acima de 4cm no seu maior eixo (20 casos). O tipo histológico mais frequente foi o cribriforme (20 casos). Não houve invasão vascular em 27 casos; invasão perineural foi detectada em 25 casos. Em nossa casuística, 32 pacientes não tiveram acometimento linfonodal (32 casos) e o tratamento mais utilizado foi a radioterapia adjuvante (29 casos).

Do total de casos de carcinoma adenoide cístico, 15 casos apresentaram recidiva local (31,9% dos casos): estes casos acometeram 7 mulheres e 8 homens. Além disso, 29 pacientes (61,7%) desenvolveram metástase, sendo 16 mulheres e 13 homens e a maioria delas no pulmão. Do total de pacientes, 21 (44,7%) foram a óbito devido a doença (Tabela 2).

Tabela 2 - Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico

Dados Clínicos-Demográficos	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
	30 (63,8)	17 (36,2)	47 (100)
Idade			
Até 40 anos	10 (21,3)	4 (8,5)	14 (29,8)
Acima de 40 anos	20 (42,5)	13 (27,7)	33 (70,2)
Raça			
Branco	16 (34,0)	10 (21,3)	26 (55,3)
Não Branco	4 (8,5)	2 (4,3)	6 (12,8)
Sem Informação	10 (21,3)	5 (10,6)	15 (31,9)
Etilista			
Sim	4 (8,5)	10 (21,3)	14 (29,8)
Não	22 (46,8)	6 (12,8)	28 (59,6)
Sem Informação	4 (8,5)	1 (2,1)	5 (10,6)
Tabagista			
Sim	7 (14,9)	9 (19,1)	16 (34,0)
Não	21 (44,7)	8 (17,0)	29 (61,7)
Sem Informação	2 (4,3)	0 (0,0)	2 (4,3)
Localização tumoral			
Parótida	6 (12,8)	5 (10,6)	11 (23,4)
Submandibular	11 (23,4)	5 (10,6)	16 (34,0)
Palato	6 (12,8)	3 (6,4)	9 (19,2)
Outro	7 (14,9)	4 (8,5)	11 (23,4)
Tamanho			
Eixo menor que 4,0 cm	19 (40,4)	7 (14,9)	26 (55,3)
Eixo maior que 4,0 cm	10 (21,3)	10 (21,3)	20 (42,6)
Sem Informação	1 (2,1)	0 (0,00)	1 (2,1)
Tipo Histológico			
Cribriforme	12 (25,5)	8 (17,0)	20 (42,5)
Tubular	4 (8,5)	0 (0,0)	4 (8,5)
Sólido	3 (6,4)	4 (8,5)	7 (14,9)
Cribriforme e Tubular	4 (8,5)	2 (4,3)	6 (12,8)
Cribriforme e Sólido	1 (2,1)	1 (2,1)	2 (4,3)
Cribriforme, Tubular e Sólido	3 (6,4)	0 (0,0)	3 (6,4)
Sem Informação	3 (6,4)	2 (4,3)	5 (10,6)
Invasão vascular			
Sim	3 (6,4)	4 (8,5)	7 (14,9)
Não	19 (40,4)	8 (17,0)	27 (57,4)
Sem Informação	8 (17,0)	5 (10,6)	13 (27,7)

Cont/ Tabela 2

Dados Clínicos-Demográficos	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
Invasão Perineural			
Sim	17 (36,2)	8 (17,0)	25 (53,2)
Não	8 (17,0)	4 (8,5)	12 (25,5)
Ignorado	5 (10,6)	5 (10,6)	10 (21,3)
Linfonodos Acometidos			
Sim	6 (12,8)	4 (8,5)	10 (21,3)
Não	20 (42,5)	12 (25,5)	32 (68,1)
Ignorado	4 (8,5)	1 (2,1)	5 (10,6)
Tratamento			
Só Cirurgia	4 (8,5)	1 (2,1)	5 (10,6)
Radioterapia neoadjuvante e	0 (0,0)	1 (2,1)	1 (2,1)
Quimioterapia Adjuvante	2 (4,3)	2 (4,3)	4 (8,6)
Quimioterapia e Radioterapia	4 (8,5)	4 (8,5)	8 (17,0)
Radioterapia Adjuvante	9 (19,1)	20 (42,5)	29 (61,7)
Recidiva	7 (46,7)	8 (53,3)	15 (100)
Metástase	16 (55,2)	13 (44,8)	29 (100)
Local Metástase			
Pulmão	12 (41,4)	7 (24,1)	19 (65,5)
Osso	2 (6,9)	1 (3,4)	3 (10,3)
Outros	2 (6,9)	3 (10,3)	5 (17,2)
Não informado	0 (0,0)	2 (6,9)	2 (6,9)
Óbito	12 (57,1)	9 (42,9)	21 (100)

4.1.2.2 Análise Histopatológica

A análise histopatológica dos carcinomas adenoides císticos revelou que em nosso estudo foram incluídos carcinomas adenoide císticos dos três tipos citados na literatura: cribriforme, que é morfológicamente composto por células mioepiteliais e ductais com espaços císticos lembrando o aspecto de um “queijo suíço; tubular, também composto por células ductais e mioepiteliais formando estruturas semelhantes a túbulos, e o tipo sólido, onde há uma prevalência das células ductais/ epiteliais. Exemplos desses padrões estão ilustrados na Figura 7.

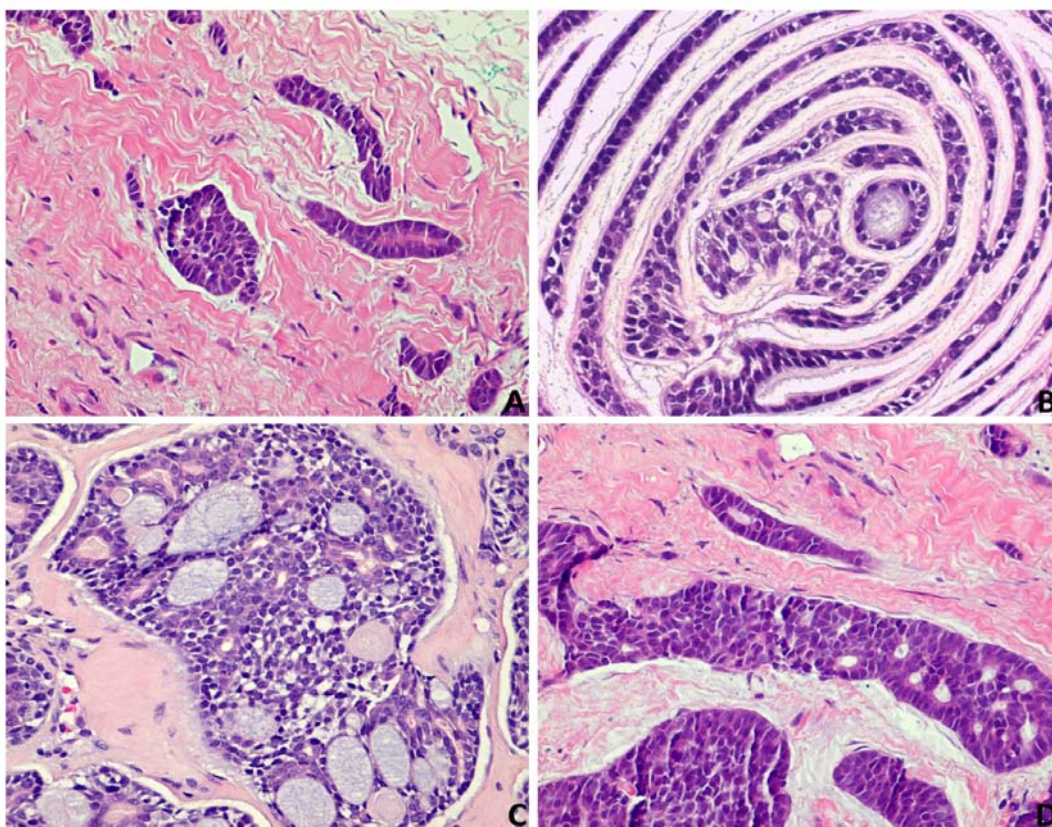


Figura 7 - Exemplos dos aspectos histopatológicos do carcinoma adenoide cístico. A: Carcinoma Adenoide Cístico: Padrão tubular (H/E, aumento original X250); B: Carcinoma Adenoide Cístico: Padrão túbulo cribriforme (H/E, aumento original X250); C: Carcinoma Adenoide Cístico: Padrão cribriforme (H/E, aumento original X250); D: Carcinoma Adenoide Cístico: Padrão sólido com pequenas aberturas lumbais (H/E, aumento original X250).

4.1.3 Reações Imunoistoquímicas

Foram realizadas pesquisas para os marcadores c-Kit, PI3K beta, mTOR fosforilada, AKT fosforilada, RAS, B-Raf, MEK-1 fosforilado, MEK-2 fosforilado e ERK 1/2 fosforilado (Tabelas 3 e 4). Os resultados dessa pesquisa, bem como exemplos do padrão de marcação de cada proteína estão ilustrados nas Figuras 8 a 14.

Tabela 3 - Resultados da expressão imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana nas amostras de adenoma pleomórfico

Proteínas	Membrana (%)	Citoplasma (%)	Núcleo (%)	Núcleo e Citoplasma (%)	Negativo (%)
c-Kit	43 (86,0)	00 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	07 (14,0)
PI3K Beta	0 (0,0)	24 (48,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	26 (52,0)
AKT fosforilada	0 (0,0)	02 (4,0)	26 (52,0)	02 (4,0)	20 (40,0)
mTOR fosforilada	0 (0,0)	39 (78,0)	01 (2,0)	0 (0,0)	10 (20,0)
Ras	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	50 (100)
B-Raf	0 (0,0)	31 (62,0)	0 (0,0)	09 (18,0)	10 (20,0)
MEK-1 fosforilada	0 (0,0)	20 (40,0)	01 (2,0)	0 (0,0)	29 (58,0)
MEK-2 fosforilada	0 (0,0)	11 (22,0)	11 (22,0)	13 (26,0)	15 (30,0)
ERK 1/2 fosforilada	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	50 (100)

Tabela 4 - Resultados da expressão imunoistoquímica dos marcadores nos padrões citoplasmático, nuclear e de membrana nas amostras de carcinoma adenoide cístico

Proteínas	Membrana (%)	Citoplasma (%)	Núcleo (%)	Núcleo e Citoplasma (%)	Negativo (%)
c-Kit	45 (95,7)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	02 (4,3)
PI3K Beta	0 (0,0)	08 (17,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	39 (83,0)
AKT fosforilada	0 (0,0)	01 (2,1)	06 (12,8)	06 (12,8)	34 (72,3)
mTOR fosforilada	0 (0,0)	31 (66,0)	01 (2,1)	03 (6,4)	12 (25,5)
Ras	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	47 (100)
B-Raf	0 (0,0)	34 (72,3)	0 (0,0)	13 (27,7)	0 (0,0)
MEK-1 fosforilada	0 (0,0)	12 (25,5)	01 (2,1)	0 (0,0)	34 (72,3)
MEK-2 fosforilada	0 (0,0)	18 (38,3)	04 (8,5)	06 (12,8)	19 (40,4)
ERK 1/2 fosforilada	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	47 (100)

4.1.3.1 c-kit

Células positivas para c-Kit foram identificadas em formações luminais pequenas de permeio aos lençóis de células mioepiteliais neoplásicas, além de raras células isoladas em áreas focais no parênquima tumoral dos adenomas pleomórficos (Figura 8).

Já nos carcinomas adenoide císticos, mostraram um padrão específico de marcação: positivo na membrana das células ductais e negativos nas células mioepiteliais. Tipos sólidos com áreas tubulares, predominante mioepitelial com regiões ductais, foram positivos exclusivamente nessas células (Figura 8).

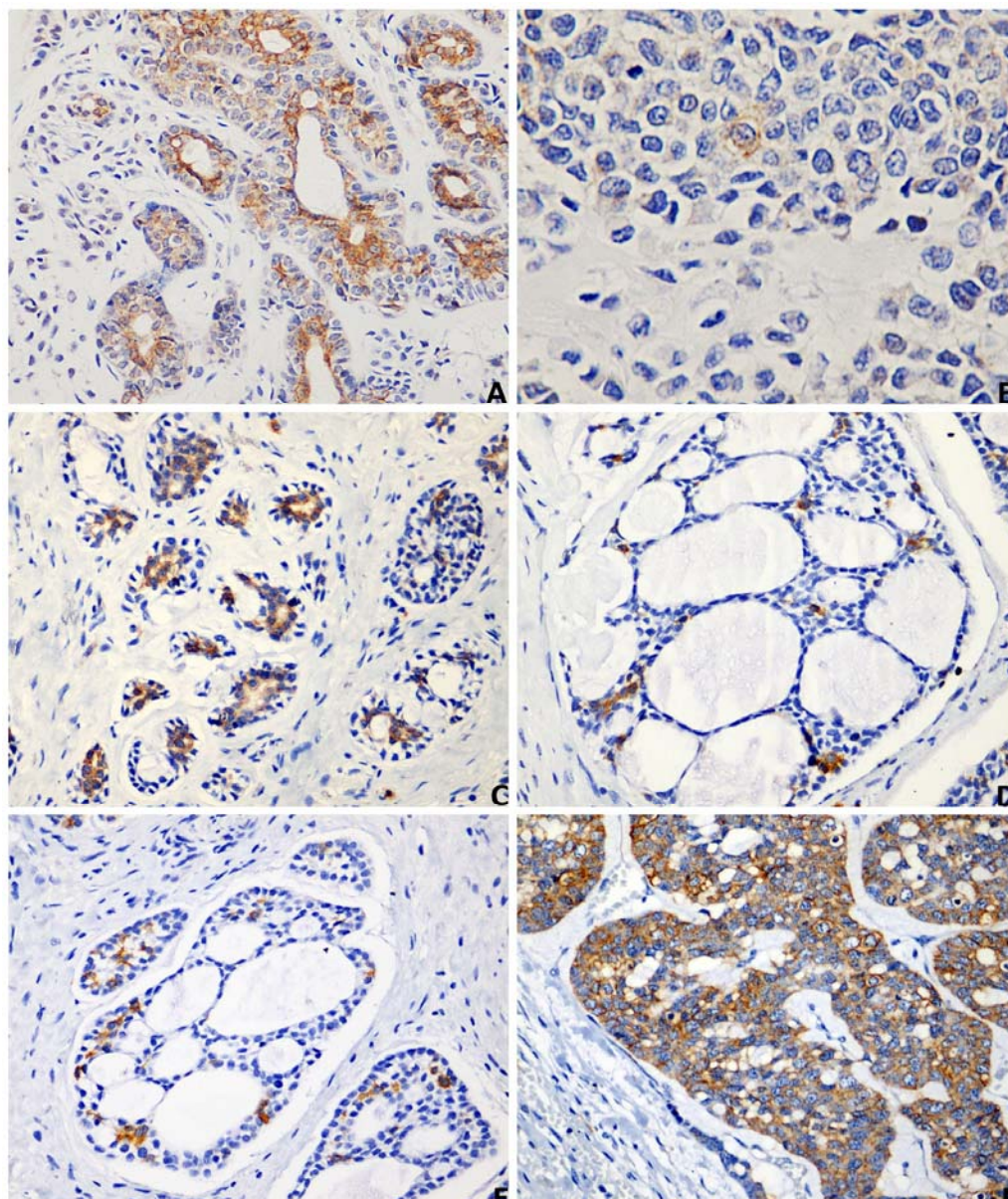


Figura 8 - Imunoexpressão do marcador c-Kit. A: Positividade de c-kit em formações luminais de permeio ao lençol de células mioepiteliais neoplásicas no adenoma pleomórfico (aumento original X250); B: c-Kit positivo na membrana de células isoladas em áreas focais no adenoma pleomórfico (aumento original X400); C – F: Carcinoma adenoide cístico: Células ductais positivas para o marcador c-Kit (aumento original X250);

4.1.3.2 PI3K beta

Células epiteliais e algumas células mioepiteliais plasmocitóides, foram positivas para a proteína PI3K beta em 48% dos casos próximas à cápsula tumoral no adenoma pleomórfico (Figura 9). Os outros 52% dos casos foram negativos para o marcador.

Já no carcinoma adenoide cístico, a maioria dos casos não expressou o marcador PI3K beta (83%), porém houve positividade citoplasmática para as células mioepiteliais e epiteliais nas áreas cribriformes nos outros 17% dos casos (Figura 9).

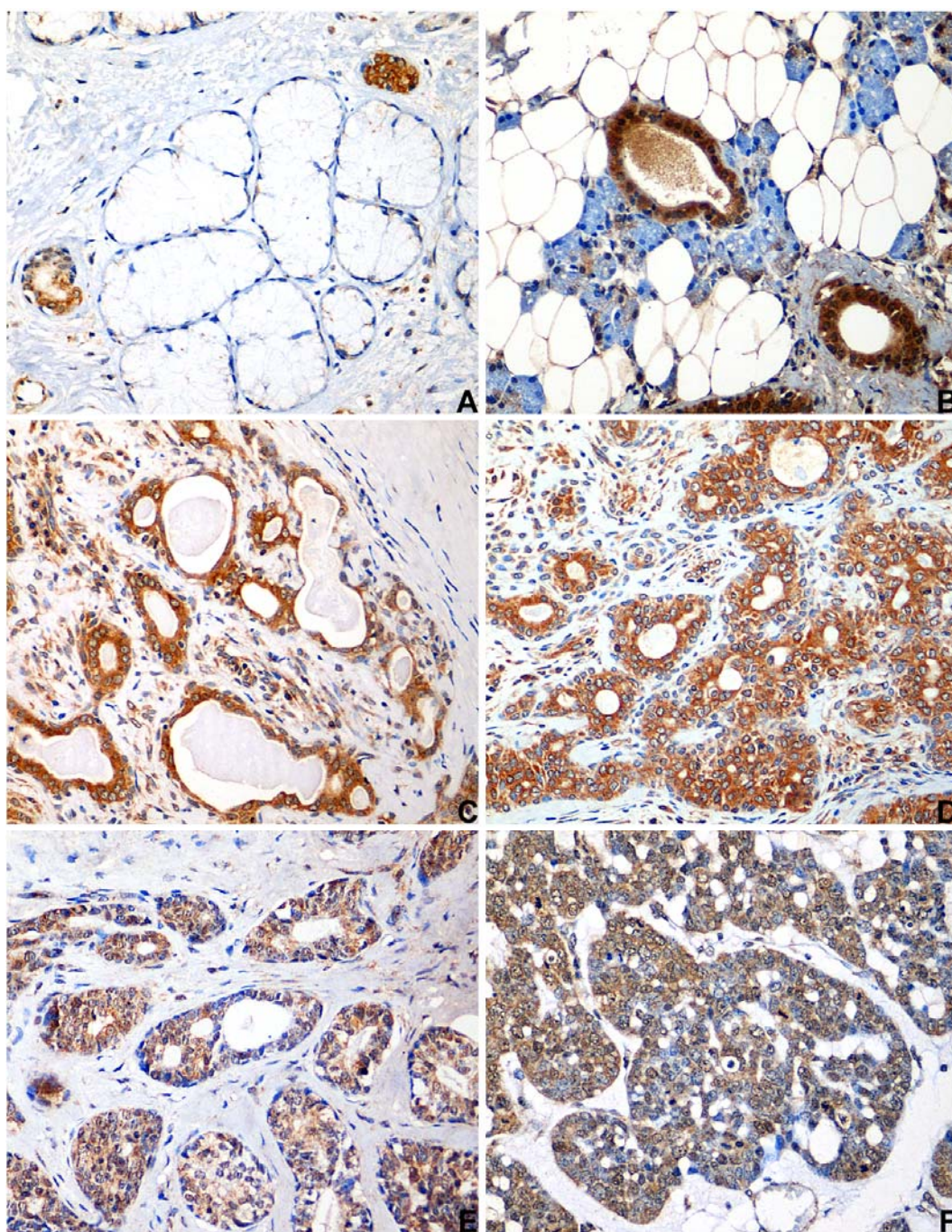


Figura 9 - Imunoexpressão do marcador PI3K. A e B: PI3K beta positivo no citoplasma das células epiteliais da glândula salivar normal (glândula mucosa em A e glândula parótida em B) (aumento original X400); C – D: Células epiteliais e mioepiteliais plasmocitóides positivas para PI3K beta no adenoma pleomórfico (aumento original X250); E – F: Positividade citoplasmática das células epiteliais e mioepiteliais em áreas cribriformes (F) para PI3K beta no carcinoma adenoide cístico (aumento original X250)

4.1.3.3 AKT fosforilada

Células positivas para p-AKT foram observadas em ilhas de células mioepiteliais plasmocitóides e em células epiteliais em meio à matriz condroide e mixóide do adenoma pleomórfico principalmente no núcleo de 60,0% dos casos. Já os outros 40,0% foram negativos (Figura 10).

No carcinoma adenoide cístico, a maioria dos casos não expressou a proteína p-AKT (72,3%). Porém, nos outros 27,7% dos casos, foram observadas células positivas para o marcador em células epiteliais e mioepiteliais nas regiões sólidas e cribriformes (Figura 10).

4.1.3.4 mTOR fosforilada

Expressão positiva para p-mTOR foi observada no citoplasma das células epiteliais e em poucas células mioepiteliais neoplásicas esparsas em meio ao parênquima tumoral no adenoma pleomórfico na maioria dos casos (80,0%) (Figura 10).

Já no carcinoma adenoide cístico foi observada uma positividade citoplasmática em células epiteliais e algumas mioepiteliais das áreas cribriformes em 75,5% dos casos. O restante dos casos permaneceu negativo (25,5%) (Figura 10).

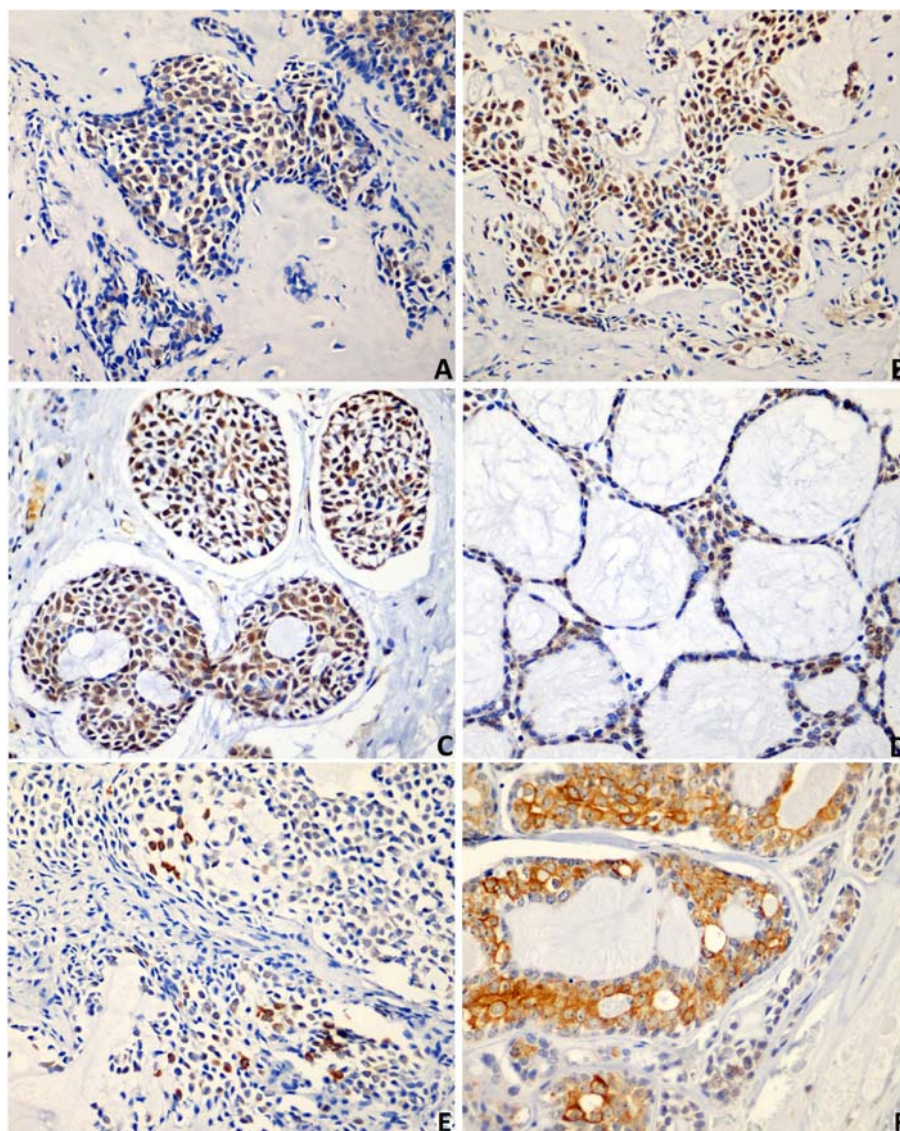


Figura 10 - Imunoexpressão dos marcadores AKT fosforilada e mTOR fosforilada. A – B: Células mioepiteliais positivas para AKT em ilhas de células mioepiteliais em meio á matriz condroide e mixóide no adenoma pleomórfico (aumento original X250); C – D: Células mioepiteliais positivas em regiões sólidas (C) e cribiformes (D) no carcinoma adenoide cístico (aumento original X250); E: Positividade de mTOR no citoplasma das células mioepiteliais neoplásicas esparsas no adenoma pleomórfico (aumento original X250); F: mTOR positivo no citoplasma das células epiteliais e mioepiteliais das regiões cribriformes do carcinoma adenoide cístico (aumento original X250).

4.1.3.5 RAS

Não foram observadas células positivas para a proteína Ras tanto no adenoma pleomórfico como no carcinoma adenoide cístico.

4.1.3.6 B-Raf

Citoplasma das células epiteliais foram positivas para a proteína B-Raf, enquanto as células mioepiteliais foram negativas no adenoma pleomórfico das glândulas salivares na maioria dos casos (80,0%) (Figura 11.1).

Já no carcinoma adenoide cístico, todos os casos foram positivos para a proteína (100%). A positividade variou: em alguns casos observou-se células mioepiteliais e epiteliais positivas, como nos tipos tubulares, entretanto, em outros tipos histológicos, como o cribriforme, somente as células epiteliais (luminais) foram positivas para B-Raf (Figura 11.2).

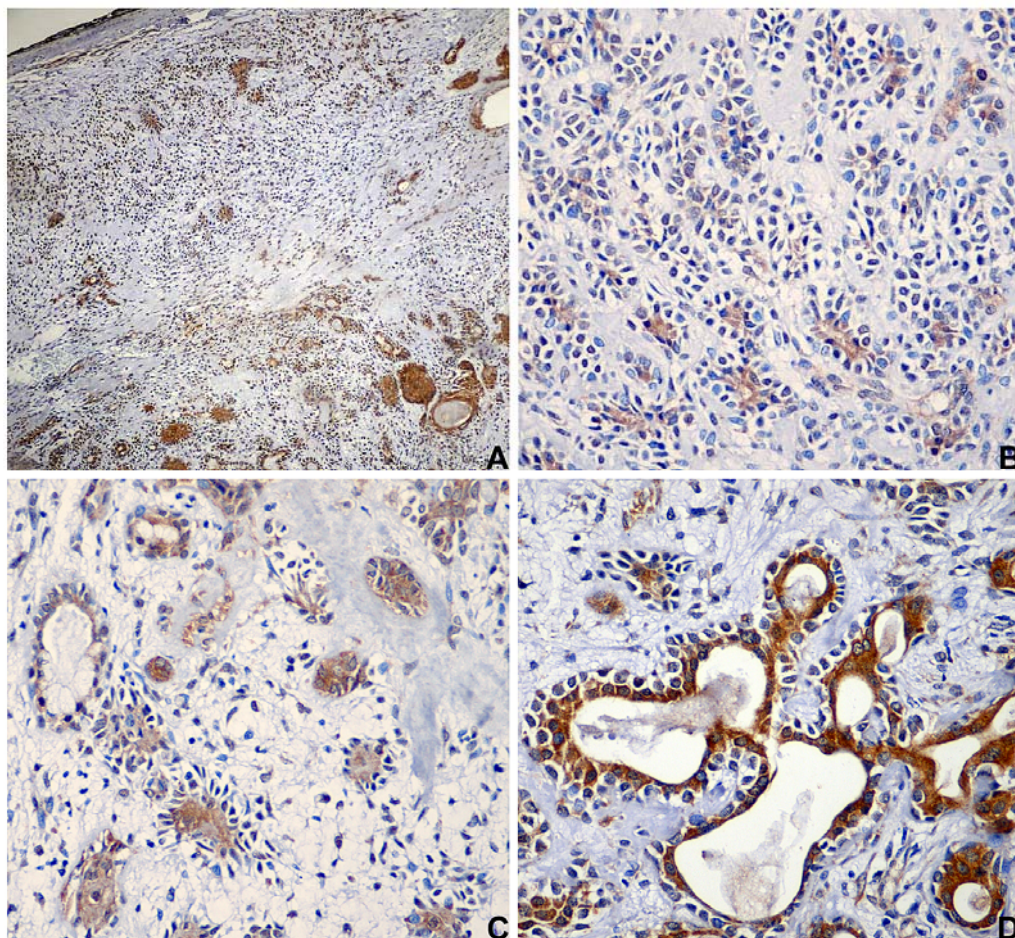


Figura 11.1 - Imunoexpressão do marcados B-Raf no adenoma pleomórfico. A – D: Adenoma pleomórfico: Células epiteliais (luminais) positivas para o marcador B-raf (aumento original X40, X250, X250 e X400, respectivamente).

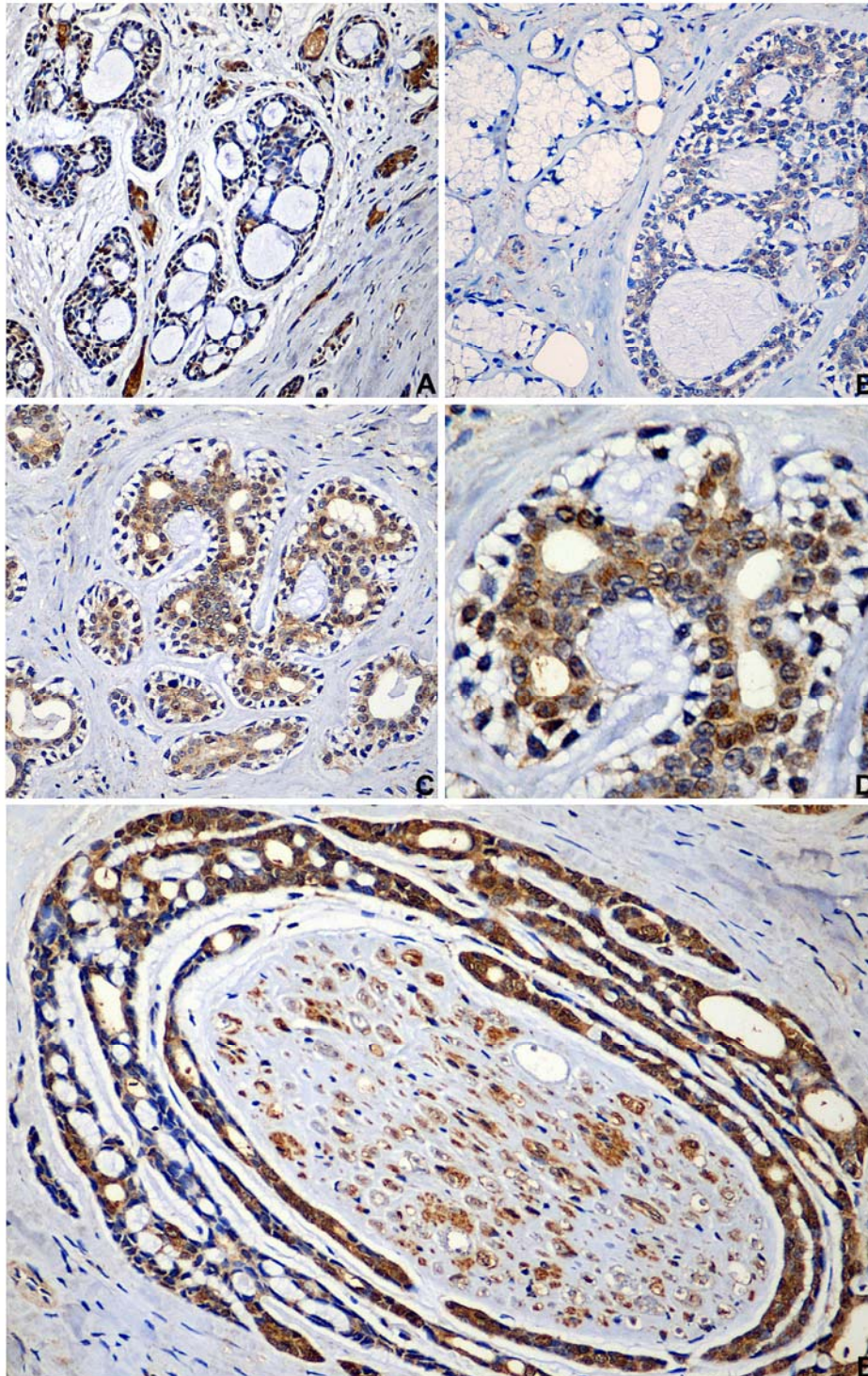


Figura 11.2 - Imunoexpressão do marcador B-Raf no carcinoma adenoide cístico. A-E Carcinoma adenoide cístico: positividade para o marcador B-Raf nas células epiteliais (luminais da neoplasia nas suas várias formas de apresentação. Notar que algumas células mioepiteliais esparsas também apresentam positividade para o B-Raf (D). Observar a positividade do marcador B-Raf em área de infiltração perineural. Aumento original X100, X250, X250, X400, X250, respectivamente.

4.1.3.7 MEK-1 fosforilada

Células positivas para a proteína p-MEK-1 foram identificadas na área periférica próxima a cápsula e em áreas densamente celulares do adenoma pleomórfico, em 42,0% dos casos. Os outros 58,0% dos casos foram negativos para a proteína.

Porém no carcinoma adenoide cístico, apenas em alguns casos observou-se positividade focal para a proteína p-MEK-1 (27,6%) (Figura 12).

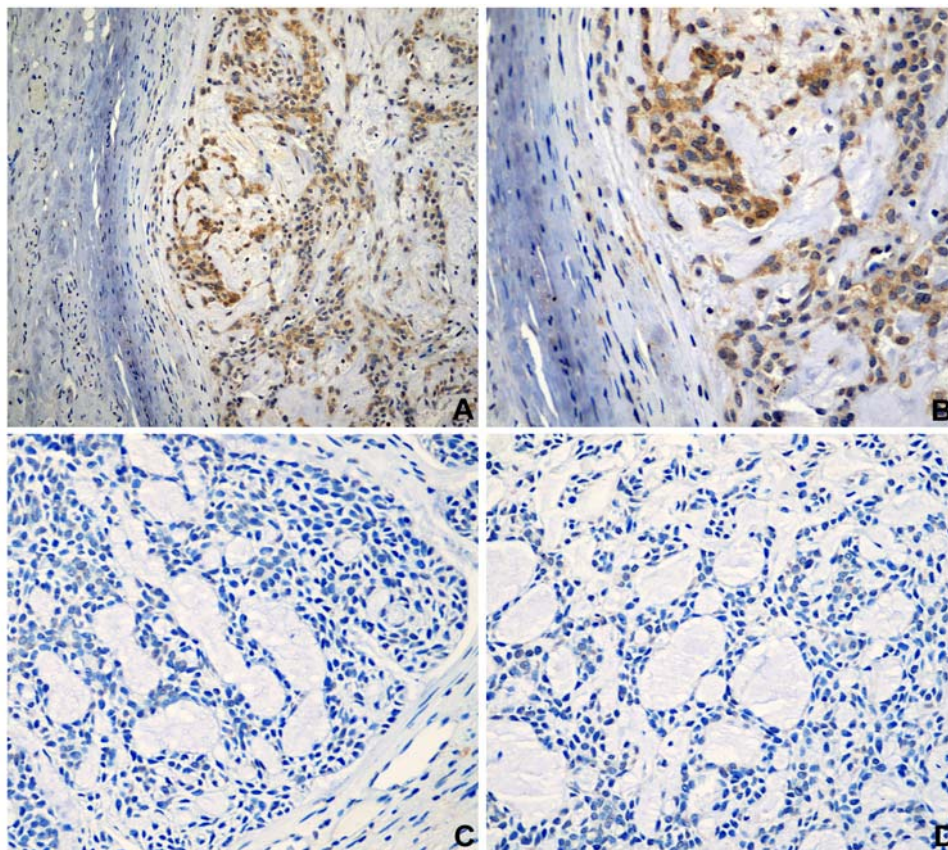


Figura 12 - Imunoexpressão do marcador MEK-1 fosforilada. A e B: adenoma pleomórfico: expressão de p-MEK-1 no citoplasma das células neoplásicas próximas da pseudocápsula tumoral. Aumento original X100 e X400, respectivamente; C e D: carcinoma adenoide cístico: raras células com expressão fraca de p-MEK-1 são observadas em alguns casos. Aumento original X250 e X250, respectivamente.

4.1.3.8 MEK-2 fosforilada

No adenoma pleomórfico observou-se um predomínio de expressão nuclear para p-MEK-2 nas células epiteliais. Porém em algumas áreas encontrou-se marcação citoplasmática, inclusive em células mioepiteliais (48,0%).

Expressão positiva para p-MEK-2 foi observada principalmente no citoplasma das células epiteliais das formações ductais; nas células mioepiteliais notou-se expressão nuclear do p-MEK-2 na maioria dos CAC (Figuras 13.1 e 13.2).

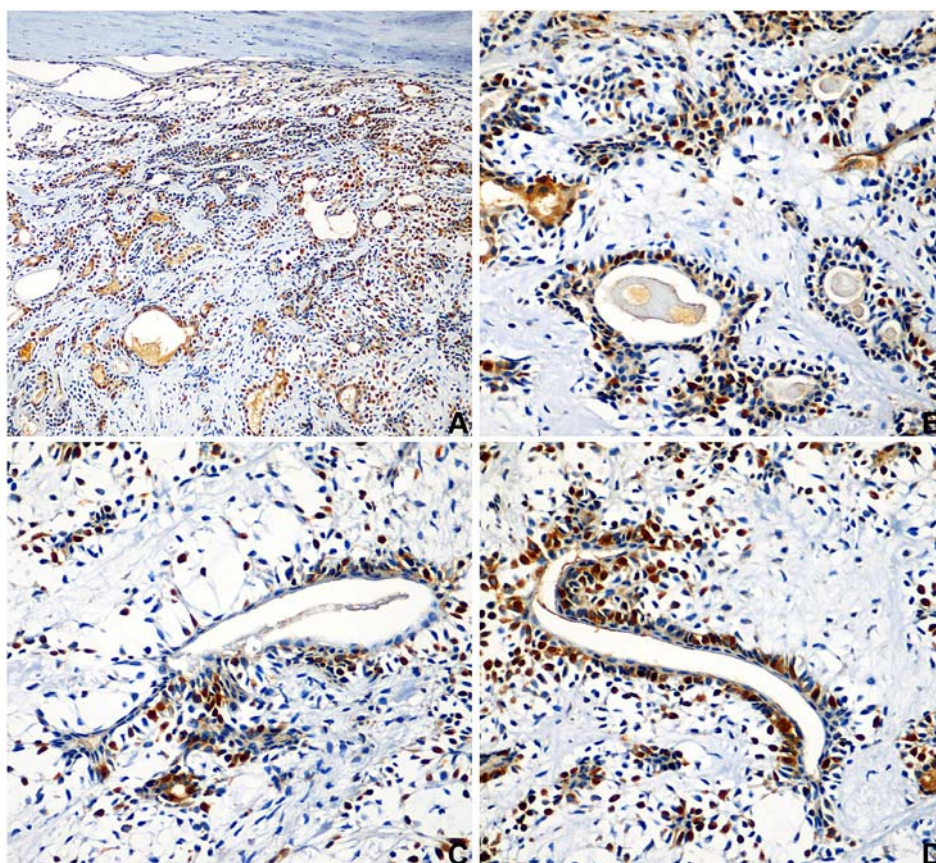


Figura 13.1 - Imunoexpressão do marcador MEK-2 fosforilado no adenoma plemórfico. A-D adenoma pleomórfico: expressão citoplasmática do fator p-MEK-2 em células epiteliais neoplásicas e expressão nuclear nas células mioepiteliais. Aumento original X40, X250, X250 e X250, respectivamente.

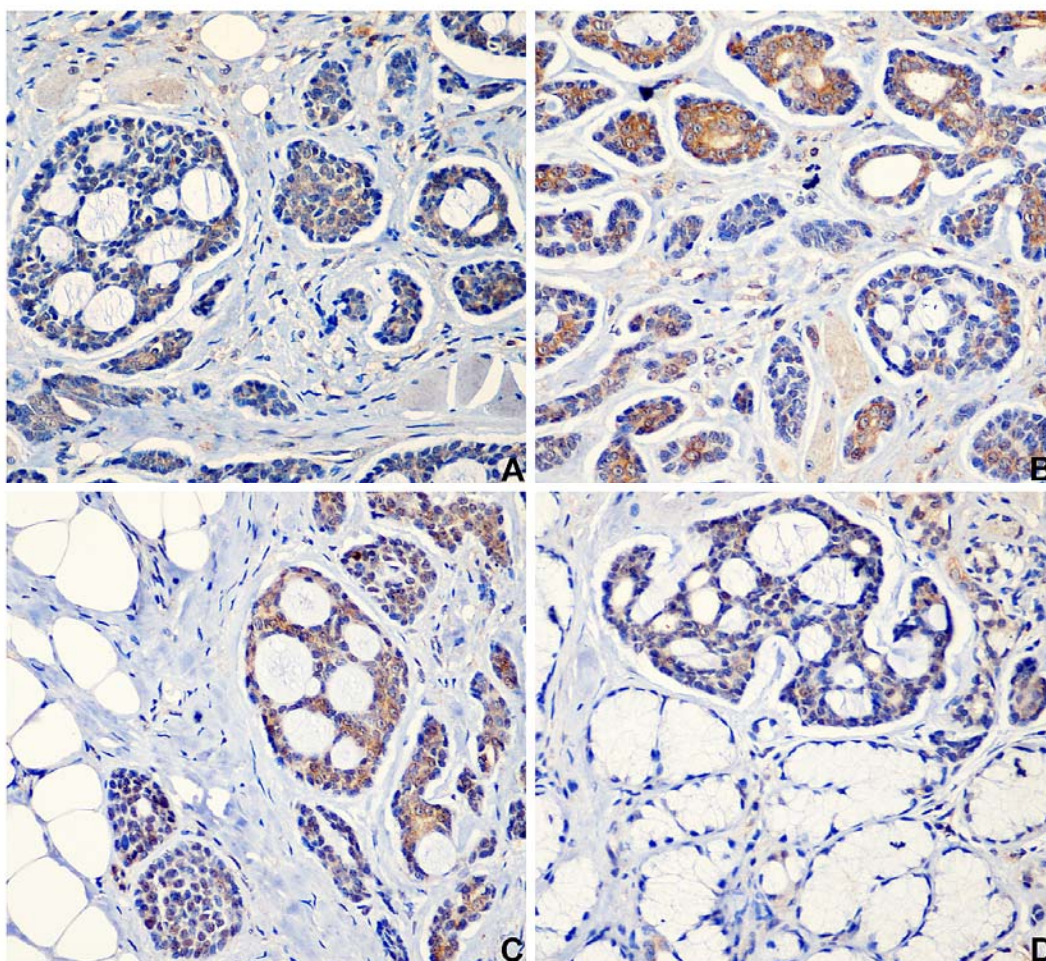


Figura 13.2 - Imunoexpressão do marcador MEK-2 fosforilado no carcinoma adenoide cístico. A-D carcinoma adenoide cístico: expressão citoplasmática do fator p-Mek-2 em células epiteliais neoplásicas (estruturas luminais). Aumento original X250, x250, x250 e x250, respectivamente.

4.1.3.9 ERK1/2 fosforilada

Não foram identificadas células positivas para a proteína p-ERK1/2 no adenoma pleomórfico e no carcinoma adenoide cístico. Entretanto, observou-se positividade no controle positivo interno, como as células inflamatórias (Figura 14).

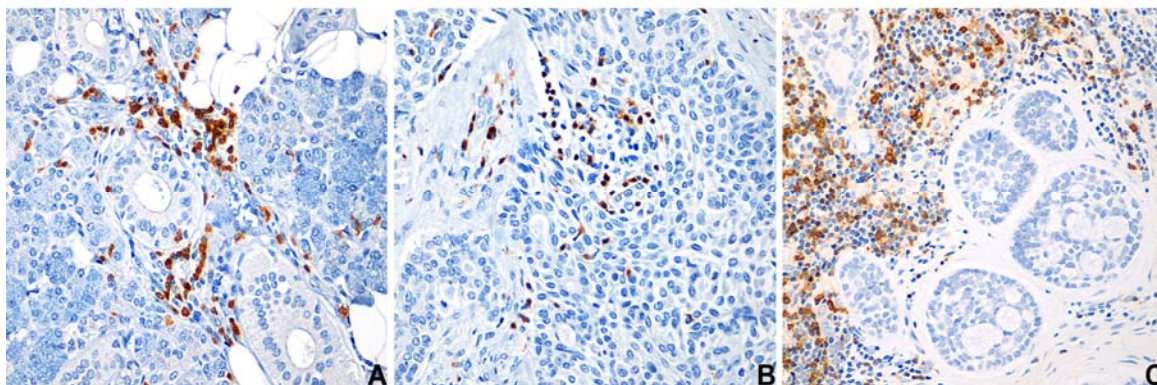


Figura 14 - Imunoexpressão do marcador ERK1/2 fosforilado. A, B e C: Positividade nas células inflamatórias. (A) Glândula salivar normal (parótida). Aumento original X400; (B) adenoma pleomórfico. Aumento original (X400); (C) carcinoma adenoide cístico. Aumento original X250.

4.1.4 Análise de associação das proteínas estudadas com as variáveis clínico-demográficas

A análise de associação foi realizada utilizando o teste estatístico exato de Fisher ou o teste de qui-quadrado. Na análise da categoria “localização tumoral”, a maioria dos casos que acometeram a glândula submandibular expressavam a proteína de MEK-2 fosforilada para os casos de AP (8/9 casos - $p=0,011$). Já para os casos de CAC, todos os casos provenientes do palato eram positivos para a proteína MEK-2 fosforilada (9/9 casos - $p=0,023$). Já na categoria “tamanho tumoral” do grupo dos carcinomas adenoide císticos, 22 dos 26 menores que 4,0cm não expressaram a proteína MEK-1 fosforilada ($p=0,046$). Além disso, dos 32 pacientes portadores de CAC que tiveram linfonodos acometidos, 21 deles não expressaram a proteína MEK-1 fosforilada ($p=0,041$) (Tabelas 8 e 11).

Não foram avaliadas associações clinico-patológicas com as proteínas B-Raf (CAC), Ras e ERK 1/2 fosforilada em ambos tipos tumorais, por possuírem variáveis constante.

As demais variáveis clinico-patológicas avaliadas não apresentaram associações estatisticamente significativas com proteínas estudadas no presente estudo (Tabelas 5 à 11).

Tabela 5 - Análise da associação das proteínas c-Kit e PI3K beta com as variáveis clinico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico

Característica Clínico-patológicas	Categoria	c-Kit				PI3K Beta			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Sexo	Feminino	30 (93,8)	2 (6,3)	32	0,083	14 (43,8)	18 (56,3)	32	0,557
	Masculino	13 (72,2)	5 (27,8)	18		10 (55,6)	8 (44,4)	18	
Idade	Até 40 anos	19 (76,0)	6 (24,0)	25	0,098	13 (52,0)	12 (48,0)	25	0,778
	Acima de 40 anos	24 (96,0)	1 (4,0)	25		11 (44,0)	14 (56,0)	25	
Raça	Branco	19 (79,2)	5 (20,8)	24	0,553	13 (54,2)	11 (45,8)	24	0,999
	Não-branco	6 (100,0)	0 (0,0)	6		3 (50,0)	3 (50,0)	6	
Localização tumoral	Submandibular	8 (88,9)	1 (11,1)	9	0,737	7 (77,8)	2 (22,2)	9	0,090
	Palato	2 (66,7)	1 (33,3)	3		0 (0,0)	3 (100,0)	3	
	Parótida	30 (88,9)	5 (14,3)	35		16 (45,7)	19 (54,3)	35	
	Outros	3 (100,0)	0 (0,0)	3		1 (33,3)	2 (66,7)	3	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	30 (90,9)	3 (9,1)	33	0,210	16 (48,5)	17 (51,5)	33	0,999
	Maior que 4cm	13 (76,5)	4 (23,5)	17		8 (47,1)	9 (52,9)	17	
Recidiva	Não	36 (85,7)	6 (14,3)	42	0,999	21 (50,0)	21 (50,0)	42	0,704
	Sim	7 (87,5)	1 (12,5)	8		3 (37,5)	5 (62,5)	8	

Tabela 6 - Análise da associação das proteínas AKT fosforilada e mTOR fosforilado com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico

Característica Clínico-patológicas	Categoria	AKT fosforilada				mTOR fosforilada			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Sexo	Feminino	20 (62,5)	12 (37,5)	32	0,765	25 (78,1)	7 (21,9)	32	0,730
	Masculino	10 (55,6)	8 (44,4)	18		15 (83,3)	3 (16,7)	18	
Idade	Até 40 anos	13 (52,0)	12 (48,0)	25	0,387	21 (84,0)	4 (16,0)	25	0,725
	Acima de 40 anos	17 (68,0)	8 (32,0)	25		19 (76,0)	6 (24,0)	25	
Raça	Branco	17 (70,8)	7 (29,2)	24	0,372	17 (70,8)	7 (29,2)	24	0,290
	Não-branco	3 (50,0)	3 (50,0)	6		6 (100,0)	0 (0,0)	6	
Localização tumoral	Submandibular	5 (55,6)	4 (44,4)	9	0,818	7 (77,8)	2 (22,2)	9	0,918
	Palato	2 (66,7)	1 (33,3)	3		2 (66,7)	1 (33,3)	3	
	Parótida	22 (62,9)	13 (37,1)	35		28 (80,0)	7 (20,0)	35	
	Outros	1 (33,3)	2 (66,7)	3		3 (100,0)	0 (0,0)	3	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	18 (54,5)	15 (45,5)	33	0,365	26 (78,8)	7 (21,2)	33	0,999
	Maior que 4cm	12 (70,6)	5 (29,4)	17		14 (82,4)	3 (17,6)	17	
Recidiva	Não	25 (59,5)	17 (40,5)	42	0,999	34 (81,0)	8 (19,0)	42	0,653
	Sim	5 (62,5)	3 (37,5)	8		6 (75,0)	2 (25,0)	8	

Tabela 7 - Análise da associação das proteínas B-Raf e MEK-1 fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico

Característica Clínico-patológicas	Categoria	B-Raf				MEK-1 fosforilada			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Sexo	Feminino	24 (75,0)	8 (25,0)	32	0,295	13 (40,6)	19 (59,4)	32	0,999
	Masculino	16 (88,9)	2 (11,1)	18		8 (44,4)	10 (55,6)	18	
Idade	Até 40 anos	23 (92,0)	2 (8,0)	25	0,074	14 (56,0)	11 (44,0)	25	0,085
	Acima de 40 anos	17 (68,0)	8 (32,0)	25		7 (28,0)	18 (72,0)	25	
Raça	Branco	19 (79,2)	5 (20,8)	24	0,553	9 (37,5)	15 (62,5)	24	0,999
	Não-branco	6 (100,0)	0 (0,0)	6		2 (33,3)	4 (66,7)	6	
Localização tumoral	Submandibular	8 (88,9)	1 (11,1)	9	0,776	4 (44,4)	5 (55,6)	9	0,683
	Palato	3 (100,0)	0 (0,0)	3		2 (66,7)	1 (33,3)	3	
	Parótida	26 (74,3)	9 (25,7)	35		13 (37,1)	22 (62,9)	35	
	Outros	3 (100,0)	0 (0,0)	3		2 (66,7)	1 (33,3)	3	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	28 (84,8)	5 (15,2)	33	0,277	17 (51,5)	16 (48,5)	33	0,075
	Maior que 4cm	12 (70,6)	5 (29,4)	17		4 (23,5)	13 (76,5)	17	
Recidiva	Não	35 (83,3)	7 (16,7)	42	0,331	16 (38,1)	26 (61,9)	42	0,255
	Sim	5 (62,5)	3 (37,5)	8		5 (62,5)	3 (37,5)	8	

Tabela 8 - Análise da associação da proteína MEK-2 fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico

Característica Clínico-patológicas	Categoria	MEK-2 fosforilada - Citoplasma				MEK-2 fosforilada – Núcleo			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Sexo	Feminino	16 (50,0)	16 (50,0)	32	0,774	15 (46,9)	17 (53,1)	32	0,999
	Masculino	8 (44,4)	10 (55,6)	18		9 (50,0)	9 (50,0)	18	
Idade	Até 40 anos	13 (52,0)	12 (48,0)	25	0,778	14 (56,0)	11 (44,0)	25	0,396
	Acima de 40 anos	11 (44,0)	14 (56,0)	25		10 (40,0)	15 (60,0)	25	
Raça	Branco	12 (50,0)	12 (50,0)	24	0,657	14 (58,3)	10 (41,7)	24	0,999
	Não-branco	4 (66,7)	2 (33,3)	6		3 (50,0)	3 (50,0)	6	
Localização tumoral	Submandibular	6 (66,7)	3 (33,3)	9	0,232	8 (88,9)	1 (11,1)	9	0,011
	Palato	2 (66,7)	1 (33,3)	3		0 (0,0)	3 (100,0)	3	
	Parótida	16 (45,7)	19 (54,3)	35		15 (42,9)	20 (57,1)	35	
	Outros	0 (0,0)	3 (100,0)	3		1 (33,3)	2 (66,7)	3	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	18 (54,5)	15 (45,5)	33	0,242	16 (48,5)	17 (51,5)	33	0,999
	Maior que 4cm	6 (35,3)	11 (64,7)	17		8 (47,1)	9 (52,9)	17	
Recidiva	Não	21 (50,0)	21 (50,0)	42	0,704	22 (52,4)	20 (47,6)	42	0,250
	Sim	3 (37,5)	5 (62,5)	8		2 (25,0)	6 (75,0)	8	

Tabela 9 - Análise da associação das proteínas c-Kit e PI3K beta com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico:

Características	Categoria	c-Kit				PI3K Beta			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Clinico patológicas									
Sexo	Feminino	29 (96,7)	1 (3,3)	30	0,999	7 (23,3)	23 (76,7)	30	0,228
	Masculino	16 (94,1)	1 (5,9)	17		1 (5,9)	16 (94,1)	17	
Idade	Até 40 anos	14 (100,0)	0 (0,0)	14	0,999	2 (14,3)	12 (85,7)	14	0,999
	Acima de 40 anos	31 (93,9)	2 (6,1)	33		6 (18,2)	27 (81,8)	33	
Raça	Branco	25 (96,2)	1 (3,8)	26	0,999	6 (23,1)	20 (76,9)	26	0,999
	Não-branco	6 (100,0)	0 (0,0)	6		1 (16,7)	5 (83,3)	6	
Tabagismo	Não	1 (3,4)	28 (96,6)	29	0,999	6 (20,7)	23 (79,3)	29	0,691
	Sim	15 (93,8)	1 (6,3)	16		2 (12,5)	14 (87,5)	16	
Etilismo	Não	27 (96,4)	1 (3,6)	28	0,999	7 (25,0)	21 (75,0)	28	0,233
	Sim	13 (92,9)	1 (7,1)	14		1 (7,1)	13 (92,9)	14	
Localização tumoral	Parótida	11 (100,0)	0 (0,0)	11	0,674	1 (9,1)	10 (90,9)	11	0,649
	Submandibular	15 (93,8)	1 (6,3)	16		4 (25,0)	12 (75,0)	16	
	Palato	8 (88,9)	1 (11,1)	9		2 (22,2)	7 (77,8)	9	
	Outros	11 (100,0)	0 (0,0)	11		1 (9,1)	10 (90,9)	11	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	25 (96,2)	1 (3,8)	26	0,999	4 (15,4)	22 (84,6)	26	0,713
	Maior que 4cm	19 (95,0)	1 (5,0)	20		4 (20,0)	16 (80,0)	20	
Tipo histológico	Cribriforme	20 (100,0)	0 (0,0)	20	0,072	2 (10,0)	18 (90,0)	20	0,357
	Tubular	4 (100,0)	0 (0,0)	4		1 (25,0)	3 (75,0)	4	
	Sólido	6 (85,7)	1 (14,3)	7		3 (42,9)	4 (57,1)	7	
	Cribriforme e tubular	6 (100,0)	0 (0,0)	6		2 (33,3)	4 (66,7)	6	
	Cribriforme e sólido	1 (50,0)	1 (50,0)	2		0 (0,0)	2 (100,0)	2	
	Cribriforme, tubular e sólido	3 (100,0)	0 (0,0)	3		0 (0,0)	3 (100,0)	3	
Invasão Vascular	Não	26 (96,3)	1 (3,7)	27	0,999	5 (18,5)	22 (81,5)	27	0,615
	Sim	7 (100,0)	0 (0,0)	7		2 (28,6)	5 (71,4)	7	
Invasão Perineural	Não	11 (91,7)	1 (8,3)	12	0,324	1 (8,3)	11 (91,7)	12	0,389
	Sim	25 (100,0)	0 (0,0)	25		6 (24,0)	19 (76,0)	25	
Linfonodos acometidos	Não	31 (96,9)	1 (3,1)	32	0,999	5 (15,6)	27 (84,4)	32	0,999
	Sim	10 (100,0)	0 (0,0)	10		1 (10,0)	9 (90,0)	10	
Recidiva	Não	31 (96,9)	1 (3,1)	32	0,541	6 (18,8)	26 (81,3)	32	0,709
	Sim	14 (93,3)	1 (6,7)	15		2 (13,3)	13 (86,7)	15	
Metástase	Não	17 (94,4)	1 (5,6)	18	0,999	3 (16,7)	15 (83,3)	18	0,999
	Sim	28 (96,6)	1 (3,4)	29		24 (82,8)	5 (17,2)	29	

Tabela 10 - Análise da associação das proteínas AKT fosforilada e mTOR fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico:

Características clínico-	Categoria	AKT fosforilada				mTOR fosforilado			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Sexo	Feminino	11 (36,7)	19 (63,3)	30	0,094	23 (76,7)	7 (23,3)	30	0,733
	Masculino	2 (11,8)	15 (88,2)	17		12 (70,6)	5 (29,4)	17	
Idade	Até 40 anos	3 (21,4)	11 (78,6)	14	0,726	8 (57,1)	6 (42,9)	14	0,140
	Acima de 40 anos	10 (30,3)	23 (69,7)	33		27 (81,8)	6 (18,2)	33	
Raça	Branco	9 (34,6)	17 (65,4)	26	0,999	16 (61,5)	10 (38,5)	26	0,142
	Não-branco	2 (33,3)	4 (66,7)	6		6 (100,0)	0 (0,0)	6	
Tabagismo	Não	9 (31,0)	20 (69,0)	29	0,743	23 (79,3)	6 (20,7)	29	0,483
	Sim	4 (25,0)	12 (75,0)	16		11 (68,8)	5 (31,3)	16	
Etilismo	Não	11 (39,3)	17 (60,7)	28	0,159	22 (78,6)	6 (21,4)	28	0,459
	Sim	2 (14,3)	12 (85,7)	14		9 (64,3)	5 (35,7)	14	
Localização tumoral	Parótida	2 (18,2)	9 (81,8)	11	0,599	10 (90,9)	1 (9,1)	11	0,505
	Submandibular	6 (37,5)	10 (62,5)	16		11 (68,8)	5 (31,3)	16	
	Palato	3 (33,3)	6 (66,7)	9		7 (77,8)	2 (22,2)	9	
	Outros	2 (18,2)	9 (81,8)	11		7 (63,6)	4 (36,4)	11	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	6 (23,1)	20 (76,9)	26	0,511	20 (76,9)	6 (23,1)	26	0,738
	Maior que 4cm	7 (35,0)	13 (65,0)	20		14 (70,0)	6 (30,0)	20	
Tipo histológico	Cribriforme	6 (30,0)	14 (70,0)	20	0,184	15 (75,0)	5 (25,0)	20	0,202
	Tubular	2 (50,0)	2 (50,0)	4		4 (100,0)	0 (0,0)	4	
	Sólido	0 (0,0)	7 (100,0)	7		3 (42,9)	4 (57,1)	7	
	Cribriforme e tubular	3 (50,0)	3 (50,0)	6		5 (83,3)	1 (16,7)	6	
	Cribriforme e sólido	1 (50,0)	1 (50,0)	2		2 (100,0)	0 (0,0)	2	
	Cribriforme, tubular e sólido	0 (0,0)	3 (100,0)	3		1 (33,3)	2 (66,7)	3	
Invasão Vascular	Não	7 (25,9)	20 (74,1)	27	0,644	21 (77,8)	6 (22,2)	27	0,157
	Sim	3 (42,9)	4 (57,1)	7		3 (42,9)	4 (57,1)	7	
Invasão Perineural	Não	2 (16,7)	10 (83,3)	12	0,445	9 (75,0)	3 (25,0)	12	0,999
	Sim	8 (32,0)	17 (68,0)	25		18 (72,0)	7 (28,0)	25	
Linfonodos acometidos	Não	9 (28,1)	23 (71,9)	32	0,404	24 (75,0)	8 (25,0)	32	0,999
	Sim	1 (10,0)	9 (90,0)	10		7 (70,0)	3 (30,0)	10	
Recidiva	Não	8 (25,0)	24 (75,0)	32	0,441	21 (65,6)	11 (34,4)	32	0,071
	Sim	5 (33,3)	10 (66,7)	15		14 (93,3)	1 (6,7)	15	
Metástase	Não	6 (33,3)	12 (66,7)	18	0,521	15 (83,3)	3 (16,7)	18	0,324
	Sim	7 (24,1)	22 (75,9)	29		20 (69,0)	9 (31,0)	29	

Tabela 11 - Análise da associação das proteínas MEK-1 fosforilada e MEK-2 fosforilada com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico

Características clínico-patológicas	Categoria	Mek-1 fosforilada				Mek-2 fosforilada			
		Positivo	Negativo	Total	p-value	Positivo	Negativo	Total	p-value
Sexo	Feminino	6 (20,0)	24 (80,0)	30	0,176	17 (56,7)	13 (43,3)	30	0,759
	Masculino	7 (41,2)	10 (58,8)	17		11 (56,7)	6 (35,3)	17	
Idade	Até 40 anos	4 (28,6)	10 (71,4)	14	0,999	11 (78,6)	3 (21,4)	14	0,111
	Acima de 40 anos	9 (27,3)	24 (72,7)	33		17 (51,5)	16 (48,5)	33	
Raça	Branco	6 (23,1)	20 (76,9)	26	0,060	17 (65,4)	9 (34,6)	26	0,150
	Não-branco	4 (66,7)	2 (33,3)	6		6 (100,0)	0 (0,0)	6	
Tabagismo	Não	6 (20,7)	23 (79,3)	29	0,169	15 (51,7)	14 (48,3)	29	0,204
	Sim	7 (43,8)	9 (56,3)	16		12 (75,0)	4 (25,0)	16	
Etilismo	Não	8 (28,6)	20 (71,4)	28	0,999	16 (57,1)	12 (42,9)	28	0,747
	Sim	4 (28,6)	10 (71,4)	14		9 (64,3)	5 (35,7)	14	
Localização tumoral	Parótida	1 (9,1)	10 (90,9)	11	0,073	4 (36,4)	7 (63,6)	11	0.023
	Submandibular	7 (43,8)	9 (56,3)	16		9 (56,3)	7 (43,8)	16	
	Palato	4 (44,4)	5 (55,6)	9		9 (100,0)	0 (0,0)	9	
	Otos	1 (9,1)	10 (90,9)	11		6 (54,5)	5 (45,5)	11	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	4 (15,4)	22 (84,6)	26	0,046	16 (61,5)	10 (38,5)	26	0,999
	Maior que 4cm	9 (45,0)	11 (55,0)	20		12 (60,0)	8 (40,0)	20	
Tipo histológico	Cribriforme	5 (25,0)	15 (75,0)	20	0,283	14 (70,0)	6 (30,0)	20	0,915
	Tubular	1 (25,0)	3 (75,0)	4		2 (50,0)	2 (50,0)	4	
	Sólido	1 (14,3)	6 (85,7)	7		4 (57,1)	3 (42,9)	7	
	Cribriforme e tubular	2 (33,3)	4 (66,7)	6		4 (66,7)	2 (33,3)	6	
	Cribriforme e sólido	2 (100,0)	0 (0,0)	2		2 (100,0)	0 (0,0)	2	
	Cribriforme, tubular e sólido	0 (0,0)	3 (100,0)	3		2 (66,7)	1 (33,3)	3	
Invasão Vascular	Não	6 (22,2)	21 (77,8)	27	0,157	19 (70,4)	8 (29,6)	27	0,644
	Sim	4 (57,1)	3 (42,9)	7		6 (85,7)	1 (14,3)	7	
Invasão Perineural	Não	3 (25,0)	9 (75,0)	12	0,999	7 (58,3)	5 (41,7)	12	0,468
	Sim	7 (28,0)	18 (72,0)	25		18 (72,0)	7 (28,0)	25	
Linfonodos acometidos	Não	11 (34,4)	21 (65,6)	32	0,041	19 (59,4)	13 (40,6)	32	0,720
	Sim	0 (0,0)	10 (100,0)	10		5 (50,0)	5 (50,0)	10	
Recidiva	Não	7 (21,9)	25 (78,1)	32	0,295	19 (59,4)	13 (40,6)	32	0,999
	Sim	6 (40,0)	9 (60,0)	15		9 (60,0)	6 (40,0)	15	
Metástase	Não	5 (27,8)	13 (72,2)	18	0,999	12 (66,7)	6 (33,3)	18	0,546
	Sim	8 (27,6)	21 (72,4)	29		16 (55,2)	13 (44,8)	29	

4.1.5 Análise de sobrevida câncer-específica (SCE)

A sobrevida câncer específica (SCE) dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares incluídos no presente estudo foi de 75,2% após dois anos do diagnóstico; 53,8% após cinco anos e 30,7% após 10 anos, como pode ser observado na Figura 15.

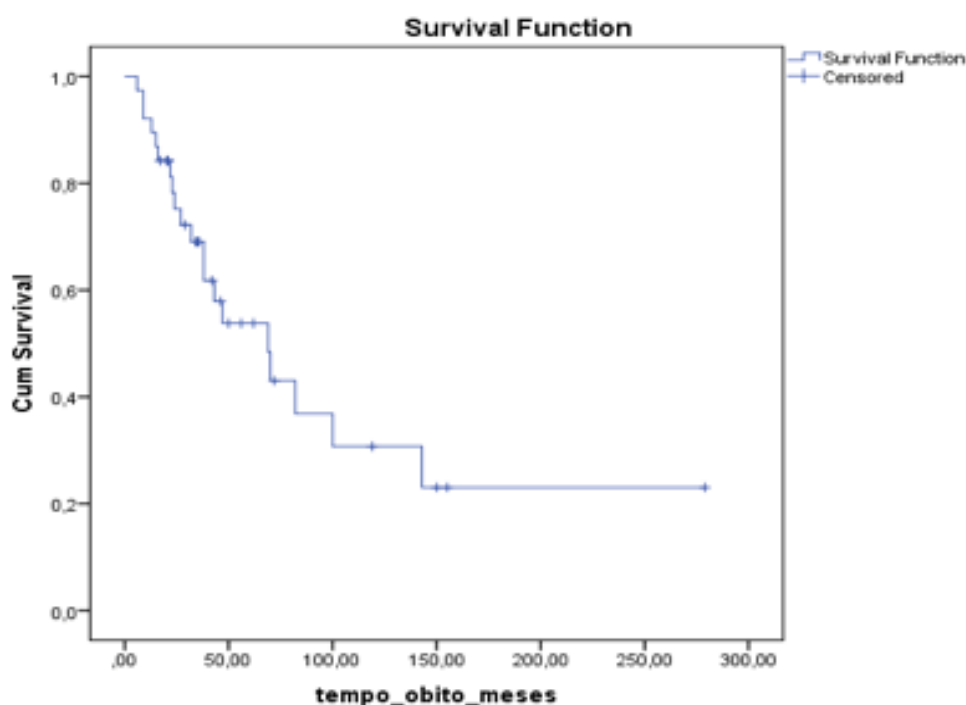


Figura 15 - Sobrevida câncer-específica dos pacientes com carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares avaliados na presente série

A taxa de Sobrevida Câncer Específica (SCE) da população estudada foi determinada para cada um dos marcadores estudados. Sendo assim, os pacientes, cujos tumores expressaram as proteínas mTOR e MEK-2 fosforilada apresentaram SCE significativamente aumentada ($p=0,040$ e $p=0,005$, respectivamente), conforme apresentado na Tabela 13 e na Figura

16. As outras proteínas não apresentaram associações estatisticamente significativas.

Tabela 12 - Correlação entre a sobrevida câncer-específica e variáveis imunoistoquímicas dos casos de carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares

Proteínas Estudadas	Categoria	Sobrevida Câncer-específica			p-value
		2 anos	5 anos	10 anos	
PI3K- Beta	Expresso	87,5 %	72,9%	24,3%	0.962
	Não-Expresso	71,4%	48,0%	32,9%	
AKT fosforilada	Expresso	88,9%	74,1%	44,4%	0,131
	Não-Expresso	64,8%	44,0%	23,5%	
mTOR fosforilada	Expresso	79,1%	60,9%	44,4%	0,040
	Não-Expresso	66,7%	41,7%	0,0%	
MEK-1 fosforilada	Expresso	90,0%	49,2%	49,2%	0,614
	Não-Expresso	69,2%	54,0%	24,3%	
MEK-2 fosforilada	Expresso	85,2%	65,1%	47,4%	0,005
	Não-Expresso	51,1%	25,6%	0,0%	

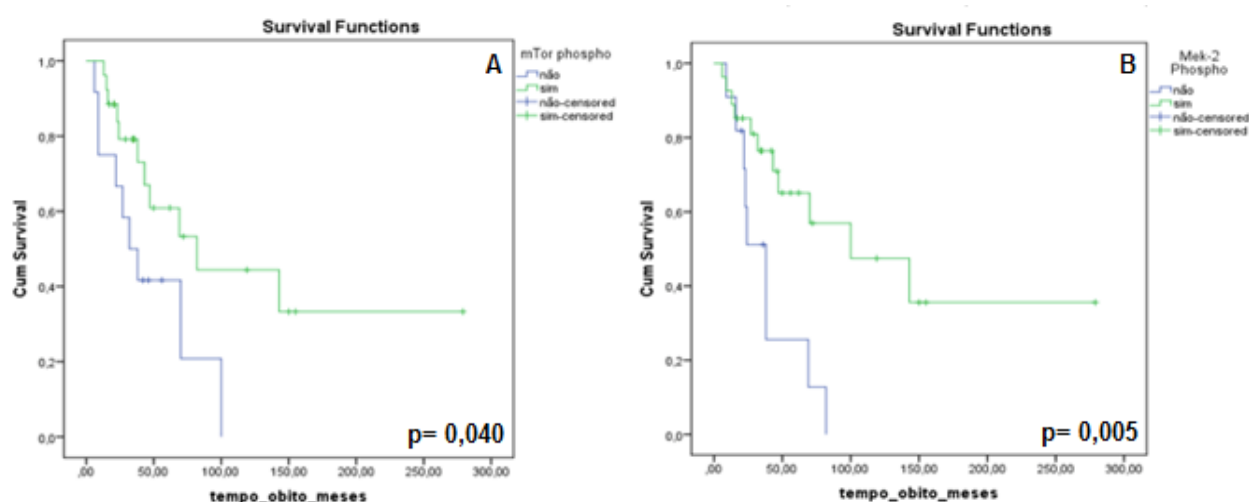


Figura 16 - Curvas de sobrevida câncer específica de pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico de acordo com marcadores imunoistoquímicos estudados com diferença estatisticamente significativa: (A) mTOR ($p=0,040$); (B) MEK-2 fosforilada ($p=0,005$).

4.2 miRNA

4.2.1 Adenoma Pleomórfico

Para a análise de expressão dos miRNAs foram selecionados 25 (vinte e cinco) casos com diagnóstico confirmado de adenoma pleomórfico. Esses casos foram provenientes de tecido congelado disponíveis no Banco de Tumores deste do A.C.Camargo Câncer Center.

4.2.1.1 Dados clínico-demográficos

Os casos de adenoma pleomórfico incluídos no estudo acometeram 19 mulheres e 6 homens de idades que variaram entre 24 e 84 anos de idade, com maior incidência durante as 3^a e 6^a décadas de vida (média de idade de 48,3). Dos 25 casos, apenas 1 acometeu um indivíduo de raça amarela, sendo os outros acometidos por indivíduos brancos. O tumor foi mais frequente na parótida, (24 casos), seguida de 1 (um) caso na cavidade oral/ Palato. O tamanho dos adenomas pleomórficos operados variou de tumores com até 4cm no maior eixo (23 casos) e tumores acima de 4cm no seu maior eixo (2 casos). Apenas 2 casos de adenoma pleomórfico recidivaram (8% dos casos), sendo que todos acometeram mulheres (Tabela 13).

Tabela 13 - Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico.

Dados Clínicos-Demográficos	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
	19 (76%)	6 (24%)	25 (100)
Idade			
Até 40 anos	8 (32,0)	2 (8,0)	10 (40,0)
Acima de 40 anos	11 (44,0)	4 (16,0)	15 (60,0)
Raça			
Branco	18 (72,0)	6 (24,0)	24 (96,0)
Não branco	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (4,0)
Localização			
Parótida	18 (72,0)	6 (24,0)	24 (96,0)
Palato	1 (4,0)	0 (0,0)	1 (4,0)
Tamanho			
Eixo menor que 4,0 cm	17 (68,0)	6 (24,0)	23 (92,0)
Eixo maior que 4,0 cm	2 (8,0)	0 (0,0)	2 (8,0)
Recidiva			
Parótida	2 (100)	0 (0,0)	2 (100)
Palato	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Total	2(100)	0 (0,0)	2 (100)

4.2.2 Carcinoma Adenoide Cístico

Para a análise de expressão dos miRNAs foram selecionados 14 (quatorze) casos com diagnóstico confirmado de carcinoma adenoide cístico, provenientes de tecido congelado disponíveis no Banco de Tumores do AC Camargo Cancer Center.

4.2.2.1 Dados clínico-demográficos

Os casos de carcinoma adenoide cístico incluídos no estudo acometeram 6 mulheres e 8 homens de idades que variaram entre 20 e 88 anos de idade, com maior incidência durante as 3^a e acima da 6^a de vida

(média de idade de 52,2). O tumor foi mais frequente nas glândulas salivares maiores e menores, sendo o palato, o sítio mais frequente. O tamanho dos carcinomas adenoide cístico operados variou de tumores com até 4cm no maior eixo (11 casos) e tumores acima de 4cm no seu maior eixo (3 casos). O tipo histológico mais frequente foi o cribriforme, porém, não obtivemos informação de 4 casos. Houve invasão vascular em apenas 3 casos e invasão perineural em 8 casos. Metade dos pacientes (7 casos) da nossa casuística não tiveram seus linfonodos acometidos e o tratamento mais utilizado foi a radioterapia adjuvante (13 casos).

Do total de casos, 4 casos de carcinoma adenoide cístico recidivaram (28,6% dos casos): estes casos acometeram 1 mulher e 3 homens. Além disso, 7 pacientes (50,0%) desenvolveram metástase, sendo 3 mulheres e 4 homens e a todas no pulmão. Do total de pacientes, 2 (14,3%) foram a óbito devido a doença (Tabela 14).

Tabela 14 - Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico

Dados Clínicos-	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
	6 (42,9)	8 (57,1)	14 (100)
Idade			
Até 40 anos	1 (7,1)	3 (21,4)	4 (28,6)
Acima de 40 anos	5 (35,7)	5 (35,7)	10 (71,4)
Raça			
Branco	3 (21,4)	6 (42,9)	9 (64,3)
Não Branco	2 (14,3)	2 (14,3)	4 (28,6)
Ignorado	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (7,1)
Etilista			
Sim	0 (0,0)	2 (14,3)	2 (14,3)
Não	3 (21,4)	4 (28,6)	7 (50,0)
Ignorado	3 (21,4)	2 (14,3)	5 (35,7)
Tabagista			
Sim	1 (7,14)	3 (21,42)	4 (28,6)
Não	4 (28,57)	4 (28,57)	8 (57,1)
Ign	1 (7,14)	1 (7,14)	2 (14,3)
Localização tumoral			
Parótida	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (7,1)
Submandibular	0 (0,0)	2 (14,3)	2 (14,3)
Palato	2 (14,3)	2 (14,3)	4 (28,6)
Outro	3 (21,4)	4 (28,6)	7 (50,0)
Tamanho			
Eixo menor que 4,0 cm	5 (35,7)	6 (42,9)	11 (78,6)
Eixo maior que 4,0 cm	1 (7,1)	2 (14,3)	3 (21,4)
Tipo Histológico			
Cribriforme	0 (0,0)	5 (35,7)	5 (35,7)
Tubular	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (7,1)
Sólido	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Cribriforme e tubular	1 (7,14)	1 (7,14)	2 (14,3)
Cribriforme, Tubular e Sólido	1 (7,14)	1 (7,14)	2 (14,3)
Ignorado	3 (21,42)	1 (7,14)	4 (28,6)
Invasão vascular			
Sim	0 (0,0)	3 (21,4)	3 (21,4)
Não	5 (35,71)	6 (42,85)	11 (78,6)
Invasão Perineural			
Sim	4 (28,57)	4 (28,57)	8 (57,1)
Não	1 (7,1)	4 (28,6)	5 (35,7)
Ignorado	1 (7,1)	0 (0,0)	1 (7,1)

Cont/ Tabela 14

Dados Clínicos-	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
Linfonodos Acometidos			
Sim	1 (7,1)	2 (14,3)	3 (21,4)
Não	3 (21,42)	4 (28,57)	7 (50,0)
Ignorado	1 (7,14)	3 (21,42)	4 (28,6)
Tratamento			
Quimioterapia adjuvante	0 (0,0)	1 (7,1)	1 (7,1)
Radioterapia Adjuvante	5 (35,71)	8 (57,14)	13 (92,9)
Recidiva	1 (33,3)	2 (66,7)	3 (100)
Metástase	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100)
Local Metástase			
Pulmão	3 (42,9)	4 (57,1)	7 (100)
Outro	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Óbito	1 (50,0)	1 (50,0)	2 (100)

4.2.3 Extração de RNA

O RNA foi extraído das 25 amostras de adenoma pleomórfico, 14 amostras de carcinoma adenoide cístico e 10 amostras de glândula salivar não neoplásica, provenientes de tecidos congelados. Após a extração foi realizado o tratamento do RNA com DNase e em seguida, submetido á quantificação por espectrofotometria no aparelho Nanodrop™ ND (Thermo Scientific) (Tabela 15):

Tabela 15 - Resultados da leitura espectrofotométrica do RNA extraído após tratamento com DNase: quantificação das amostras de RNA total provenientes de pacientes com CAC e AP

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
1T CAC	86,93	2,01	2,19
2T CAC	101,25	2,01	2,20
3T CAC	80,93	1,97	2,21
4T CAC	74,74	2,05	2,09
5T CAC	95,66	1,96	2,04
6T CAC	65,45	2,00	1,92
7T CAC	79,62	2,03	2,17
8T CAC	66,83	1,99	1,87
9T CAC	131,33	2,03	2,14
10T CAC	143,29	2,02	2,17
11T CAC	71,13	1,98	2,20
12T CAC	25,43	1,96	1,91
13T CAC	60,73	1,98	1,99
14T CAC	24,20	2,14	2,15
1 AP	93,27	2,03	1,89
2 AP	86,13	2,07	1,90
3 AP	154,82	2,01	2,02
4 AP	75,57	2,06	2,05
5 AP	78,30	2,10	2,05
6 AP	30,47	2,16	1,84
7 AP	119,13	1,98	2,05
8 AP	143,12	2,01	1,91
9 AP	141,73	2,05	2,02
10 AP	60,73	1,98	2,12
11 AP	54,37	1,98	2,25
12 AP	109,84	2,07	1,89
13 AP	48,40	2,01	1,90
14 AP	68,22	2,01	1,93
15 AP	112,67	2,04	1,96
16 AP	69,73	1,98	1,78
17 AP	42,25	2,10	2,02
18 AP	140,39	2,03	2,20
19 AP	44,00	2,03	2,18

Cont/ Tabela 15

Sample ID	ng/ul	260/280	260/230
20 AP	35,01	2,04	1,94
21 AP	41,29	1,97	1,36
22 AP	85,92	2,00	1,92
23 AP	54,33	1,90	1,56
24 AP	32,33	2,07	2,26
25 AP	79,57	2,01	2,10
1N normal	90,21	2,00	1,88
2N normal	102,24	1,94	1,85
3N normal	73,34	1,99	1,85
4N normal	45,44	1,90	2,02
5N normal	67,31	1,95	2,08
6N normal	44,21	1,89	2,20
7N normal	84,14	1,88	1,82
8N normal	62,24	1,80	1,72
9N normal	63,50	1,91	1,88
10N normal	70,08	1,96	2,09

4.2.4 Síntese do cDNA

A reação de síntese do cDNA foi realizada de acordo com os procedimentos recomendados no manual do “kit” TaqMan MicroRNA RT Reverse Transcription (Applied Biosystems).

4.2.5 Amplificação do cDNA e análise da expressão de microRNAs

O cDNA das 25 amostras de adenoma pleomórfico e das 14 amostras de carcinoma adenoide cístico foi sintetizado e a expressão dos microRNAs -221 e -222 foi avaliada por RT-PCR em tempo real, utilizando RNU44 e RNU48 como controle endógeno e o pool de amostras normais como calibrador.

Para determinarmos o padrão de expressão dos miRNAs, foi estabelecido um cut-off de 2 vezes em relação à expressão destes microRNAs no tecido normal ($\geq 2,0$ para o aumento de expressão e $\leq 0,5$ para a diminuição da expressão e o intervalo entre 0,5 a 2,0 para a expressão normal).

Os resultados das análises são mostrados nas Tabelas a seguir:

4.2.5.1 miRNA-221

Foi detectada a expressão do miRNA-221 em 13 amostras de carcinoma adenoide cístico e em 19 amostras de adenoma pleomórfico das glândulas salivares. Nos carcinomas adenoide císticos foi observada a diminuição da expressão de miRNA-221 em 4 (30,77%) das 13 amostras avaliadas, a expressão normal foi observada em 5 casos (38,46%) e o aumento da expressão foi encontrado em 4 (30,77%).

Já nos adenomas pleomórficos, a diminuição da expressão do miR-221 foi observado em 7 (36,84%) das 19 amostras analisadas, a expressão normal em 10 amostras (52,63%) e o aumento da expressão em 2 amostras (10,53%) (Tabela 16 e Figura 17):

Tabela 16 - Expressão do miRNA-221 nos tumores de glândula salivar estudados

Tipo Histológico (miR-221)	Total (%)	Baixa expressão (%)	Expressão normal (%)	Alta expressão (%)
Carcinoma adenoide cístico	13 (100)	4 (30,77)	5 (38,46)	4 (30,77)
Adenoma pleomórfico	19 (100)	7 (36,84)	10 (52,63)	2 (10,53)

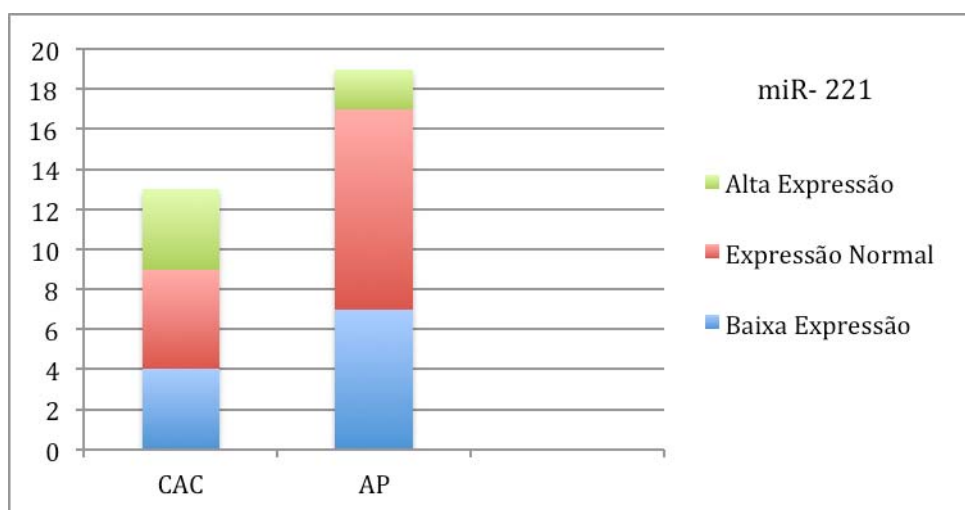


Figura 17 - Expressão do miRNA-221 nos tumores de glândula salivar estudados. A expressão relativa foi calculada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão do RNU44 e RNU48 (*small nucleolar RNA* utilizado como referência). As barras representam o número de casos com expressão aumentada, diminuída ou normal de cada tipo tumoral, considerando a expressão observada nas 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas (POOL N). Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não-neoplásico.

4.2.5.2 miR-222

Foi detectada a expressão do miRNA-222 em 14 amostras de carcinoma adenoide cístico e em 22 amostras de adenoma pleomórfico. Foi observada a diminuição da expressão do miR-222 em 4 (28,6%) das 14 amostras analisadas de carcinoma adenoide cístico. A expressão normal foi visualizada em 8 casos (57,1%) e a alta expressão em 2 amostras (14,3%).

Porém nos adenomas pleomórficos, a baixa expressão foi observada em 7 (31,8%) das 22 amostras avaliadas, a expressão normal também foi visualizada em 7 das amostras (31,8%) e em 8 amostras (36,4%) observou-se o aumento da expressão de miR-222, como demonstrado na Tabela 17 e Figura 18.

Tabela 17 - Expressão do miRNA-222 nos tumores de glândula salivar estudados

Tipo Histológico (miR-222)	Total (%)	Baixa expressão (%)	Expressão normal (%)	Alta expressão (%)
Carcinoma adenoide cístico	14 (100)	4 (28,6)	8 (57,1)	2 (14,3)
Adenoma pleomórfico	22 (100)	7 (31,8)	7 (31,8)	8 (36,4)

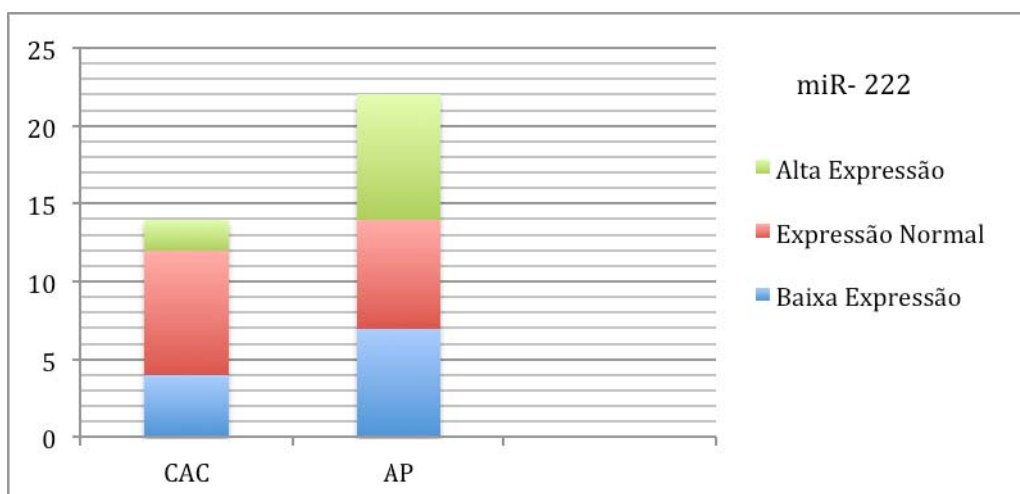


Figura 18 - Expressão do miRNA-222 nos tumores de glândula salivar estudados. A expressão relativa foi calculada por RT-PCR em tempo real e normalizada pela expressão do RNU44 e RNU48 (*small nucleolar RNA* utilizado como referência). As barras representam o número de casos com expressão aumentada, diminuída ou normal de cada tipo tumoral, considerando a expressão observada nas 10 amostras de glândula salivar não neoplásicas (POOL N). Foi considerado aumento ou diminuição da expressão, quando a expressão no tecido tumoral variou duas vezes ou mais em relação à expressão no tecido não-neoplásico.

De oito dos 25 casos de adenoma pleomórfico e 5 dos 14 casos de carcinoma adenoide cístico avaliados para a expressão dos microRNAs -221 e -222, também estava disponível material emblocado em parafina, que foi utilizado para a análise da expressão da proteína c-Kit, alvo dos microRNAs estudados. Como resultado dessa análise, podemos observar uma tendência no aumento da expressão dos miRNAs, principalmente do miRNA-222 quando há uma diminuição na expressão da proteína c-Kit. Esses dados constam descritos no Quadro 2.

Quadro 2 - Comparação da expressão dos microRNAs 221 e 222 e da proteína c-kit

<u>Adenoma Pleomórfico</u>			
Amostra	Proteína c-Kit	miR-221	miR-222
# 1	Ausente	Não expresso	Aumento
# 2	Focal	Não expresso	Normal
# 3	Ausente	Normal	Diminuição
# 4	Focal	Normal	Normal
# 5	Ausente	Normal	Aumento
# 6	Ausente	Normal	Aumento
# 7	Focal	Não expresso	Aumento
# 8	Ausente	Normal	Aumento
<u>Carcinoma Adenoide Cístico</u>			
# 1	Ausente	Diminuição	Diminuição
# 2	Presente	Normal	Normal
# 3	Focal	Diminuição	Normal
# 4	Presente	Normal	Aumento
# 5	Focal	Aumento	Aumento

4.2.6 Análise de associação dos miRNAs com as variáveis clínico-demográficas

A análise de associação foi realizada utilizando o teste estatístico exato de Fisher. Na análise da categoria tabagistas X não tabagistas do grupo dos carcinomas adenoide císticos, foram observados que, dos 8 pacientes não tabagistas, 5 (62,5%) deles, apresentaram expressão normal do miRNA-221. Já no grupo dos tabagistas (n=3), nenhum deles apresentou expressão normal desse mesmo miRNA, havendo uma associação estatisticamente, onde $p < 0,048$. Na análise da categoria raça do CAC, foram observados que dos 9 pacientes classificados como brancos, 5 (38%)

apresentaram a expressão do miRNA-222 normal e apenas 2 dos não brancos (n=4) apresentaram esse mesmo miRNA normal, havendo também uma associação estatística, onde $p < 0,05$.

No entanto, apesar desses dados serem considerados estatisticamente significativos, esses resultados devem ser avaliados com cautela devido ao número reduzido da amostra (raça n=13 e tabagista n=12) (Tabela 19).

As demais variáveis clínico-patológicas avaliadas não apresentaram associações estatisticamente significativas com os miRNAs do presente estudo (Tabela 18).

Tabela 18 - Análise da associação dos miRNAs com as variáveis clinico-patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico

Características Clinico patológicas		miR-221			Total	p-value	miR-222			Total	p-value
		Baixa Expressão	Expressão Normal	Alta expressão			Baixa expressão	Expressão normal	Alta Expressão		
Sexo	Feminino	5 (35,7)	7 (50,0)	2 (14,3)	14	0,798	5 (29,4)	5 (29,4)	7 (41,2)	17	0,687
	Masculino	3 (60,0)	2 (40,0)	0 (0,0)	5		2 (40,0)	2 (40,0)	1 (20,0)	5	
Idade	Até 40 anos	4 (50,0)	2 (25,0)	2 (25,0)	8	0,337	4 (44,4)	2 (22,2)	3 (33,3)	9	0,889
	Acima de 40 anos	4 (36,4)	7 (63,6)	0 (0,0)	11		3 (23,1)	5 (38,5)	5 (38,5)	13	
Raça	Branco	8 (44,4)	8 (44,4)	2 (11,1)	18	0,999	7 (33,3)	6 (28,6)	8 (38,1)	21	0,636
	Não-branco	0 (0,0)	1 (100)	0 (0,0)	1		0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1	
Localização tumoral	Palato	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1	1,000	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1	0,636
	Parótida	8 (44,4)	8 (44,4)	2 (11,1)	18		7 (33,3)	6 (28,6)	8 (38,1)	21	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	7 (38,9)	9 (50,0)	2 (11,1)	18	0,526	6 (28,6)	7 (33,3)	8 (38,1)	21	0,636
	Maior que 4cm	1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1		1 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	1	
Recidiva	Não	8 (42,1)	9 (47,4)	2 (10,5)	19	*	7 (35,0)	6 (30,0)	7 (35,0)	20	0,999
	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	0		0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2	

*A variável é constante. Não há outra categoria

Tabela 19 - Análise da associação dos miRNAs com as variáveis clínico-patológicas nas amostras de carcinoma adenoide cístico

Características Clínico-patológicas	Categoria	miR-221			Total	p-value	miR-222			Total	p-value
		Baixa	Expressão	Alta			Baixa	Expressão	Alta		
Sexo	Feminino	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	6	0,940	2 (33,3)	2 (33,3)	2 (33,3)	6	0,152
	Masculino	2 (28,6)	3 (42,8)	2 (28,6)	19		2 (25,0)	6 (75,0)	0 (0,0)	8	
Idade	Até 40 anos	0 (0,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	4	0,398	1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0,0)	4	0,941
	Acima de 40 anos	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)	9		3 (30,0)	5 (50,0)	2 (20,0)	10	
Raça	Branco	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)	9	0,545	4 (44,4)	5 (55,6)	0 (0,0)	9	0,050
	Não-branco	0 (0,0)	2 (66,7)	1 (33,3)	3		0 (0,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	4	
Tabagismo	Não	0 (0,0)	5 (62,5)	3 (37,5)	8	0,048	2 (25,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	8	0,745
	Sim	2 (66,7)	0 (0,0)	1 (33,3)	3		1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0,0)	4	
Etilismo	Não	1 (14,3)	4 (57,1)	2 (28,6)	7	0,500	2 (28,6)	4 (57,1)	1 (14,3)	7	0,999
	Sim	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1		0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2	
Localização tumoral	Parótida	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1	0,576	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1	0,635
	Submandibular	2 (100,0)	0 (0,0)	0 (0,0)	2		0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2	
	Palato	1 (25,0)	1 (25,0)	2 (50,0)	4		1 (25,0)	3 (75,0)	0 (0,0)	4	
	Otos	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	6		1 (5,3)	10 (52,6)	8 (42,1)	19	
Tamanho do tumor	Menor que 4cm	2 (20,0)	4 (40,0)	4 (40,0)	10	0,441	3 (27,3)	6 (54,5)	2 (18,2)	11	0,999
	Maior que 4cm	2 (66,7)	1 (33,3)	0 (0,0)	3		1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	3	
Tipo histológico	Cribriforme	1 (20,0)	3 (60,0)	1 (20,0)	5	0,881	2 (40,0)	3 (60,0)	0 (0,0)	5	0,357
	Tubular	0 (0,0)	1 (100,0)	0 (0,0)	1		0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100)	1	
	Cribriforme e tubular	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2		0 (0,0)	2 (100,0)	0 (0,0)	2	
	Cribriforme, tubular e sólido	0 (0,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	1		0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2	
Invasão Vascular	Não	3 (30,0)	3 (30,0)	4 (40,0)	10	0,720	3 (27,3)	6 (54,5)	2 (18,2)	11	0,999
	Sim	1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	3		1 (33,3)	2 (66,7)	0 (0,0)	3	
Invasão Perineural	Não	0 (0,0)	2 (50,0)	2 (50,0)	4	0,576	1 (20,0)	4 (80,0)	0 (0,0)	5	0,739
	Sim	3 (37,5)	3 (37,5)	2 (25,0)	8		2 (25,0)	4 (50,0)	2 (25,0)	8	
Linfonodos acometidos	Não	3 (42,9)	2 (28,6)	2 (28,6)	7	1,000	1 (14,3)	6 (85,7)	0 (0,0)	7	0,067
	Sim	0 (0,0)	1 (50,0)	1 (50,0)	2		0 (0,0)	1 (33,3)	2 (66,7)	3	
Recidiva	Não	2 (22,2)	3 (33,3)	4 (44,4)	9	0,441	2 (20,0)	6 (60,0)	2 (20,0)	10	0,552
	Sim	2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	4		2 (50,0)	2 (50,0)	0 (0,0)	4	
Metástase	Não	1 (16,7)	2 (33,3)	3 (50,0)	6	0,510	2 (28,6)	5 (71,4)	0 (0,0)	7	0,494
	Sim	3 (42,9)	3 (42,9)	1 (14,3)	7		2 (28,6)	3 (42,9)	2 (28,6)	7	

4.2.7 Análise de comparação dos miRNAs em relação á sobrevida dos casos de carcinoma adenoide cístico

Considerando o número reduzido de amostras, e desses, apenas 2 pacientes foram a óbito, não foi possível realizar a análise de sobrevida.

5 DISCUSSÃO

No presente trabalho, foi avaliada a expressão das proteínas das vias MAPK e PI3K/AKT, que são ativadas pela ligação do fator de células-tronco (SCF) ao receptor tirosina quinase c-Kit. Além disso, foi avaliada a expressão dos microRNAs miR-221 e miR-222, dos quais, Kit é descrito como alvo. A casuística utilizada em nossa pesquisa, continha como modelo biológico o adenoma pleomórfico (AP) e o carcinoma adenoide cístico (CAC), que representam neoplasia benigna e maligna das glândulas salivares, respectivamente, e são provenientes do mesmo sítio de origem – o ducto intercalar da glândula salivar (TETSU et al. 2010; ADELSTEIN et al. 2012; CARLSON et al. 2013). Ademais, nossa casuística incluiu tumores parafinados para a técnica de imunoistoquímica e tecido fresco/congelado para a análise do miRNA.

Nossos casos de adenoma pleomórfico mostraram características similares a estudos publicados na literatura científica. A maioria dos pacientes avaliados nesse estudo era do sexo feminino, com mais de 40 anos e a localização mais comum da neoplasia foi a glândula parótida (MENDENHALL et al. 2008; ITO et al. 2009; EMODI et al. 2010). A incidência de recorrências do tumor foi de 16% dos casos parafinados estudados, e 8% dos casos de tecido fresco estudados. Outros autores mostram que o adenoma pleomórfico é uma neoplasia com significativo índice de recidivas, relatando uma porcentagem entre 20% e 45% (MOONIS

et al. 2007; MENDENHALL et al. 2008). Do ponto de vista histopatológico, os tumores analisados também seguiram o padrão já bem descrito na literatura, com células epiteliais e mioepiteliais sem atipia e intenso pleomorfismo arquitetural (ELLIS e AUCLAIR 1995; ITO et al. 2009).

Em relação aos casos de carcinoma adenoide cístico, nossa casuística de tecido fresco/congelado mostrou igual distribuição em relação ao sexo. Já nos casos de tumores conservados em parafina, houve maior frequência no sexo feminino. Alguns estudos mostram igual distribuição em relação ao sexo, enquanto outros relatam predileção pelo sexo feminino (NEVILLE et al. 1995; ELLIS e AUCLAIR 1996; TOMMASI e LIMA 2002; REGEZI et al. 2008). A maioria dos pacientes avaliados neste estudo, tinham mais de 40 anos de idade e apresentaram variabilidade na localização tumoral. Dados da literatura também indicam essa idade de ocorrência e a variedade de sítios anatômicos acometidos por essa neoplasia; entre as mais comuns estão a glândula parótida, submandibular e as glândulas salivares menores (TOMMASI e LIMA 2002; KOKEMUELLER et al. 2004; REGEZI et al. 2008).

A casuística de carcinoma adenoide cístico da nossa pesquisa corroborou as evidências de outros estudos publicados na literatura científica. O sítio mais comumente afetado por metástases foi o pulmão, seguido de ossos, fígado e cérebro. A terapia foi a ressecção cirúrgica com margem de segurança e radiação pós-operatória. Porém, terapia sistêmica eficaz ainda é um obstáculo para a melhoria dos resultados clínicos (CHEN et al. 2007; CARLSON et al. 2008; TETSU et al. 2010; ADELSTEIN et al.

2012; PHUCHARÉON et al. 2014). Do ponto de vista histopatológico, os CACs analisados também seguiram um padrão já bem descrito na literatura: presença de células ductais e mioepiteliais provenientes dos ductos intercalares. Foram observados os três padrões microscópicos: tubular, cribriforme e sólido, sendo a variante cribriforme a mais prevalente (REGEZI e BATSAKIS 1977; ELLIS e AUCLAIR 1996; ALVES et al. 2005; BELL e HANNA 2012; PHUCHARÉON et al. 2014).

O proto-oncogene c-kit é um receptor de tirosina quinase, componente essencial da proliferação celular, diferenciação e devido a sua função, tem sido associado a ocorrência de metástases. Depois de ativado, o c-kit induz diversas respostas intracelulares através de grandes cascatas de sinalização de vias como PI3K/AKT - *phosphoinositide 3-Kinase/Protein Kinase B* e MAPK – *Mitogen-Activated Protein Kinase* (RAS - *rat sarcoma viral oncogene homolog*, RAF - *effector of Ras*, MEK - *MAP kinase-ERK kinase* e ERK- *Extracellular Regulated Kinase*). A mutação ou superexpressão da proteína c-kit pode desorganizar o crescimento celular e resultar na formação de tumores, como tem sido relatado em diversos tipos de neoplasias como gastrointestinais (GIST), tumores de pulmão, colorretal, tumor de Ewing's, leucemias mielóide crônica, melanoma e tumores epiteliais. A proteína c-kit pode ser expressa em tumores derivados de tecidos que já expressam o marcador, como por exemplo, neurofibromas, melanoma; em alguns casos os tumores parecem adquirir a expressão deste fator, como neoplasias do pulmão, carcinoma adenoide cístico e carcinoma

do cólon (LASOTA et al. 2000; MIETTINEN e LASOTA 2005; VILA et al. 2009; TANG 2010; TETSU et al. 2010; PHUCHAREON et al. 2014).

Em nossos casos de adenoma pleomórfico das glândulas salivares, a expressão imunoistoquímica do c-kit foi detectada em células luminais, similar ao observado no estudo imunoistoquímico realizado por (ANDREADIS et al. 2006). Entretanto, também observamos células mioepiteliais isoladas no estroma tumoral positivas para o marcador. Esse resultado é intrigante, pois permanece por ser esclarecida a origem dessas células isoladas.

Em relação aos casos de carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares, BELL e HANNA (2012) relataram que a maioria desses tumores superexpressam c-kit, porém sua expressão é limitada às células epiteliais, exatamente como evidenciou nosso estudo, onde foram observadas positividade para c-kit somente nas células ductais. Porém o mecanismo de expressão de c-kit no carcinoma adenoide cístico não é atualmente bem elucidado, mas pode envolver múltiplos eventos genéticos e epigenéticos.

A análise imunoistoquímica de fatores proteicos presentes na via PI3K/AKT/mTOR, a qual é responsável pela sobrevivência, divisão e metabolismo celular, mostrou-se parcialmente positiva nos tumores incluídos no estudo (sendo o fator PI3K negativo, principalmente no CAC). Outros pesquisadores também utilizaram essa abordagem laboratorial para a investigação da via PI3K/AKT/mTOR no carcinoma adenoide cístico. Um bom exemplo dessa abordagem foi o trabalho desenvolvido por (VOLKER et al. 2009) que mostrou que das 29 amostras utilizadas no seu estudo, todas

expressavam a proteína p-AKT, relatando que a ativação e a fosforilação da proteína AKT por PI3K (phosphatidylinositol 3-Kinase) frequentemente aparece em tumores malignos (SCHLEGEL et al. 2000; ELSTROM et al. 2004). AKT fosforilada leva à proliferação, crescimento tumoral e a diminuição da apoptose, bem como diminui a estimulação da glicólise aeróbica em células tumorais. Essa ideia foi baseada na Teoria de Otto Heinrich Warburg (1883 – 1970) em 1924, que descreve o aumento da utilização de glicose em todos os tumores malignos, sugerindo portanto, que a ativação de PI3K/AKT/mTOR poderia ser responsável por processos metabólicos durante a carcinogênese (VOLKER et al. 2009). Por outro lado, DE LIMA et al. (2009), indicaram que p-AKT pode estar relacionada com a tumorigênese do CAC, mas que não deve estar diretamente envolvida na progressão tumoral.

Em estudo realizado por SUZUKI et al. (2012) com 47 tipos de carcinomas de glândulas salivares, incluindo o CAC (5 casos), relatou a positividade do marcador AKT fosforilado tanto no núcleo como no citoplasma das células neoplásicas em 3 dos 5 casos de CAC. Além disso, foi observado positividade da proteína mTOR fosforilada em 2 dos 5 casos estudados no citoplasma e ocasionalmente no núcleo celular. Segundo esse mesmo estudo, resultados sugerem que a sinalização da via PI3K/AKT para mTOR (*mTOR signaling*) pode ser induzida dependente da ativação de AKT ou por mecanismos independentes da ativação da proteína AKT. Esses achados corroboram os nossos, pois na maioria dos casos não houve

expressão da proteína AKT, porém observou-se positividade da proteína mTOR.

Já no adenoma pleomórfico, assim como nossos achados, YU et al. (2014) observaram expressão da proteína mTOR fosforilada no citoplasma das células epiteliais que compõem o adenoma pleomórfico, mostrando positividade significativa ($p < 0,001$) quando comparada as glândulas salivares normais. Nesse contexto, CLAUDITZ et al. (2013) mostraram que dos 48 APs estudados, 25 mostraram positividade da proteína p-mTOR sugerindo que a via AKT/mTOR tem uma relevância funcional nos tumores das glândulas salivares.

Em nossa casuística, a sobrevida câncer-específica dos pacientes portadores de CAC – mTOR positivo, mostrou-se significativamente aumentada ($p = 0,040$), apesar da maioria dos estudos sugerirem que a inibição de mTOR reduz a progressão do câncer e sua ativação determine um pior prognóstico, por estar envolvido com angiogênese, crescimento e proliferação celular de diversos tipos tumorais (HAGER et al. 2009; HIRASHIMA et al. 2010; ZHOU et al. 2010; DOBASHI et al. 2011; SUZUKI et al. 2012; CLAUDITZ et al. 2013). Nossos achados vão ao encontro com estudo realizado por SCHULTZ et al. (2010), que demonstraram que pacientes com expressão de mTOR em carcinomas uroteliais apresentaram melhor sobrevida, sugerindo que a expressão constitutiva de mTOR seja necessária para atividades metabólicas normais do urotélio e de outros tipos celulares (GIBBONS et al. 2009, SCHULTZ et al. 2011) e que a manutenção

da sua ativação, ainda que parcial, seja um fator prognóstico favorável em alguns tipos de câncer.

Em neoplasias gástricas, a expressão do p-mTOR em carcinomas invasivos também mostrou efeito protetor na sobrevida doença específica (XIAO et al. 2009). Esses achados, assim como o nosso, sugerem que a via mTOR possa estar sob interferências inibitórias nesses tumores, possivelmente oriundas de suas interações com outras vias essenciais predominantes nesses tipos tumorais, como a MAPK ou ainda, a atividade de mTOR possa ser controlada em nível pós-transcricional, sendo que a sua expressão aumentada não necessariamente corresponderia à progressão do ciclo celular (GINGRAS et al. 2001).

A via MAPK (Ras/Raf/MEK1/2 e Erk1/2) tem sido considerada como um regulador positivo de iniciação tumoral, progressão e proliferação celular. GUPTA et al. (2009) estudaram a expressão de P-MAPK no carcinoma adenoide cístico e relataram a positividade em 5 das 9 amostras estudadas, sugerindo essa via como alvo terapêutico para inibição do crescimento tumoral. Porém, em nossos achados, observamos positividade apenas do B-Raf e MEK-2, sendo o MEK-1 positivo apenas em parte da nossa casuística, sugerindo então que a via pode estar inativa e essas duas proteínas podem ter sido ativadas por ligação-cruzada já que o mecanismo de ativação do receptor c-Kit pode ativar distintas vias de sinalização ou cascatas, como PI3K/AKT, MAPK/Ras, JAK/STAT, família de tirosina quinase Scr (SFK), fosfolipases (PLC) e o fator MITF (TSUJIMURA et al. 1996; UEDA et al. 2002). Ou ainda, a ativação constitutiva da via MAPK resultou de mutações

nos genes que codificam principalmente BRAF, visto que um estudo de WETTERSKOG et al. (2013), demonstraram que subconjuntos de carcinoma adenoide cístico de mama e de cabeça e pescoço, apresentaram mutações em genes da via RAS, incluindo BRAF e KRAS. Contudo, os resultados de nosso estudo corroboram os da pesquisa realizada por TETSU et al. (2010) o qual sugere que a via MAPK é inibida no carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares por terem observado uma redução da atividade de MAPK (ERK1/2) nas células tumorais.

No presente estudo, a expressão de MEK-2 foi estatisticamente associada a região da glândula submandibular e palato, enquanto que na glândula parótida, a maioria dos casos não expressou a proteína. Isso talvez se deva a origem embrionária de cada glândula, já que a parótida tem origem exclusivamente ectodérmica (HOLMBERG e HOFFMAN 2014).

Em outro estudo do nosso grupo MANNARINI (2012) que utilizou como modelo de estudo o carcinoma epidermóide da laringe, foi observada a positividade da proteína MEK-2 fosforilada nesses tumores, porém, assim como em nossos achados, o ERK1/2 foram negativos em todos os casos. O significado da expressão desse marcador na literatura ainda é controverso, dependendo basicamente do tecido analisado (MILDE-LANGOSCH 2005). Segundo HO et al. (2012), com a proteína ERK 1/2 inativa, o alvo da proteína MEK poderia ser a proteína anti-apoptótica MCL-1, ativada também pelo mTOR, podendo resultar em proliferação, invasão e metástase. Outro aspecto é que, a sinalização MAPK regula a via Jagged/Notch e aumenta o processo de angiogênese. Interessantemente o bloqueio da sinalização

MAPK por inibidores de MEK reduziu a sinalização Notch na linhagem celular TPC-1 derivada de carcinoma papilífero de tireoide, indicando que MEK pode também controlar a expressão de NOTCH1 (ZENG et al. 2005).

Ainda no estudo de MANNARINI (2012) foi observado que a positividade do marcador MEK resultou em maior sobrevida dos pacientes portadores de carcinoma epidermóide da laringe. Esse achado vai ao encontro ao nosso estudo, onde a sobrevida câncer-específica dos pacientes portadores de CAC – MEK-2 positivo, mostrou-se significativamente aumentada ($p=0,005$).

Esses dados sugerem que assim como a proteína mTOR, a expressão de MEK-2 seja necessária para atividades metabólicas normais de alguns tipos celulares e que a manutenção da sua ativação, seja um fator prognóstico favorável em alguns tipos de câncer. Além disso, a via MAPK pode estar sob interferências inibitórias nesses tumores, possivelmente oriundas de suas interações com outras vias essenciais como NOTCH.

Para melhor compreensão desses fenômenos moleculares, buscamos uma explicação baseada no comportamento biológico das neoplasias das glândulas salivares, formulando a seguinte hipótese:

A literatura é consensual no conceito de que a maioria das neoplasias das glândulas salivares (benignas ou malignas) têm crescimento lento e os índices de proliferação celular são baixos. Entretanto, provavelmente, as células neoplásicas devem perder a capacidade de senescência e morte. Esse comportamento, pelo menos em parte, pode ser explicado pelos

resultados obtidos em nosso estudo, segundo os esquemas das vias moleculares analisadas conforme demonstrado na Figura 3.:

Assim, em nossos resultados temos que a partir de estímulos gerados na membrana celular por meio do receptor Kit, a cascata PI3K/AKT/mTOR mantém-se ativada, o que pode facilitar a manutenção das células tumorais. Já a cascata Ras apresenta pontos de interrupção na expressão de suas proteínas fosforiladas, o que, de certa forma, mantém a neoplasia com taxas baixas de proliferação celular.

Essa explicação é parcial, e, no ano de 2013, testamos numerosos clones diferentes de anticorpos e vias colaterais de sinalização para podemos formar um quadro global desta hipótese. Entretanto, todos os resultados que obtivemos com os ensaios, nos levaram a esse mesmo ponto.

Estudos demonstraram que o CAC vem sendo caracterizado pela presença de uma translocação cromossomal $t(6:9)(q22-23;p23-24)$, resultando na fusão do oncogene MYB e do fator de transcrição NFBI. O gene de fusão resultante MYB-NFBI ativa a transcrição de oncoproteínas alvo de MYB com importância fundamental para a transformação oncogênica (RAMSAY e GONDA 2008; PERSSON et al. 2009; STENMAN et al. 2010). A prevalência do gene de fusão é relatado entre 30-100% em CACs das glândulas salivares, e mesmo sem o gene de fusão MYB-NFIB, MYB demonstrou ser consistentemente superexpresso em CACs (PERSSON et al. 2009; BRILL et al. 2011; MITANI et al. 2011; WEST et al. 2011). Estas observações fornecem evidências circunstanciais de que MYB é

provavelmente um indutor do CAC, independentemente da localização anatômica (WETTERSKOG et al. 2013). Agora os estudos são para o desenvolvimento de inibidores de MYB, MYB-NFBI e seus alvos moleculares, incluindo a inibição das vias de sinalização em que estão agindo ou inibição da cascata de seus alvo, como o KIT (STENMAN 2005; TETSU et al. 2010; CARLSON et al. 2013). Contudo, características genéticas de alguns CAC de glândulas salivares foram investigados, e estes tumores demonstraram baixos níveis de instabilidade genética, perda frequente de 6q e 9p, e uma baixa frequência dos altos níveis de amplificação de genes relacionados ao câncer. Nas glândulas salivares, a amplificação de CCND1, MDM2 e CTTN foram relatadas em apenas 5% dos casos (GREER et al. 2007; BERNHEIM et al. 2008). Com base nessas observações, é plausível que outros mecanismos de aberrações genéticas, possam induzir o comportamento clínico diversificado dos CACs, incluindo mutações de KIT (VILA et al. 2009; TETSU et al. 2010). Porém, os dados sobre o impacto do tratamento com inibição de c-kit permanecem conflitantes, visto que alguns pesquisadores, demonstraram que o tratamento com Gleevec (Mesilato de Imatinibe), inibiu o crescimento do CAC (ALCEDO et al. 2004; FAIVRE et al. 2005), em contraste, ensaios clínicos fase II com a mesma droga não induziram resposta significativa em 27 pacientes com CAC, que apresentavam alta expressão de c-Kit em seus tumores (HOTTE et al. 2005).

Atualmente a importância da regulação pós-transcricional (miRNAs) dos genes vem sendo muito estudada em diversos tipos tumorais (VOLINIA

et al. 2006; ZHANG et al. 2007; SASSEN et al. 2008). Contudo, poucos estudos têm avaliado o papel dos miRNAs no desenvolvimento dos tumores das glândulas salivares (CHIOSEA et al. 2008; ZHANG et al. 2009; CHEN et al. 2014; ANDREASEN et al. 2015; LIU et al. 2015). FELICETTI et al. (2008 a e b), descreveram o envolvimento dos miRNAs 221 e 222 anormalmente expressos em melanomas, favorecendo a indução do fenótipo maligno por baixa regulação do receptor c-kit. Em outro estudo envolvendo melanomas, o grupo de IGOUCHEVA e ALEXEEV (2009) demonstrou que a expressão de c-Kit é regulada por micro-RNAs, em particular pelo miR-221, podendo ser um novo alvo terapêutico.

HE et al. 2005, observaram um aumento da regulação desses dois miRNAs no carcinoma papilífero da tireoide caracterizado pela perda de c-Kit. Apenas um estudo envolvendo adenoma pleomórfico e o miR-222 demonstrou que a expressão do desse último foi maior em amostras de saliva de pacientes com tumor maligno em comparação com a expressão em amostras de saliva de pacientes com um tumor benigno (MATSE et al. 2013). Entretanto, em nosso estudo a expressão dos miRNAs 221 e 222 não apresentaram um padrão definido que discrimine as neoplasias de glândulas salivares: adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico. Isso pode nos sugerir que por terem o mesmo sítio de origem, esses dois tipos tumorais possuem algumas características biológicas semelhantes.

Essas informações podem ser importantes na área de pesquisa translacional, já que os medicamentos quimioterápicos que atuam nas vias estudadas já são uma realidade para outros tipos de neoplasias. Nessa linha

de análise, GOMES et al. (2007) sugeriram que a avaliação do estado do c-kit tem sido utilizado na rotina de laboratórios de diagnóstico, um fator prognóstico de sobrevida, já que a mutação no gene KIT é a principal alteração encontrada em GISTs, variando de 30% a 90% dos casos.

Nos tumores de glândulas salivares, a avaliação da expressão do c-kit também tem sido empregada em alguns casos de carcinoma adenoide cístico, entretanto a real importância deste marcador nesse tipo de neoplasia ainda não é clara (HOLST et al. 1999; JENG et al. 2000; AZOULAY et al. 2005; FREIER et al. 2005; LIN et al. 2005; SØRENSEN et al. 2006; VILA et al. 2009).

Estudos futuros serão necessários para se estabelecer a função dessas e de outras vias como alvos moleculares na terapia de pacientes com neoplasias das glândulas salivares.

6 CONCLUSÃO

Através do presente estudo, foi possível observar que:

- A expressão das proteínas provenientes da cascata de c-Kit em ambos adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico, indicam que essas neoplasias compartilham vias de ativação em comum, mesmo sendo neoplasia benigna ou maligna.
- Apesar de a proteína c-Kit ser expressa em ambas as neoplasias – AP e CAC, sua influência sobre as vias de sinalização MAPK e PI3K/AKT/mTOR ainda permanece por ser estabelecida.
- Os microRNAs 221 e 222 não mostraram correlação consistente com a expressão de c-Kit nos tipos tumorais estudados, apesar de apresentarem uma tendência relacionada a expressão diminuída da proteína c-Kit.
- A expressão dos miRNAs 221 e 222 não apresentou um padrão definido que discrimine os tumores de glândulas salivares: adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico.
- Expressão das proteínas mTOR e MEK-2 fosforilada foram associadas com melhor sobrevida câncer-específica dos pacientes portadores de carcinoma adenoide cístico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adelstein DJ, Koyfman SA, El-Naggar AK, Hanna EY. Biology and management of salivary gland cancers. **Semin Radiat Oncol** 2012; 22:245-53.

Alcedo JC, Fabrega JM, Arosemena JR, Urrutia A. Imatinib mesylate as treatment for adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: report of two successfully treated cases. **Head Neck** 2004; 26: 829-31.

Alessi DR, Pearce LR, Garcia-Martinez JM. New insights into mTOR signaling: mTORC2 and beyond. **Sci Signal** 2009; 2:pe27.

Alkan S, Izban KF. Immunohistochemical localization of phosphorylated AKT in multiple myeloma. **Blood** 2002; 99:2278-9.

Altman KW, Perez-Jaffe LA, Bigelow DC, et al. Pathologic quiz case 1. Adenoid cystic carcinoma of the parotid gland. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, 1997; 123:1352-5.

Altomare DA, Khaled AR. Homeostasis and the importance for a balance between AKT/mTOR activity and intracellular signaling. **Curr Med Chem** 2012; 19:3748-62.

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

Andreadis D, Epivatianos A, Pouloupoulos A, et al. Detection of C-KIT (CD117) molecule in benign and malignant salivary gland tumours. **Oral Oncol** 2006; 42:57-65.

Andreasen S, Therkildsen MH, Grauslund M, Friis-Hansen L, Wessel I, Homøe P. Activation of the interleukin-6/Janus kinase/STAT3 pathway in pleomorphic adenoma of the parotid gland. **APMIS** 2015; 123:706-15.

Azoulay S, Laé M, Fréneaux P, et al. KIT is highly expressed in adenoid cystic carcinoma of the breast, a basal-like carcinoma associated with a favorable outcome. **Mod Pathol** 2005; 18:1623-31.

Batsakis JG, Regezi JA, Luna MA, et al. Histogenesis of salivary gland neoplasms: a postulate with prognostic implications. **J Laryngol Otol** 1989; 103:939-44.

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

Bernheim A, Toujani S, Saulnier P et al. High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma. **Lab Invest** 2008; 88:464-73.

Bloethner S, Chen B, Hemminki K, et al. Effect of common B-RAF and N-RAS mutations on global gene expression in melanoma cell lines. **Carcinogenesis** 2005; 26:1224-32.

Brill LB, Kanner WA, Fehr A et al. Analysis of MYB expression and MYB–NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. **Mod Pathol** 2011; 24:1169-76.

Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. **Nat Rev Cancer** 2006; 6:857-66.

Carlson ER, Kim J, Mirowski GW, Stewart JCB, Zarbo RJ. Salivary gland diseases. In: Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK, editors. **Oral pathology: clinical pathology correlations**. St Louis: Saunders; 2008. p.179-215.

Carlson J, Licitra L, Locati L, Raben D, Persson F, Stenman G. Salivary gland cancer: an update on present and emerging therapies. **Am Soc Clin Oncol Educ Book** 2013;257-63.

Chen AM, Garcia J, Lee NY, Bucci MK, Eisele DW. Patterns of nodal relapse after surgery and postoperative radiation therapy for carcinomas of the major and minor salivary glands: what is the role of elective neck irradiation? **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2007; 67:988-94.

Chen XN, Wang KF, Xu ZQ, et al. MiR-133b regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis by targeting Bcl-w and Akt1. **Cancer Cell Int** 2014; 19; 14:70.

Chiosea SI, Barnes EL, Lai SY, et al. Mucoepidermoid carcinoma of upper aerodigestive tract: clinicopathologic study of 78 cases with immunohistochemical analysis of Dicer expression. **Virchows Arch** 2008; 452:629-35.

Clauditz TS, Gontarewicz A, Bokemeyer C et al. Abundant expression of mTOR kinase in salivary gland tumors - potentials as therapy target? **J Oral Pathol Med** 2013; 42:769-73.

Coca-Pelaz A; Rodrigo JP; Bradley PJ, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--an update. **Oral Oncol** 2015; 51:652-61.

Coup A; Williamson JM; Curley, JW. Septal, widely infiltrative and clinically occult adenoid cystic carcinoma of the parotid gland. **J Laryngol Otol** 1997; 111:491-2.

Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The PI3K pathway as drug target in human cancer. **J Clin Oncol** 2010; 28:1075-83.

Cowland JB, Hother C, Grønbæk K. MicroRNAs and cancer. **APMIS** 2007; 115: 1090-106.

Dai DL, Martinka M, Li G. Prognostic significance of activated Akt expression in melanoma: a clinicopathologic study of 292 cases. **J Clin Oncol** 2005; 23:1473-82.

Davies H, Bignell GR, Cox C, et al. Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature** 2002; 417:949-54.

de Lima Mde D, Marques YM, Alves Sde M Jr, et al. MDM2, P53, P21WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. **Cancer Epidemiol** 2009; 33:142-6.

Dhillon AS, Hagan S, Rath O, Kolck W. MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene** 2007; 26:3279-90.

Dobashi Y, Suzuki S; Kimura M et al. Paradigm of kinase-driven pathway downstream of epidermal growth factor receptor/AKT in human lung carcinomas. **Hum Pathol** 2011; 42:214-26.

Edling CE, Hallberg B. c-Kit-a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:1995-8.

Edwards PC, Bhuiya T, Kelsch RD. C-kit expression in the salivary gland neoplasms adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma, and monomorphic adenoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2003; 95:586-93.

Efeyan A, Sabatini DM. mTOR and cancer: many loops in one pathway. **Current Opinion in Cell Biology** 2010; 22:169-76.

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

Elstrom RL, Bauer DE, Buzzai M, et al. Akt stimulates aerobic glycolysis in cancer cells. **Cancer Res** 2004, 64:3892-9.

Emodi O, El-Naaj IA, Gordin A, et al. Superficial parotidectomy versus retrograde partial superficial parotidectomy in treating benign salivary gland tumor (pleomorphic adenoma). **J Oral Maxillofac Surg** 2010; 68:2092-8.

Engström M, Karlsson R, Jönsson JI. Inactivation of the forkhead transcription factor FoxO3 is essential for PKB-mediated survival of hematopoietic progenitor cells by kit ligand. **Exp Hematol** 2003; 31:316-23.

Faivre S, Raymond E, Casiraghi O, Temam S, Berthaud P. Imatinib mesylate can induce objective response in progressing, highly expressing kit adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **J Clin Oncol** 2005; 23:6271-3.

Felicetti F, Errico MC, Segnalini P, Mattia G, Carè A. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. **Expert Rev Anticancer Ther** 2008a; 8:1759-65.

Felicetti F, Errico MC, Bottero L, et al. The promyelocytic leukemia zinc finger- microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. **Cancer Res** 2008b; 68:2745-54.

Felli N, Fontana L, Pelosi E, et al. MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:18081-6.

Freier K, Flechtenmacher C, Walch A, et al. Differential KIT expression in histological subtypes of adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary gland. **Oral Oncol** 2005; 41:934-9.

Gadd SJ; Ashman LK. A murine monoclonal antibody specific for a cell-surface antigen expressed by a subgroup of human myeloid leukaemias. **Leuk Res** 1985; 9:1329-36.

Garofalo M, Quintavalle C, Romano G, Croce CM, Condorelli G. miR221/222 in cancer: their role in tumor progression and response to therapy. **Curr Mol Med** 2012; 12:27-33.

Gasche JA, Goel A. Epigenetic mechanisms in oral carcinogenesis. **Future Oncol** 2012; 8:1407-25.

Gibbons JJ, Abraham RT, Yu K. Mammalian target of rapamycin: discovery of rapamycin reveals a signaling pathway important for normal and cancer cell growth. **Semin Oncol** 2009; 36:S3-S17.

Gingras AC, Raught B, Sonenberg N. Regulation of translation initiation by FRAP/mTOR. **Genes Dev** 2001; 15:807-26.

Gits CM, van Kuijk PF, Jonkers MB et al. MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours. **Br J Cancer** 2013; 109:1625-35

Gomes AL, Bardales RH, Milanezi F, Reis RM, Schmitt F. Molecular analysis of c-Kit and PDGFRA in GISTs diagnosed by EUS. **Am J Clin Pathol** 2007; 127: 89-96.

Goto Y, Kojima S, Nishikawa R et al. MicroRNA expression signature of castration-resistant prostate cancer: the microRNA-221/222 cluster functions

as a tumour suppressor and disease progression marker. **Br J Cancer** 2015; 113:1055-65.

Greer RO, Jr, Said S, Shroyer KR, Marileila VG, Weed SA. Overexpression of cyclin D1 and cortactin is primarily independent of gene amplification in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2007; 43:735-41.

Guerriere-Kovach PM, Hunt EL, Patterson JW, Glembocki JC, et al. Primary melanoma of the skin and cutaneous melanomatous metastases: comparative histologic features and immunophenotypes. **Am J Clin Pathol** 2004; 122:70-7.

Gupta AK, Wilke WW, Taylor EN, et al. Signaling pathways in adenoid cystic cancers: implications for treatment. **Cancer Biol Ther** 2009; 8:1947-51.

Hager M, Haufe H, Kemmerling R, et al. Increased activated AKT expression in renal cell carcinomas and prognosis. **J Cell Mol Med** 2009; 13:2181-8.

Haneline LS, White H, Yang FC, et al. Genetic reduction of class IA PI-3 kinase activity alters fetal hematopoiesis and competitive repopulating ability of hematopoietic stem cells in vivo. **Blood** 2006; 107:1375-82.

He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA** 2005; 102:19075-80.

Hirashima K, Baba Y, Watanabe M, et al. Phosphorylated mTOR expression is associated with poor prognosis for patients with esophageal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol** 2010; 17:2486-93.

Ho AL, Musi E, Ambrosini G, et al. Impact of combined mTOR and MEK inhibition in uveal melanoma is driven by tumor genotype. **PLoS One** 2012; 7:e40439.

Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. **Monogr Oral Sci** 2014; 24:1-13.

Holst VA, Marshall CE, Moskaluk CA, Frierson HF Jr. KIT protein expression and analysis of c-kit gene mutation in adenoid cystic carcinoma. **Mod Pathol** 1999; 12:956-60.

Horiguchi A, Oya M, Uchida A, Marumo K, Murai M. Elevated Akt activation and its impact on clinicopathological features of renal cell carcinoma. **J Urol** 2003; 169:710-3.

Hotte SJ, Winkquist EW, Lamont E et al. Imatinib mesylate in patients with adenoid cystic cancers of the salivary glands expressing c-kit: a Princess Margaret Hospital phase II consortium study. **J Clin Oncol** 2005; 23:585-90.

Huang J, Dibble CC, Matsuzaki M, Manning BD. The TSC1-TSC2 complex is required for proper activation of mTOR complex 2. **Mol Cell Biol** 2008; 28:4104-15.

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; 57:410-7.

lanez RCF. **Avaliação da presença de marcadores de células-tronco no adenoma pleomórfico: estudo de marcadores imunoistoquímicos e moleculares**. São Paulo, 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente]

Igoucheva O, Alexeev V. MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma. **Biochem Biophys Res Commun** 2009; 379:790-4.

Ihle MA, Trautmann M, Kuenstlinger H, et al. miRNA-221 and miRNA-222 induce apoptosis via the KIT/AKT signalling pathway in gastrointestinal stromal tumours. **Mol Oncol** 2015; 9:1421-33.

Iorio MV, Croce CM. MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics: a comprehensive review. **EMBO Mol Med** 2012; 4:143-59.

Ito FA, Jorge J, Vargas PA, Lopes MA. Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2009; 14:E57-61.

Jacinto E, Loewith R, Schmidt A, Lins S, et al. Mammalian TOR complex 2 controls the actin cytoskeleton and is rapamycin insensitive. **Nat Cell Biol** 2004; 6:1122-28.

Jeng YM, Lin CY, Hsu HC. Expression of the c-kit protein is associated with certain subtypes of salivary gland carcinoma. **Cancer Lett** 2000; 154:107-11.

Johnson GL, Lapadat R. Mitogen-activated protein kinase pathways mediated by ERK, JNK, and p38 protein kinases. **Science** 2002; 298:1911-2.

Jones DCE; Baiton, R. Adenoid cystic carcinoma of the palate in a 9-year-old boy. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1990; 69:483-6.

Kiss O, Tokés AM, Vranic S et al. Expression of miRNAs in adenoid cystic carcinomas of the breast and salivary glands. **Virchows Arch** 2015; 467:551-62.

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

Kondo N, Toyama T, Sugiura H, Fujii Y, Yamashita H. miR-206 Expression Is Down-regulated in Estrogen Receptor α in human breast cancer. **Cancer Res** 2008; 68:5004-8.

Kreisberg JI, Malik SN, Prihoda TJ, et al. Phosphorylation of Akt (Ser473) is an excellent predictor of poor clinical outcome in prostate cancer. **Cancer Res** 2004; 64:5232-6.

Lasota J, Wozniak A, Sarlomo-Rikala M, et al. Mutations in exons 9 and 13 of KIT gene are rare events in gastrointestinal stromal tumors. a study of 200 cases. **Am J Pathol** 2000; 157:1091-5.

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

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

Lin CH, Yen RF, Jeng YM, et al. Unexpected rapid progression of metastatic adenoid cystic carcinoma during treatment with imatinib mesylate. **Head Neck** 2005; 27:1022-7.

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

Liu H, Chen X, Focia PJ, He X. Structural basis for stem cell factor-KIT signaling and activation of class III receptor tyrosine kinases. **EMBO J** 2007; 26:891-901.

Liu J, Shao C, Tan ML, Dum D, Ferris RL, Ha PK. The molecular biology of adenoid cystic carcinoma. **Head Neck** 2013; 34:1665-77.

Liu H, Du L, Wang R, et al. High frequency of loss of PTEN expression in human solid salivary adenoid cystic carcinoma and its implication for targeted therapy. **Oncotarget** 2015; 6:11477-91.

LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. **Drug Resist Updat** 2008; 11:32-50.

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

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** 2007a; 128:361-9.

Lourenço SV, Lima DM, Uyekita SH, Schultz R, de Brito T. Expression of beta-1 integrin in human developing salivary glands and its parallel relation with maturation markers: in situ hybridisation and immunofluorescence study. **Arch Oral Biol** 2007b; 52:1064-71.

Lynam-Lennon N, Maher SG, Reynolds JV. The roles of microRNA in cancer and apoptosis. **Biol Rev Camb Philos Soc** 2009; 84:55-71.

Lytle JR, Yario TA, Steitz JA. Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. **Proc Natl Acad Sci USA** 2007; 104:9667–72.

Mannarini L. **Fatores prognósticos em pacientes com carcinoma epidermoide de laringe estágio clínico T3 tratados por cirurgia, radioterapia ou associações terapêuticas.** São Paulo; 2012. [Tese de doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]

Matse JH, Yoshizawa J, Wang X et al. Discovery and prevalidation of salivary extracellular microRNA biomarkers panel for the noninvasive detection of benign and malignant parotid gland tumors. **Clin Cancer Res** 2013; 19:3032-8.

McCubrey JA, Steelman LS, Chappell WH, et al. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. **Biochim Biophys Acta** 2007; 1773:1263-84.

McFall MR, Irvine GH, Eveson JW. Adenoid cystic carcinoma of the sublingual salivary gland in a 16-year-old female--report of a case and review of the literature. **J Laryngol Otol** 1997; 111:485-8.

McKay MM, Morrison DK. Integrating signals from RTKs to ERK/MAPK. **Oncogene** 2007; 26:3113-21.

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

Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR pathways: cross-talk and compensation. **Trends Biochem Sci** 2011; 36:320-8.

Metzler M, Wilda M, Busch K, Viehmann S, Borkhardt A. High expression of precursor microRNA-155/BIC RNA in children with Burkitt lymphoma. **Genes Chromosomes Cancer** 2004; 39:167-9.

Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2005; 13:205-20.

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

Milde-Langosch K, Bamberger AM, Rieck G, et al. Expression and prognostic relevance of activated extracellular regulated kinases (ERK1/2) in breast cancer. **Br J Cancer** 2005; 92:2206-15.

Mitani Y, Rao PH, Futreal PA, et al. Novel chromosomal rearrangements and break points at the t(6;9) in salivary adenoid cystic carcinoma: association with MYB-NFIB chimeric fusion, MYB expression, and clinical outcome. **Clin Cancer Res** 2011; 17:7003-14.

Moonis G, Patel P, Koshkareva Y, et al. Imaging characteristics of recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. **AJNR Am J Neuroradiol** 2007; 28:1532-6.

Naeem M, Dahiya M, Clark JI, et al. Analysis of c-kit protein expression in small-cell lung carcinoma and its implication for prognosis. **Hum Pathol** 2002; 33:1182-7.

Nam SY, Lee HS, Jung GA, et al. Akt/PKB activation in gastric carcinomas correlates with clinicopathologic variables and prognosis. **APMIS** 2003; 111:1105-13.

Neville BW, Damm DD, Allen CN, Bouquot JE. **Patologia oral & maxilofacial**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1995. Patologia das glândulas salivares; p.346-8.

Perez-Tenorio G, Alkhori L, Olsson B, et al. PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2007; 13:3577-84.

Persson M, Andrén Y, Mark J, Horlings HM, Persson F, Stenman G. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. **Proc Natl Acad Sci USA** 2009; 106:18740-4.

Pittoni P, Piconese S, Tripodo C, Colombo MP. Tumor-intrinsic and -extrinsic roles of c-Kit: mast cells as the primary off-target of tyrosine kinase inhibitors. **Oncogene** 2011; 30:757-69.

Phuchareon J, van Zante A, Overdevest JB, McCormick F, Eisele DW, Tetsu O. c-Kit expression is rate-limiting for stem cell factor-mediated disease progression in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Transl Oncol** 2014; 7:537-45.

Ramsay RG, Gonda TJ. MYB function in normal and cancer cells. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:523-34.

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

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

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

Regezi JA, Sciubba JJ, Jordan RCK. **Patologia bucal correlações clinicopatológicas**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Doenças das glândulas salivares; p.179-215.

Sancak Y, Thoreen C, Peterson TR, et al. PRAS40 is an insulin-regulated inhibitor of the mTORC1 protein kinase. **Mol Cell** 2007; 25:903-15.

Sarbassov DD, Ali SM, Kim DH, et al. Rictor, a novel binding partner of mTOR, defines a rapamycin-insensitive and raptor-independent pathway that regulates the cytoskeleton. **Curr Biol** 2004; 14:1296-302.

Sarbassov DD, Guertin DA, Ali SM, Sabatini DM. Phosphorylation and regulation of Akt/PKB by the rictor-mTOR complex. **Science** 2005; 307:1098-1101.

Sassen S, Miska EA, Caldas C. MicroRNA: implications for cancer. **Virchows Arch** 2008; 452:1-10.

Schlegel J, Piontek G, Budde B, Neff F, Kraus A. The Akt/protein kinase B-dependent anti-apoptotic pathway and the mitogen-activated protein kinase cascade are alternatively activated in human glioblastoma multiforme. **Cancer Lett** 2000; 158:103-8.

Schmittgen TD. Regulation of microRNA processing in development, differentiation and cancer. **J Cell Mol Med** 2008; 12:1811-9.

Schultz L, Albadine R, Hicks J, et al. Expression status and prognostic significance of mammalian target of rapamycin pathway members in urothelial carcinoma of urinary bladder after cystectomy. **Cancer** 2010; 116:5517-26.

Schultz L, Chaux A, Albadine R, et al. Immunoexpression status and prognostic value of mTOR and hypoxia-induced pathway members in primary and metastatic clear cell renal cell carcinoma. **Am J Surg Pathol** 2011; 10:1549-56.

Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. WHO international histological classification of tumours. tentative histological classification of salivary gland tumours. **Pathol Res Pract** 1990; 186:555-81.

Sengupta S, Peterson TR, Sabatini DM. Regulation of the mTOR complex 1 pathway by nutrients, growth factors, and stress. **Mol Cell** 2010; 40:310-22.

Singh SK, Bhadra MP, Girschick HJ, Bhadra U. MicroRNAs – micro in size but macro in function. **FEBS Journal** 2008; 275:4929-44.

Sørensen KB, Godballe C, de Stricker K, Krogh A. Parotid carcinoma: expression of kit protein and epidermal growth factor receptor. **J Oral Pathol Med** 2006; 35:286-91.

Stenman G. Fusion oncogenes and tumor type specificity-insights from salivary gland tumors. **Semin Cancer Biol** 2005; 15:224-35.

Stenman G, Andersson MK, Andrén Y. New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of MYB in human cancer. **Cell Cycle** 2010; 9:2986-95.

Su W, Aloï MS, Garden GA. MicroRNAs mediating CNS inflammation: small regulators with powerful potential. **Brain Behav Immun** 2016; 52:1-8.

Suire S, Hawkins P, Stephens L. Activation of phosphoinositide 3-kinase gamma by Ras. **Curr Biol** 2002; 12:1068-75.

Sun BK, Tsao H. Small RNAs in development and disease. **J Am Acad Dermatol** 2008; 59:725-737.

Suzuki S, Dobashi Y, Minato H, Tajiri R, Yoshizaki T, Ooi A. EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas. **Virchows Arch** 2012; 461:271-82.

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

Teshima TH, Ianez RF, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Soares FA, Lourenço SV. Development of human minor salivary glands: expression of mucins according to stage of morphogenesis. **J Anat** 2011; 219:410-7.

Terakawa N, Kanamori Y, Yoshida S. Loss of PTEN expression followed by Akt phosphorylation is a poor prognostic factor for patients with endometrial cancer. **Endocr Relat Cancer** 2003; 10:203-8.

Tetsu O, Phuchareon J, Chou A, Cox DP, Eisele DW, Jordan RC. Mutations in the c-Kit gene disrupt mitogen-activated protein kinase signaling during tumor development in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Neoplasia** 2010; 12:708-17.

Tommasi AF, Lima AAS. Semiologia das glândulas salivares. In: Tommasi AF, editor. **Diagnóstico em patologia bucal**. 3ª ed. São Paulo: Pancast; 2002. p.374-5.

Tran N, McLean T, Zhang X, et al. MicroRNA expression profiles in head and neck cancer cell lines. **Biochem Biophys Res Commun** 2007; 358:12-17.

Tsujimura T, Morii E, Nozaki M, et al. Involvement of transcription factor encoded by the mi locus in the expression of c-kit receptor tyrosine kinase in cultured mast cells of mice. **Blood** 1996; 88: 1225-33.

Ueda S, Mizuki M, Ikeda H, et al. Critical roles of c-kit tyrosine residues 567 and 719 in stem cell factor-induced chemotaxis: contribution of src family kinase and PI3-kinase on calcium mobilization and cell migration. **Blood** 2002; 99:3342-49.

Ustündağ E, Iseri M, Aydın O, et al. Adenoid cystic carcinoma of the tongue. **J Laryngol Otol** 2000; 114:477-80.

Wal JEDV, Leverstein H, Snow GB, et al. Parotid gland tumors: histologic reevaluation and reclassification of 478 cases. **Head Neck** 1998; 20:204-7.

West RB, Kong C, Clarke N, et al. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. **Am J Surg Pathol** 2011; 35:92-9.

Wetterskog D, Wilkerson PM, Rodrigues DN, et al. Mutation profiling of adenoid cystic carcinomas from multiple anatomical sites identifies mutations in the RAS pathway, but no KIT mutations. **Histopathology** 2013; 62:543-50.

van der Wal JE, Leverstein H, Snow GB, Kraaijenhagen HA, van der Waal I. Parotid gland tumors: histologic reevaluation and reclassification of 478 cases. **Head Neck** 1998; 20:204-7.

Vila L, Liu H, Al-Quran SZ, et al. Identification of c-kit gene mutations in primary adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. **Mod Pathol** 2009; 22:1296-302.

Volinia S, Calin GA, Liu CG, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103:2257-61.

Völker HU, Scheich M, Berndt A, et al. Expression of p-AKT characterizes adenoid cystic carcinomas of head and neck with a higher risk for tumor relapses. **Diagn Pathol** 2009; 4:18.

Xiao L, Wang YC, Li WS, Du Y. The role of mTOR and phospho-p70S6K in pathogenesis and progression of gastric carcinomas: an immunohistochemical study on tissue microarray. **J Exp Clin Cancer Res** 2009; 28:152.

Yanaihara N, Caplen N, Bowman E, et al. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. **Cancer Cell** 2006; 9:189-98.

Yu GT, Bu LL, Zhao YY, et al. Inhibition of mTOR reduce Stat3 and PAI related angiogenesis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Am J Cancer Res** 2014; 4:764-75.

Zeng Q, Li S, Chepeha DB, et al. Crosstalk between tumor and endothelial cells promotes tumor angiogenesis by MAPK activation of Notch signaling. **Cancer Cell** 2005; 8:13-23.

Zhang B, Pan X, Cobb GP, Anderson TA. MicroRNAs as onco- genes and tumor suppressors. **Dev Biol** 2007; 302:1-12.

Zhang X, Cairns M, Rose B, et al. Alterations in miRNA processing and expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland. **Int J Cancer** 2009; 124:2855-63.

Zhou L, Huang Y, Li J, Wang Z. The mTOR pathway is associated with the poor prognosis of human hepatocellular carcinoma. **Med Oncol** 2010; 27:255-61.

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



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 30 de Janeiro 2012.

À
Dra. Silvia Vanessa Lourenço

Ref.: Projeto de Pesquisa n°. 1616/11

"Avaliação da via do c-Kit no adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico das glândulas salivares: Estudo da expressão das proteínas da via, das mutações e da regulação pós-transcricionais do gene Kit".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 24/01/2012, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 29/11/2011, aprovaram a realização do estudo em referência e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do Hospital A. C. Camargo;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,


Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1