



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA MEDICINAL E
MODELAGEM MOLECULAR

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA DE
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO**

Fernanda Jardim da Silva

BELÉM-PA
2019

Fernanda Jardim da Silva

**ESTABELECIMENTO E CARACTERIZAÇÃO CITOGÊNÉTICA DE
LINHAGEM CELULAR DE CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Química Medicinal e Modelagem Molecular da Universidade
Federal do Pará, como requisito para a obtenção do título de
mestre em Química Medicinal e Modelagem Molecular

Orientadora: Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno

BELÉM-PA
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal do Pará Gerada automaticamente pelo módulo Ficat, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

D111e da Silva, Fernanda Jardim

Estabelecimento e caracterização citogenética de linhagem celular de carcinoma adenoide cístico / Fernanda Jardim da Silva. — 2019.65 f. : il. color.

Orientador(a): Prof^a. Dra. Danielle Queiroz Calcagno

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química Medicinal e Modelagem Molecular, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Pará, Belém, 2019.

1. câncer oral, aCGH, linhagem celular. I. Título.

CDD 616.994

Fernanda Jardim da Silva

Estabelecimento e caracterização citogenética de linhagem celular de carcinoma adenoide cístico

Dissertação apresentada ao programa de Pós-graduação
em Química Medicinal e Modelagem Molecular

Aprovado em: ____/____/____

Banca Examinadora

Profa. Dra. Danielle Queiroz Calcagno
Universidade Federal do Pará
Orientadora

Prof. Dra. Karen Renata Herculano Matos Oliveira
Universidade Federal do Pará
Membro

Prof. Dr. Edivaldo Herculano Correa de Oliveira
Instituto Evandro Chagas
Membro

Prof. Dr. João de Jesus Viana Pinheiro
Universidade Federal do Pará
Suplente

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que traçou essa linda trajetória para minha vida, que me deu a honra de ter uma família que me deu forças durante todo esse processo. De maneira especial, quero agradecer minha mãe, por cada madrugada levantada para fazer meu almoço, por cada chamada quando eu passava da hora, pela compreensão nos momentos em que eu precisava me isolar para pensar, para estudar, ou para descansar. Obrigada por cada carinho, cada mínimo esforço, nem que eu viva dez vidas eu vou poder retribuir. Eu não sei se te mereço, e é justamente por isso que agradeço tanto esse amor. Também de maneira especial, gostaria de agradecer a minha orientadora, que me acolheu como uma mãe em seu grupo de pesquisa, que me entendeu quando eu passei pelo momento mais difícil de todo esse processo. Eu não poderia ter professora melhor, mais justa e com maior força de vontade, que além de cumprir seu papel de orientadora, também me estendeu a mão amiga quando eu mais precisei.

Este trabalho só foi possível graças às pessoas que mencionei e, sem dúvida, aos colaboradores deste projeto e meus amigos. Agradeço ao prof. Dr. Edivaldo Herculano pela colaboração, a Elisabete Santos pela paciência e por toda ajuda; e em especial agradeço a Gabriela Alcantara, que mesmo muito distante, se empenhou ao máximo em me ajudar, me aconselhar e colaborou muito para que meu trabalho ficasse da melhor forma possível. Aos meus colegas do NPO, obrigada também pela colaboração de vocês, este trabalho é de todo nosso grupo. A todos vocês, muito importantes na minha vida, eu dedico esta dissertação.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1 - As características marcantes do câncer	9
Figura 2 – Heterogeneidade intratumoral	15
Figura 3: Princípios da tecnologia do aCGH	16
Figura 4 - Análise do perfil genômico	17
Figura 5 - Padrões histológicos do carcinoma adenoide cístico	19
Figura 6 – Análise imuno-histoquímica e citogenética do MYB no CAC	21
Tabela 1 – Principais alterações citogenéticas do CAC	23
Tabela 2 - Clinical trials para o CAC	38
Figura 7 – Linhagem celular estabelecida	38
Figura 8 – Gráfico da curva de crescimento celular	38
Figura 9 – Representação da contribuição de diferentes populações parentais	39
Tabela 3 – Alterações citogenéticas identificadas na linhagem e tecido tumoral	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CAC	Carcinoma adenoide cístico
STR	Short tandem repeat
CNVs	Variações no número de cópias do DNA
CNAs	Alterações no número de cópias
aCGH	Hibridização genômica comparativa em array
CEA	Antígeno carcinoembronário
EMA	Antígeno de membrana epitelial
CK	Citoqueratina
MSA	Actina de músculo liso
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IHC	Imuno-histoquímica
FISH	Hibridização <i>in situ</i> fluorescente
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa em tempo real
FFEP	Amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina
WGS	Sequenciamento completo do genoma
RTKs	Receptores de tirosina cinase
SBF	Soro bovino fetal
NPO	Núcleo de Pesquisas em Oncologia
Pen/estrep	Penicilin/estreptomicina
PBS	Tampão fosfato-salino
DMSO	Dimetilsulfóxido
TDP	Tempo de duplicação celular
gDNA	DNA genômico
dNTPs	Núcleotídeos do DNA
PDGFR β	Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas beta
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
TKis	Inibidores de tirosina kinase
HGF	Fator de crescimento de hepatócitos
GSTs	Genes supressores tumorais

CDKs	kinases dependentes de ciclina
LOH	Perda de heterozigose
PACAP1-R	Receptor do peptídeo ativador da adenil ciclase hipofisária

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Cultura de células	10
2.2 Alterações citogenéticas e câncer.....	12
2.3 Hibridização genômica comparativa em array	15
2.4.1 Aspectos gerais	18
2.4.3 Citogenética do CAC	20
2.4.4 Terapias.....	27
3 OBJETIVOS	30
3.1 Geral	30
3.2 Específicos.....	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 Coleta do tecido	31
4.2 Estabelecimento da cultura primária	31
4.3 Manutenção da cultura primária.....	32
4.4 Curva de crescimento celular.....	32
4.5 Isolamento de DNA	33
4.5.1 Sangue	33
4.5.2 Tecido e Linhagem	33
4.6 Análise de ancestralidade	34
4.7 Hibridização Genômica Comparativa em Array (aCGH)	35
4.7.1 Digestão do DNA genômico.....	35
4.7.2 Marcação dos gDNA	35
4.7.3 Purificação do gDNA.....	35
4.7.4 Preparação pré-hibridização.....	36
4.7.5 Hibridização	36
4.7.6 Lavagem do <i>micorarrays</i>	36
4.7.7 Escaneamento e extração dos dados.....	37
5 RESULTADOS	37
5.1 Cinética de crescimento celular	37
5.2 Morfologia tecidual	39
5.3 Ancestralidade	39

5.4 Análise de alterações cromossômicas por aCGH	39
6 DISCUSSÃO	40
7 CONCLUSÃO	50

RESUMO

O Carcinoma adenoide cístico (CAC) é uma neoplasia rara que acomete principalmente regiões de cabeça e pescoço, especialmente glândulas salivares. O crescimento é considerado lento, mas com grande capacidade de invasão perineural, recorrência pós-cirúrgica local e metástases. As características moleculares do CAC são pouco conhecidas e a raridade do tumor dificulta a obtenção de modelos *in vitro* e *in vivo* para que auxilie na investigação da patogênese e tratamentos mais eficientes e precisos. No presente estudo, buscou-se estabelecer e caracterizar uma linhagem de CAC para a avaliação de moléculas anticâncer. Para isso, foram obtidas amostras teciduais de CAC do subtipo histológico tubular advinda do trígono retromolar e uma amostra de sangue de uma paciente do sexo feminino de 59 anos de idade. A caracterização citogenética molecular foi realizada por Hibridização Genômica Comparativa em array (aCGH) no tecido tumoral e na linhagem celular. Além disso, foi realizada a genotipagem da paciente. A cultura de células estabelecida a partir do tecido tumoral coletado apresentou rápido crescimento de colônias tumorais a partir da passagem 18, estabilizando-se na passagem 30. A genotipagem no sangue revelou uma contribuição ancestral de 19% ameríndios, 31,5% de europeus e 49,5% de negros. Na análise citogenética foram observados ganhos em loci que abrigam importantes genes, como *EGFR* (7p22.1-p11.2), *BRAF* (7q32.3-q34), *HER2* (17q12-q21.2) e *SMARCA1* (xq25-q27.1). Ainda na linhagem, foram observadas perda (6q23.3-q25.1, locus do gene *PLAGL1*) e deleção (9p21.3-p21.1, locus do gene *CDKN2A/B*); No tecido, foram observados apenas ganhos (9q34.3, locus do gene *NOTCH1* e 5q32, locus do gene *PDGFRβ*). A perda em 19p13.3-p12, locus do gene *CDKN2D*, destaca-se como evento em comum nas duas amostras. Estes achados corroboram outros estudos da literatura e faz da linhagem estabelecida um bom modelo *in vitro* que pode auxiliar na investigação da patogênese do CAC e na pesquisa básica para novas modalidades terapêuticas.

Palavras-chave: aCGH; câncer oral; linhagem celular, modelo *in vitro*.

ABSTRACT

Adenoid cystic carcinoma (ACC) is a rare neoplasm that mainly affects the head and neck regions, especially salivary glands. Growth is slow, but with but with a propensity to perineural invasion, local postoperative recurrence and metastasis. The most used treatment for this type of tumor is surgery followed by postoperative radiotherapy. The molecular characteristics of ACC are unclear, and unfortunately, the rarity of this type tumor limits to obtain *in vitro* and *in vivo* models that contribute in the investigation of pathogenesis and more efficient treatments. In the present study, a cell line was established and characterized for the evaluation of anticancer molecules. For this, it was obtained tissue samples of ACC of the tubular histological subtype from the retromolar trigone and a blood sample from a 59-year-old female patient. Array Comparative Genomic Hybridization (aCGH) performed molecular cytogenetic characterization in tumor tissue and cell line, while blood was genotyped for ancestry. Cell culture established from the collected tumor tissue showed rapid growth of tumor colonies from passage 18, stabilizing at passage 30. Blood genotyping revealed an ancestral contribution of 19% Amerindians, 31.5% Europeans and 49.5% of blacks. In cytogenetic analysis, gains were observed in loci harboring important genes such as *EGFR* (7p22.1-p11.2), *BRAF* (7q32.3-q34), *HER2* (17q12-q21.2) and *SMARCA1* (xq25-q27.1). Also in the lineage, loss (6q23.3-q25.1, *PLAGL1* gene locus) and deletion (9p21.3-p21.1, *CDKN2A/B* gene locus) were observed; In tissue, only gains were observed (9q34.3, *NOTCH1* locus and 5q32, *PDGFR β* locus). The loss in 19p13.3-p12, locus of the *CDKN2D* gene, stands out as a common event in both samples. These findings corroborate other studies in the literature and make the established lineage a good *in vitro* model that can assist in the investigation of the pathogenesis of CAC and the basic research for new therapeutic modalities.

Keywords: aCGH; oral cancer; cell line, *in vitro* model.

1 INTRODUÇÃO

Câncer é um conjunto de mais de 100 doenças que têm em comum o crescimento desordenado de células que podem invadir tecidos e órgãos. Os diversos tipos tumorais compartilham algumas características semelhantes, incluindo sinalização proliferativa, evasão aos genes supressores do crescimento e ao sistema imune, imortalidade replicativa, inflamação, ativação da invasão e metástase, indução da angiogênese, mutações e instabilidade genômica, resistência a morte celular e desregulação do metabolismo energético (Figura 1) (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

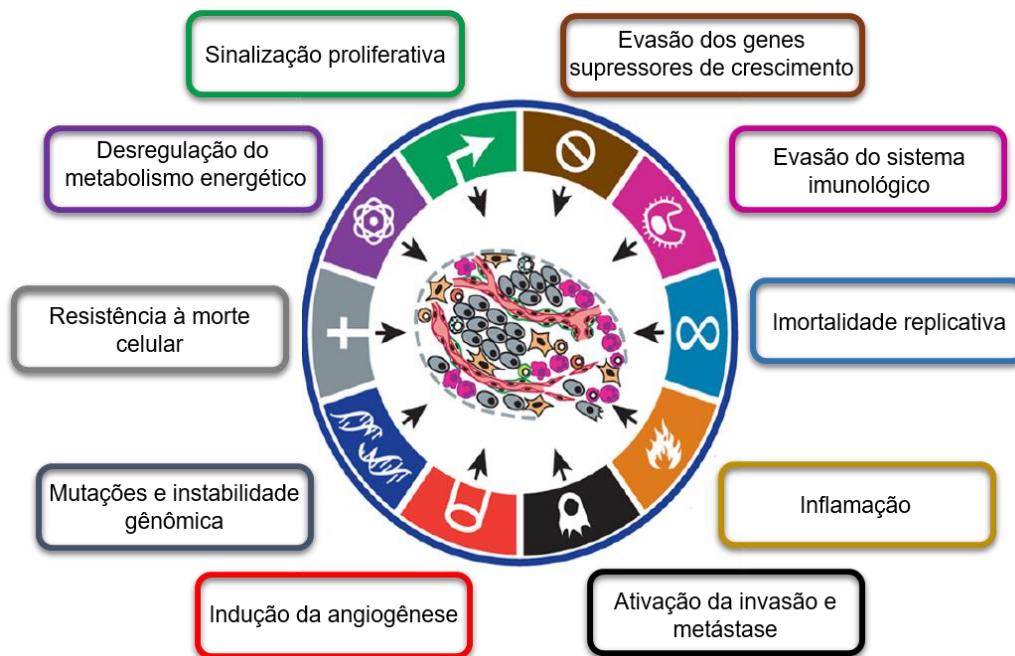


Figura 1: As características marcantes do câncer. Fonte: Adaptado de Hanahan e Weinberg, 2011.

A aquisição destas características pelas células tumorais ocorre em um processo de múltiplas etapas, no qual diversas alterações genéticas e epigenéticas estão associadas às mudanças no fenótipo celular. Estas alterações podem ser consequência de exposição a agentes carcinógenos, erros aleatórios na replicação do DNA, ou mesmo frutos da hereditariedade (FEITELSON et al., 2015; TOMASETTI et al., 2017). Dentre estas características, a instabilidade genômica destaca-se por possuir um papel fundamental na evolução do tumor (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Particularmente, o carcinoma adenoide cístico (CAC) é um tumor que acomete principalmente regiões de cabeça e pescoço e, apesar de raro, é agressivo com padrão de crescimento infiltrativo progressivo, com alta propensão à invasão perineural, recidiva local e metástase à distância, incluindo pulmão, ossos e fígado (DILON et al., 2015).

Estudos anteriores demonstraram um grande número de alterações citogenéticas em CAC (CHAE et al., 2015). Na era da medicina personalizada, identificar estas alterações pode auxiliar na tomada de decisão terapêutica, pois estas podem ser úteis no manejo clínico em pacientes com CAC. No entanto, a pesquisa básica é dificultada devido à raridade do tumor e a escassez de modelos de estudo *in vitro* e *in vivo* para o CAC (PHUCHARION et al., 2009, CHAE et al., 2015, WYSOCKI et al., 2016).

Apesar das investigações sobre modalidades terapêuticas emergentes, a cirurgia é considerada a principal estratégia de tratamento do CAC. Além disso, estudos relatam que a radioterapia pós-operatória melhora o controle local da doença em pacientes com este tipo tumoral, mas não se observa impacto na sobrevida desses pacientes. Além disso, o resultado do tratamento não é tão satisfatório para pacientes com doença metastática, e sua sobrevida é de aproximadamente 7% em cinco anos após a detecção de metástase (MENDENHALL et al., 2004, CHEN et al., 2006, SHEN et al., 2012, BAHL et al., 2018).

Diante deste contexto, vislumbra-se que o estabelecimento de uma linhagem advinda do tumor primário, assim como a caracterização de ganhos e perdas recorrentes, auxiliará na pesquisa básica que visa o desenvolvimento de terapias alvo-específicas para pacientes com CAC.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Cultura de células

A técnica de cultura de células foi desenvolvida com base na desagregação de fragmentos de tecidos a partir dos quais as células crescem em um meio de cultura e condições de ambiente controladas. Primeiramente, esta técnica foi utilizada em 1907 por Ross Granviele Harrison, que buscava

esclarecimento sobre o desenvolvimento do tecido nervoso. Em 1912, Alexis Carrel estabeleceu um modelo de linhagens celulares cardíacas e buscou melhorar as condições de cultivo celular. Somente em 1951, Geroge Gey estabeleceu uma linhagem celular humana, advinda de um adenocarcinoma cervical (HeLa) (PERES e CURI, 2005; MIRABELLI et al., 2019).

Atualmente, a técnica de cultivo celular se expande para além da compreensão destes processos e é utilizada para testes com drogas, vacinas, terapia celular, pesquisa com células tronco e diversas áreas da medicina. A ampla aplicabilidade do cultivo celular deve-se principalmente ao aperfeiçoamento da técnica nos anos 50, com o desenvolvimento de meios livres de soro, introdução de antibióticos e de tripsina (FRESHNEY, 2015).

Apesar de muito utilizada, a cultura de células é considerada uma técnica complexa devido às variantes. Ainda que o controle do ambiente seja extremamente rigoroso, há o risco de contaminação, instabilidade genotípica e fenotípica. Além disso, não há a interação com o microambiente ao qual a célula é exposta *in vivo*, entre outros fatores limitantes. Entretanto, o controle do ambiente físico-químico (pH, temperatura, O₂, CO₂) é uma vantagem se executado com exatidão, além de o tempo e a economia serem otimizados em relação ao uso de modelos *in vivo*. A crescente utilização do cultivo celular também permitiu uma redução no uso indiscriminado de animais em experimentos (FRESHNEY, 2015).

A superação de alguns obstáculos é fundamental para o sucesso na manutenção de uma cultura de células e estabelecer uma nova linhagem é considerado ainda mais trabalhoso. Uma cultura primária é aquela na qual as células são derivadas de um fragmento tecidual. Algumas diretrizes são recomendadas para o estabelecimento de uma cultura primária, dentre as quais pode-se destacar a autenticação da linhagem e do tecido de origem por *Short tandem repeat* (STR) ou genotipagem através cariótipo, mapeamento da variação do número de cópias do DNA (CNV) ou sequenciamento; avaliação histopatológica, informações clínicas e avaliação de Comitê de Ética em Pesquisa (GERAGHTY et al., 2014).

As linhagens primárias são consideradas difíceis de estabelecer e com um tempo curto de vida útil. Por outro lado, são consideradas bons modelos porque conservam algumas características genéticas e morfológicas do tecido, sendo muito útil para descrever o comportamento de tumores. Particularmente, o estabelecimento da linhagem primária HeLa é considerado um marco histórico, pois este modelo experimental possibilitou muitas descobertas acerca do desenvolvimento do câncer (MASTERS, 2000; KAPAŁCZYŃSKA et al., 2018).

Nas últimas décadas, a crescente utilização das tecnologias de “omics” possibilitou a criação de bancos de dados de linhagens de células caracterizadas. Com este advento, foi demonstrado que muitas linhagens cancerígenas compartilham um padrão semelhante de mutações, ganhos e perdas cromossômicas, padrões de metilação e outras alterações com os tecidos de origem. Desta forma, apesar da complexidade, a cultura de células é um bom modelo de estudo para ensaios pré-clínicos (MIRABELLI et al., 2019).

2.2 Alterações citogenéticas e câncer

O câncer compõe um grupo de doenças heterogêneas que compartilham algumas características em comum. Essas doenças resultam da proliferação desordenada de células, as quais possuem a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos. A desregulação do ciclo celular ocorre devido ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas. Normalmente, as variações genéticas são mecanismos importantes na evolução das espécies e cada grupo populacional possui características genéticas específicas. No entanto, determinadas características genéticas estão associadas à susceptibilidade ao câncer. Por exemplo, o risco para o câncer de próstata está associado a variações na região cromossômica 8q24 em homens afro-americanos, assim como na região 17q21 em homens africanos. Assim, a ancestralidade de um indivíduo pode estar relacionada ao risco de desenvolver câncer (FREEDMAN et al., 2006; HANAHAN e WEINBERG, 2011; HAIMAN et al., 2011).

Por sua vez, as alterações no número e na estrutura dos cromossomos podem levar à instabilidade cromossômica. Este fenômeno pode ser definido como a taxa de cariótipos alterados de uma dada população celular, podendo ser desencadeado através de diversos mecanismos, como falha na segregação

das cromátides-irmãs, falhas no ponto de verificação dos fusos mitóticos, amplificação do centrossomo entre outras anormalidades (FUKASAWA, 2005)

Entre as alterações importantes para a tumorigênese, destacam-se as deleções, as quais resultam em perda de um segmento cromossômico. Em câncer, as deleções podem ativar oncogenes através da remoção de elementos reguladores negativos ou eliminação de domínios de proteínas reguladoras. No entanto, é mais provável que uma deleção resulte em perda de um supressor de tumor. São exemplos as deleções dos genes *IKZF1* em leucemia linfoblástica aguda, *PTEN* em Linfoma de células B e *TP53* em diversos tipos de câncer (BOER et al., 2016; LIU et al., 2016; WANG et al., 2018).

Por sua vez, as CNVs são definidas como regiões estruturalmente variantes submicroscópicas nas quais diferenças de número de cópias foram observadas entre dois ou mais genomas. As CNVs são frequentemente encontradas em regiões pericentroméricas e subteloméricas, ocupando aproximadamente 12% do genoma inteiro. De modo geral, as CNVs são estáveis e podem ser herdadas ou surgirem espontaneamente durante a meiose ou em um estágio inicial do desenvolvimento embrionário, sendo denominadas CNVs de novo (SHLIEN e MALKIN, 2009; MALHOTRA e SEBAT, 2012; FURUYA et al., 2015).

Ao contrário das CNVs, as CNAs estão geralmente associadas a patologias. Em uma análise de diversos tipos de câncer, foram descritos 75.700 ganhos e 55.101 perdas. Em tumores de próstata, foi relatada a perda de 8p23.2 associada ao estágio avançado da doença, e ganho em 11q13.1 associado a maior probabilidade de recorrência pós-cirúrgica. Em uma análise independente em 11 tipos de câncer, foram identificadas padrões comuns de CNAs, incluindo uma frequência maior de alterações em regiões teloméricas em relação a outras regiões cromossômicas, e CNAs encontradas nas mesmas regiões do genoma dos tumores analisados (FANCIULLI et al., 2010; BEROUKHIM et al., 2010; ZACK et al., 2013).

Além disso, o ganho no número de cópias do DNA em uma determinada região de um braço cromossômico, que são definidos como amplificações, estão

associados a superexpressão de oncogenes em câncer. Podem-se destacar como exemplos os genes *MYC* em câncer gástrico, o *EGFR* em gliomas e *HER2* em câncer de mama. O DNA amplificado pode ser útil como marcador de diagnóstico e como indicador de que a região amplificada do genoma abriga oncogenes candidatos que provavelmente possuem uma função na carcinogênese (ALBERTSON, 2006; CALCAGNO et al., 2013; MAGADUM et al., 2013; KRISHNAMURTI e SILVERMAN, 2014; THAKKAR et al, 2014).

O impacto destas alterações cromossômicas na expressão gênica é importante no contexto da carcinogênese, principalmente devido sua influencia direta na heterogeneidade intratumoral. Este fenômeno presume que a massa tumoral é composta de diferentes subpopulações celulares. Estas subpopulações distintas podem ser consequência da aquisição de mutações em genes drivers, da capacidade de diferenciação de células tronco tumorais (CSC) e/ou da variabilidade genotípica proporcionada pela instabilidade cromossômica. A ocorrência destes eventos nas diferentes células que compõem o tumor origina variantes celulares, as quais são expostas a constantes pressões seletivas no microrambiente tumoral. Assim, ao longo da evolução do câncer, as células com maior capacidade de proliferação e sobrevivência são selecionadas e dão origem a um tumor agressivo, resultando no desenvolvimento de metástases, recidivas locais e resistência terapêutica (GREAVES e MALEY, 2012).

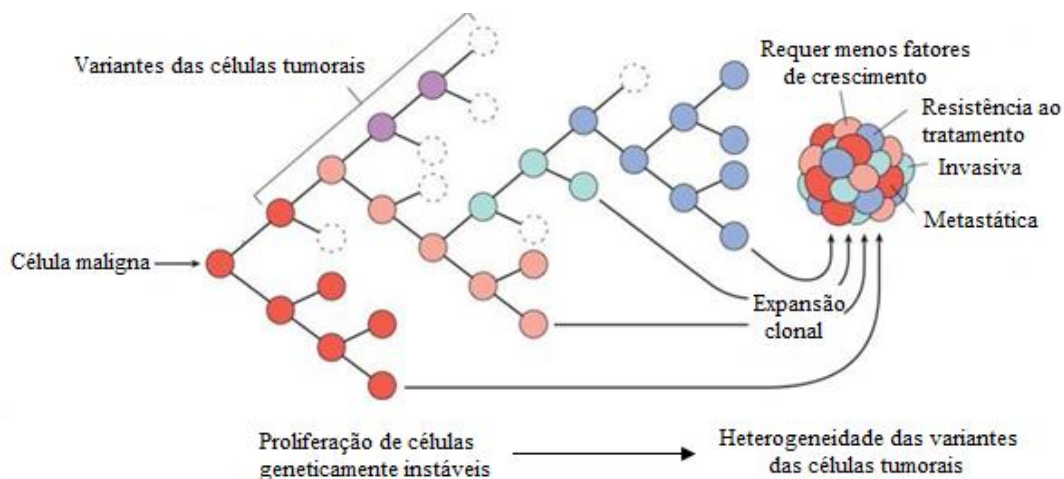


Figura 2: Heterogeneidade intratumoral. Células tumorais podem gerar variantes com características que dão vantagem a célula maligna, resultando em metástases, recidivas locais e resistência. Fonte: adaptado de repositório Universidade Federal do Ceará.

Devido ao papel na carcinogênese, diversos estudos têm sido direcionados à investigação do impacto das alterações cromossômicas no câncer, principalmente em relação ao prognóstico e resposta a terapias. Neste sentido, o desenvolvimento e a aplicação de tecnologias de microarrays têm auxiliado no mapeamento de CNAs que não eram possíveis de detectar através dos métodos de citogenética convencionais. Portanto, a resolução aprimorada é fundamental para estudos desta natureza (SAVAS e LIU, 2009; HILLMAN et al., 2011).

2.3 Hibridização genômica comparativa em array

A hibridização genômica comparativa em array (aCGH) é uma técnica de citogenética molecular bastante útil na detecção e mapeamento de CNAs. A alta resolução da técnica permite a identificação de CNAs e alterações cromossômicas em vários tipos de tumores e fornece novas informações sobre os padrões de alterações que estão envolvidos no desenvolvimento do câncer, assim, o aCGH tem se mostrado útil na detecção de genes associados à iniciação e progressão da doença (CHO et al., 2006; KALLIONIEMI, 2008; EDELMANN e HIRSCHHORN, 2009).

A metodologia é baseada na hibridização entre o DNA teste e o DNA de referência (marcado com diferentes corantes fluorescentes) em uma superfície de microarray contendo fragmentos de DNA únicos (sondas). Os sinais de intensidade fluorescente para o teste e os DNAs de referência que hibridizam com o array são registrados separadamente para cada sonda, como demonstra a figura 3 (STAAF e BORG, 2010).

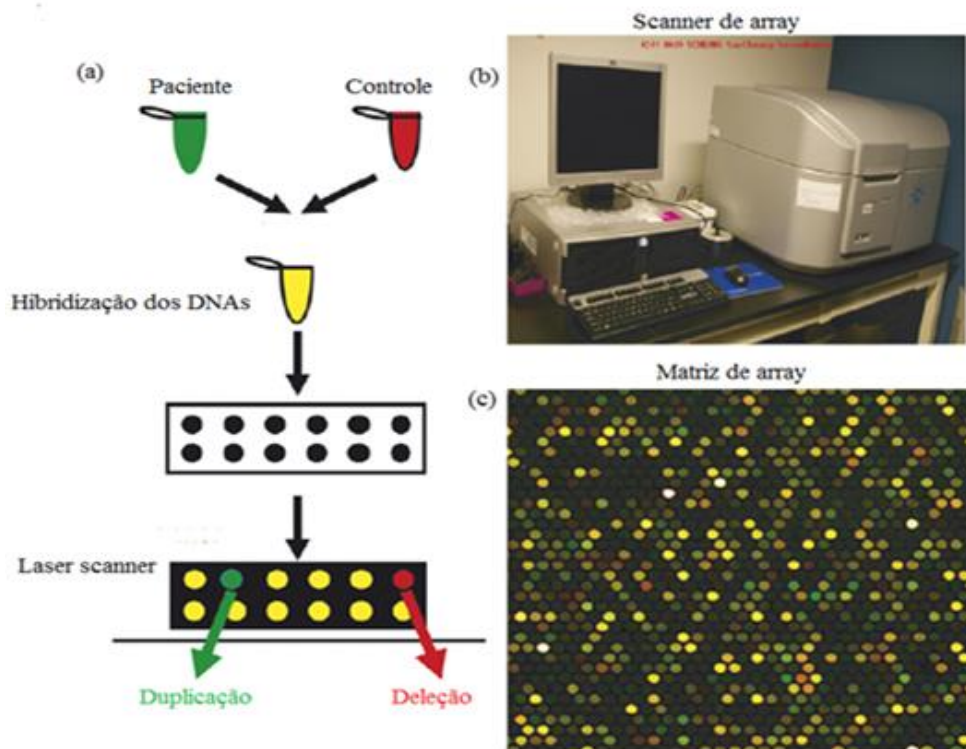


Figura 3: (a) O DNA da amostra a ser testada é marcado com um corante de fluorescência verde (Cy3) e um DNA de referência é marcado com vermelho (Cy5). As duas amostras são misturadas e competitivamente co-hibridizadas em uma matriz contendo alvos de DNA genômico que foram localizados em uma lâmina de vidro. A proporção resultante das intensidades de fluorescência é proporcional à proporção dos números de cópias das sequências de DNA nos genomas de teste e de referência. As áreas na lâmina que aparecem em verde indicam material cromossômico extra (duplicação) na amostra de teste naquela região em particular. Áreas na lâmina que aparecem em vermelho indicam relativamente menos DNA de teste (deleção) na amostra naquele ponto específico. (b) A digitalização ocorre em arquivos de imagem usando um scanner de microarray específico. Aqui é mostrado o scanner de microarray Agilent G2565BA em (c).
 Fonte: adaptado de Shinawi e Cheung, 2008.

Para cada sonda presente no microarray, a razão de fluorescência representa o número de cópias relativas desse locus no tumor em comparação com a amostra normal. Razões de fluorescência do tumor/log normal são primeiro normalizadas para cada matriz, de modo que a razão média do log é definida como zero. Razões normalizadas de tumor/normal são então mapeadas em uma representação ordenada da sequência normal do genoma, onde ganhos e perdas de DNA são identificados como picos e vales de razão, assim, a análise de dados aCGH enfatiza a informação da posição do genoma (Fig. 4) (POLLACK, 2017).

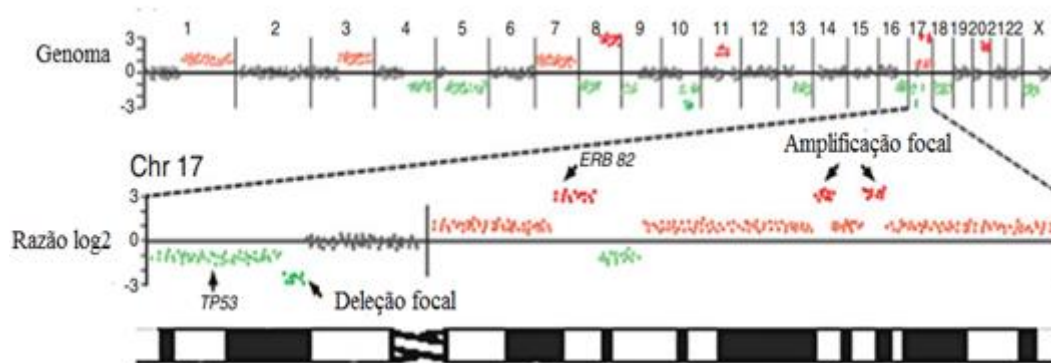


Figura 4: As razões tumor /normal log 2 (aqui, para uma amostra hipotética de câncer de mama) são plotadas de acordo com a posição do genoma de referência, mostrada para todo o genoma e para uma visão ampliada do cromossomo 17. As proporções vermelha e verde indicam ganho e perda de DNA respectivamente, alguns correspondendo a genes de câncer conhecidos (por exemplo, *ERBB2*, *TP53*), enquanto outros amplicons focais e deleções apontam novos genes de câncer. Fonte: adaptado de Pollack, 2017.

As vantagens mais significativas do aCGH são a alta resolução, rendimento e precisão no mapeamento das alterações cromossômicas, além de não haver necessidade da obtenção de metáfases. Nos últimos anos, a resolução da sonda aumentou cerca de mil vezes, entre as primeiras matrizes de BAC (2000-3000 sondas) e as mais recentes matrizes de oligonucleotídeos (1-2 milhões de sondas), permitindo, desta forma uma resolução capaz de identificar micro-alterações (PARK, 2008; SHINAWI e CHEUNG, 2008).

Apesar de suas vantagens, assim como toda técnica, o aCGH possui certas limitações. O método não é capaz de detectar translocações recíprocas ou inversões, uma vez que tais anormalidades não resultam em alterações no conteúdo cromossômico (BAKKER et al., 2015).

Independentemente de suas limitações, o aCGH tem demonstrado ser uma técnica bastante eficiente para auxiliar na detecção de alterações cromossômicas importantes para a carcinogênese. Além disso, a técnica também auxilia no mapeamento de regiões que contenham genes de valor prognóstico e que podem ser úteis na predição de resposta ao tratamento e no desenvolvimento de estratégias terapêuticas (VAN BEERS e NEDERLOF, 2006; DE PAZ et al., 2015).

2.4 Carcinoma adenoide cístico

2.4.1 Aspectos gerais

O CAC é um tumor raro e agressivo que acomete vários sítios anatômicos, principalmente regiões de cabeça e pescoço, sendo sua localização mais frequente as glândulas salivares. O crescimento do tumor é considerado inicialmente lento e indolente. Os sintomas geralmente só ocorrem após a invasão de nervos e estruturas locais. Assim, a maioria dos pacientes apresenta doença localmente invasiva. Infelizmente, o crescimento lento do tumor pode atrasar o diagnóstico por vários anos, possibilitando a invasão perineural (GONDIVKAR et al., 2011; JASO e MALHOTRA, 2011, COCA-PELAZ et al., 2015).

Esta tendência de infiltrar-se dentro e ao redor dos nervos, além dos ossos, dificulta a excisão completa do tumor, o que torna o CAC propenso à recorrência local. Além da invasão perineural, a metástase à distância também é comum, principalmente em pulmão, ossos, fígado e cérebro (RAPIDIS et al., 2005, DILLON et al., 2015).

Vários fatores influenciam no prognóstico da doença. Entre os fatores clínicos negativos, os mais bem descritos são o padrão infiltrativo de glândulas locais, tamanho e estágio do tumor, características histológicas predominantemente sólidas, presença de metástases, margens positivas no momento da cirurgia e invasão perineural. Além disso, alguns estudos têm descrito o potencial valor prognóstico da expressão de Ki-67 (GOMEZ et al., 2007, LARSEN et al., 2012, CORDESMEYER et al., 2017).

Por conta destas características, o CAC de cabeça e pescoço possui um prognóstico pobre. As taxas de sobrevida após o diagnóstico de metástase variam, mas a maioria dos pacientes morrem em aproximadamente três anos. Esta taxa está relacionada ao fracasso em controlar metástases à distância. Além disso, à longo prazo, o CAC tem um comportamento agressivo, com um padrão de crescimento persistente que, aliado a estas metástases, resulta frequentemente em óbito (COCA-PELAZ et al., 2015; VAN WEERT et al., 2017).

2.4.2 Histopatologia

A aparência microscópica do tumor é heterogênea, no entanto, a citologia das células tumorais em si é relativamente uniforme. As células do tumor exibem uma aparência basaloide com núcleos angulados, hipercromáticos e citoplasma escasso, claro e eosinofílico. Algumas populações de células tumorais apresentam diferenciação de células ductais, mioepiteliais ou intercaladas (MATSUBA et al., 1986; JASO e MALHOTRA, 2011).

O CAC é descrito em três padrões histológicos distintos (Fig. 5): tubular, sólido e cribriforme. O padrão cribriforme apresenta ninhos de células tumorais que têm uma configuração de peneira ou "queijo suíço". Alguns espaços contêm secreções mucinosas, no entanto, esses espaços podem ser substituídos por tecido fibroso hialinizado, produzindo um padrão distinto. Tanto a área mucinosa quanto a hialinizada podem ser vistas na mesma unidade (PERZIN et al., 1978).

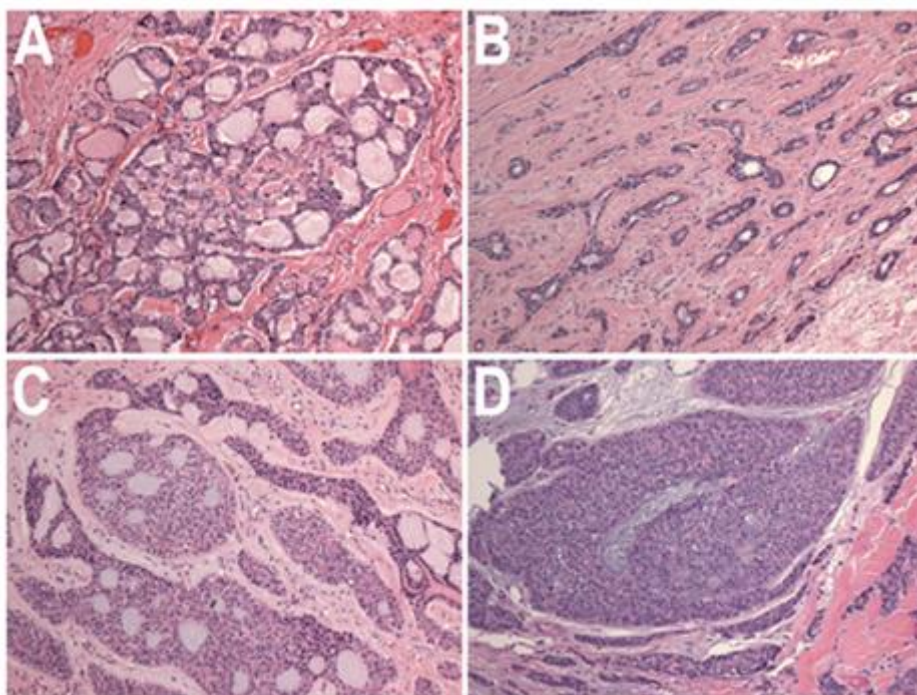


Figura 5: Tipos histológicos e graus de CAC. (a) padrão cribriforme, sem componente de crescimento sólido (Grau 1). (b) Padrão tubular, sem componente sólido (Grau 1). (C) Padrão de crescimento cribriforme, com áreas de crescimento sólido compreendendo menos de 30% de tumor (Grau 2). (d) Padrão de crescimento predominantemente sólido (Grau 3). Todas as figuras coradas com eosina e hematoxilina, com ampliação de 40x. Adaptado de Moskaluk, 2013.

O padrão tubular possui as células tumorais dispostas em ninhos, circundados por quantidades variáveis de estroma eosinofílico, muitas vezes hialinizado. O subtipo histológico sólido apresenta agregados de células basaloides sem túbulos nem formações pseudocísticas (DILLON et al., 2015)

Baseada nos padrões histológicos, o CAC é classificado em três graus: grau I-III (Fig. 5). Os tumores de grau I possuem um padrão predominantemente tubular, enquanto os tumores de grau II possuem um arranjo predominantemente cribriforme com menos de 30% do tumor composto de áreas sólidas. Por fim, o grau III agrupa os tumores com mais de 30% de crescimento sólido (PERZIN et al., 1978).

O polimorfismo dos padrões histológicos não é incomum, e todos os três padrões de CAC podem ser vistos juntos no mesmo tumor. O subtipo cribriforme possui um melhor prognóstico em relação ao sólido, o qual está associado ao estágio avançado e desenvolvimento de metástases (MATSUBA et al., 1985; KOKEMUELLER et al., 2004; COCA-PELAZ et al., 2015).

A imuno-histoquímica também pode ser empregada para dividir o CAC em dois grupos: um composto por células neoplásicas com prevalência de formação ductal positiva ao antígeno carcinoembrionário (CEA), antígeno de membrana epitelial (EMA), citoqueratina (CK) de baixo e alto peso molecular e S-100; e outro grupo de células neoplásicas que expressa positivamente a actina de músculo liso (MSA), CK de baixo peso molecular, vimentina, p63 e S100. Portanto, o CAC possui uma população de células que forma estruturas ductais (expressam CEA e EMA) e outra que compartilha características de células mioepiteliais (expressam MSA, p63 e vimentina). No caso de CAC de glândulas salivares, há a expressão de S100 e proteína ácida fibrilar glial (GFAP), indicando que a diferenciação de células de Schwann em células mioepiteliais modificadas se correlaciona com invasão perineural do tumor (CHEN et al., 1988; CARLOS-BREGNI et al., 2009; GONDIVKAR et al., 2011).

2.4.3 Citogenética do CAC

Diversas alterações citogenéticas foram descritas no CAC, entre as principais está a translocação t (6; 9) recíproca ocorrendo em alguns tumores. Esta translocação une os fatores de transcrição MYB (6q22-q23) e NFIB (9p24.1), que resulta na superexpressão dos alvos MYB. Estes alvos incluem genes importantes no processo de tumorigênese, como *COX-2*, *c-KIT*, *Bcl-2* e

BclX (BRILL II et al., 2011; LI et al., 2014; COCA-PELAZ et al., 2015; LIU et al., 2018).

A superexpressão desses genes pode ocorrer por meio da deleção de sítios de ligação de miRNA na região 3' UTR de MYB após fusão gênica com NFIB. Isso leva à interrupção da repressão de MYB pelos miRNAs miR-15a/16 e miR-150, que regulam negativamente a expressão desse fator de transcrição. Outro mecanismo proposto para a superexpressão do MYB é o truncamento da ligação do DNA N-terminal e C-terminal deste fator de transcrição após a fusão com NFIB. (PERSSON et al., 2009; MITANI et al., 2012; STENMAN et al., 2010; PADMAVATHI et al., 2017). A Figura 6 ilustra algumas alterações do MYB no CAC analisadas por imuno-histoquímica (IHC) e Hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

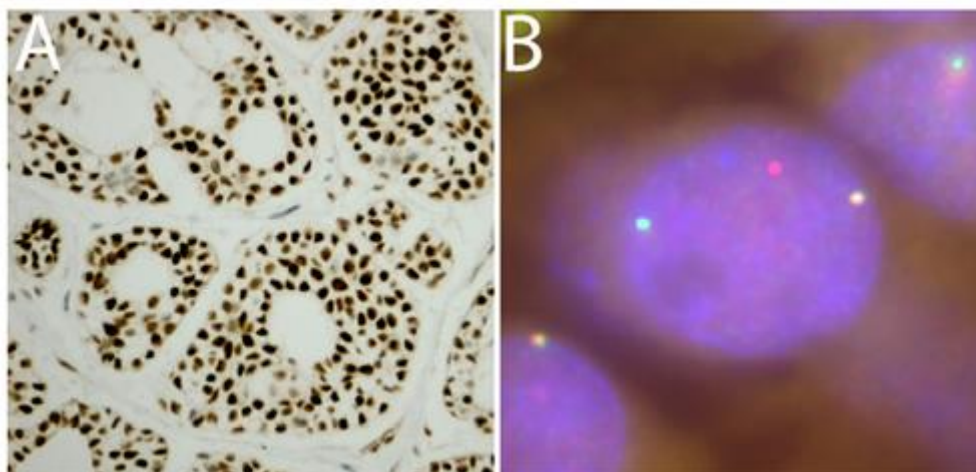


Figura 6: Análise de alterações do gene *MYB* e de sua expressão proteica no CAC **(A)** Coloração IHC para *MYB* mostrando forte coloração nuclear difusa. Ampliação original x100. **(B)** Análise FISH de separação para *MYB* com sonda verde 5' e sonda vermelha 3'. A célula tumoral de CAC revela um locus do gene *MYB* do tipo selvagem (sinal amarelo) e evidência de quebra do segundo locus do gene *MYB*, com sinais vermelhos e verdes separados. Fonte: Adaptado de Moskaluk, 2013.

Além da translocação *MYB-NFIB*, outras alterações recorrentes descritas no CAC são os rearranjos entre *MYBL1-NFIB* e *MYBL1-RAD51B*, além de rearranjos intra-cromossômicos que resultam na fusão *MYBL1-YTHDF3* e truncamentos em *MYBL1*. Essas fusões e truncamentos de *MYBL1*, que é da mesma família de fatores de transcrição do *MYB*, são caracterizados pela retenção dos domínios de ligação e transativação do DNA, conseqüentemente a proteína *MYBL1* perde sua especificidade e se torna oncogênica. Um dos alvos

superexpressos através da desregulação de MYBL1 é o *MYC*, cuja superexpressão foi demonstrada em pacientes com a expressão de MYB ou MYBL1 e foi associada a uma menor sobrevida livre de doença (FUJII et al., 2016; BRAYER et al., 2016 e MITANI et al., 2016). Além destas importantes translocações, ganhos, perdas e ampliações cromossômicas são frequentemente relatados em CAC. A maioria destas alterações engloba genes que demonstram ser importantes para a carcinogênese do CAC, como *KIT*, *MDM2* e *NFIB* (BERNHEIM et al., 2008; COSTA et al., 2014). Demais alterações estão resumidas na tabela 1.

Devido ser um tumor raro, o CAC carece de modelos de estudos *in vitro* e *in vivo* e a maioria destas alterações são observadas em amostras tumorais congeladas ou em amostras fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFEP). Além disso, algumas linhagens estabelecidas têm sua autenticidade questionada. Em um único estudo com linhagem autenticada e que teve ganhos e perdas analisados por aCGH, não foram observados genes de interesse para a tumorigênese do CAC (PHUCHAERON et al., 2009; LI et al., 2014)

Tabela 1: Alterações citogenéticas do CAC

Alteração	Genes envolvidos	Região	Metodologia	Material	Referência
Ganho	<i>HOXA, MDM2, KIT</i>	7p15.2, 12q15, 4q12	aCGH, FISH	Amostras congeladas	Bernheim et al. 2008*
Perda	<i>CDKN2A/CDKN2B, TP53</i> e <i>LIMA1</i>	1p35, 6q22–25, 8q12–13, 9p21, 12q12–13 e 17p11–13			
Perda	<i>P73, CDH5</i>	1p32-p36	aCGH, FISH	Amostras congeladas	Rao et al. 2008
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t (6;9)	RT-PCR, FISH	Amostras congeladas, Cultura primária	Persson et al., 2009
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t (6;9)	RT-PCR, FISH	Amostras congeladas	Mitani et al., 2010
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t (6;9)	RT-PCR, FISH	Amostras congeladas	Mitani et al. 2011

Transcritos de fusão	<i>MYB-NFIB</i>	Éxons 5, 6 e 12 (<i>MYB</i>) e éxon 9 (<i>NFIB</i>)	RT-PCR	Amostras congeladas; FFEP	Brill et al. 2011
Amplificação	<i>MDM2, CPM, SLC35E3, RAP1B, NUP107</i>	12q15	aCGH	Amostras congeladas	Oga et al. 2011
Ganho	<i>SYN3, TIMP3</i>	22q12-13			
Perda	<i>ESR1, MAS1, RPS6KA2, MLLT4, THBS2</i>	6q25.1, 6q25.3, 6q27			
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t (6;9)	FISH	Amostras congeladas	West et al. 2012
Perda	<i>PARK2, LATS, CASP9, CTNNBIP1, UBE4B, RUNX3, SFN, NBL1, PRDM2</i>	1p36.33-p35.3, 6q24.1-q27, 6q24.1-q25.2, 6q26 e 6q27	aCGH	Amostras congeladas	Persson et al. 2012
Perda	<i>NR4A1, LIMA1</i>	12q13.11-q13.2, 12q13.3 e 12q13.3-q14.1			

Ganho	<i>NFIB</i>	9pter-p22 / p23	aCGH, FISH	FFEP	Costa et al. 2014
Perda	<i>ALDH8A1, HBS1L</i>	6q23.3			
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)			
Translocação	**	t (6; 14) (q25; q13)	Análise de banda G, aCGH	Amostras congeladas, cultura primária	Li et al. 2014
Ganho	**	Chr8			
Perda	**	14q			
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)	FISH	Amostras congeladas	Ho et al. 2013
Rearranjo	<i>MYB</i>	6q23.3	FISH	FFEP	Argyris et al. 2015
Translocação	<i>MYB, MYBL1, NFIB, RAD51B,</i>	t(6;9), t (8; 9), t (8; 14)	RNA-seq, RT-PCR	FFEP	Brayer et al. 2016
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)	WGS, RT-PCR e FISH	Amostras congeladas	Mitani et al. 2016
Rearranjo	<i>MYBL1-NFIB, MYBL1-YTHDF3</i>	(6;9)			
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)			Drier et al. 2016

Rearranjo	<i>MYB-TGFBR3, MYB-RAD51B</i>	(6;1)(6;14)	WGS, RT-PCR e FISH	Amostras primárias, primagrafts	
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)	FISH	FFEP	Rettig et al. 2015
Quebra	<i>MYB</i>	6q21–24	FISH	FFEP	Tian et al. 2016
Perda	<i>DUX4, DUX4L</i>	10q26.3	WGS, RNA-seq	Amostras congeladas	Rettig et al. 2017
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)			
Fusão	<i>MAP3K5-NFIB, MYBL1-NFIB, NFIB-RPS6KA2, NFIB-MYO6, NFIB-RIMS1</i>	t (6; 9) (q23.3; p22.3), t (8; 9) (q13.1; p22.3), 6q			
Translocação	<i>MYB-NFIB</i>	t(6;9)	WGS, RT-PCR	Cultura primária	Warner et al. 2018

*RT-PCR: reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa; WGS: sequenciamento completo do genoma; Primagrafts: xenoenxertos derivados do paciente.

2.4.4 Terapias

Atualmente, a maioria dos estudos ainda se encontra em Fase 2 de pesquisa clínica e as modalidades terapêuticas mais utilizadas para o tratamento de CAC são a cirurgia e a radioterapia. Há investigações sobre a eficácia de determinados agentes quimioterápicos, mas os resultados ainda não são satisfatórios e a quimioterapia não é considerada um tratamento padrão (DILLON et al., 2016; BAHL et al., 2018).

A cirurgia é geralmente limitada a pacientes com doença em estágio inicial. Por sua vez, a radioterapia é direcionada a pacientes com tumores não ressecáveis e pacientes que apresentam fatores de risco para recorrência pós-cirúrgica, como margens positivas e invasão perineural. Apesar de ser normalmente direcionada a pacientes com doença em estágio inicial, a cirurgia combinada com radioterapia pós-operatória tem sido defendida meio de melhorar o controle local para doença em estágio avançado (DOUGLAS et al., 2000; MENDENHALL et al., 2004; SILVERMAN et al., 2004).

Por sua vez, embora a cirurgia seja considerada a principal modalidade de tratamento para o CAC, o resultado após a ressecção radical da doença está longe de ser satisfatório, pois, de forma isolada, raramente pode evitar recidivas locais devido à frequente invasão perineural e óssea. Logo, a busca por novas estratégias terapêuticas é essencial (PAPASPYROU et al., 2011; SHEN et al., 2012). A Tabela 2 resume os estudos clínicos de diferentes fármacos em pacientes com CAC.

Além disso, estratégias de prevenção e tratamento que levam em conta a variabilidade genética do tumor são cada vez mais presentes no contexto do câncer. Na era da medicina de precisão, as drogas alvo-específicas têm recebido cada vez mais destaque. No câncer, estes medicamentos são utilizados para bloquear o crescimento e a disseminação da doença agindo em proteínas superexpressas, genes amplificados, entre outras biomoléculas específicas que são fundamentais no crescimento e progressão do tumor. Especificamente no CAC, as recentes descobertas sobre a biologia molecular do impulsionaram as investigações para avaliar a eficácia de algumas terapias-alvo (RASK-ANDERSEN et al., 2011, PETRAK et al., 2018).

Tabela 2: Estudos clínicos de terapias alvo-específicas para o CAC. Fonte: Clinicaltrials.gov.identifier

Droga	Identificação Clinicaltrials.gov	Alvo	Fase
Doxorrubicina e Bortezomibe	NCT00581360	Inibidor do crescimento de células tumorais	Fase 2
Sunitinibe	NCT00886132	Inibidor de pequenas moléculas multi-alvo dos receptores de tirosina quinases (RTKs)	Fase 2
Dovitinib (TKI258)	Nct01524692	Inibidor de RTK com amplo perfil direcionado ativo contra essas três RTKs (VEGF, FGF e PDGF)	
Ditosilato de lapatinib	NCT00095563	Inibidor de EGFR e/ou HER2	Fase 2
Cloridrato de gencitabina	NCT00017498	Análogo de pirimidina	Fase 2
Dasatinibe	NCT00859937	Inibidor de BCR-ABL, SRC (SRC, LCK, SIM, FYN), c-KIT, EPHA2 e PDGFR β	Fase 2
Nelfinavir	NCT01065844	Inibidor de AKT e MAPK	Fase 2
Gefitinibe	NCT00068497	EGFR	Completo
Erlotinibe e Cetuximabe	NCT00101348	EGFR	Fase 2
Bevacizumabe	NCT00492089	VEGF	Fase 2

Mesilato de imatinibe	NCT00045669	BCR-ABL	Fase 2
Docetaxel	NCT00002901	Inibidor do crescimento de microtúbulos	Fase 1
Semaxanibe e Paclitaxel	NCT00005647	Inibidor do receptor de tirosina cinases (RTKi) e fármaco antiangiogênico adicionado à estabilização dos microtúbulos	Fase 1
Peptídeo CNGRC-TNF-alfa conjugado	NCT00098943	Inibidor de TNF associado à proteína de fusão	Fase 1
Trastuzumabe	NCT00004163	Inibidor de HER2	Fase 2
Gencitabina	NCT00003744	Inibidor da timidilato sintetase e da síntese de DNA	Fase 2
Paclitaxel, cisplatina, e radioterapia	NCT00021333	Inibidor do crescimento de células tumorais por maneiras distintas	Fase 2
Gencitabina e doxorrubicina	NCT00509665	Inibidor da timidilato sintetase e do crescimento de células tumorais	Fase 2

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver e caracterizar um modelo *in vitro* de carcinoma adenoide cístico para a avaliação de moléculas anticâncer.

3.2 Específicos

- Estabelecer linhagem celular de carcinoma adenoide cístico;
- Definir a ancestralidade do (a) paciente;
- Caracterizar a cinética de crescimento celular da linhagem estabelecida;
- Analisar as CNAs da linhagem estabelecida;
- Comparar as CNAs observadas na linhagem estabelecida com as analisadas no seu tecido tumoral primário precursor;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta do tecido

Um fragmento de tecido tumoral fresco de CAC do subtipo histológico tubular de uma paciente do sexo feminino de 59 anos de idade foi coletado no momento da cirurgia, no Hospital Ophir Loyola (Belém-PA), e foi armazenada em frasco de coleta contendo meio de cultura 199 a 10% de soro bovino fetal (SBF) e imediatamente transportada até o Núcleo de Pesquisas em Oncologia (NPO). A caracterização morfológica foi baseada na descrição do exame de biópsia tecidual. Este projeto foi aprovado pelo comitê de Ética em Pesquisa do Instituto de Ciências da Saúde, da Universidade Federal do Pará (CAAE: 09239518.9.0000.0018).

4.2 Estabelecimento da cultura primária

Em uma placa de petri, a amostra foi lavada com solução de HANKS a 1% de penicilina/estreptomicina (pen/estrep). O tecido foi então fragmentado e uma peça foi armazenada em criotubo no freezer – 80 °C para a posterior extração de DNA. A outra peça tecidual foi transferida para uma placa de petri com HANKS a 1% de pen/estrep e fragmentada em amostras com cerca de 1mm. Com o auxílio de uma Pasteur, as amostras fragmentadas foram transferidas para um tubo falcon e lavadas por ressuspensão em HANKS. O processo de sedimentação foi realizado através de centrifugação a 1000 rpm durante 5 minutos.

Após a centrifugação, o sobrenadante foi removido e as peças da amostra foram transferidas para um tubo falcon contendo 4,5 ml de meio de cultura DMEM, 0,5 ml colagenase, 1% de pen/estrep e 10% de SBF. O tubo permaneceu em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C durante 3 horas. Em seguida, foram feitas três lavagens com PBS e as células foram transferidas para 6 garrafas de cultura de 25 cm², sendo mantidas em estufa a 5% de CO₂ a 37 °C por 24h sem agitação. Depois de 24h, a desagregação e migração das células do tecido tumoral para a parede da garrafa foi controlado em microscópio com objetiva de 40x. Após efetiva observação da aderência das células ao substrato de adesão, o meio foi trocado sem lavagem com PBS.

4.3 Manutenção da cultura primária

As células que cresceram a partir da peça tumoral foram mantidas em cultivo seguindo a seguinte rotina: o meio completo (DMEM suplementado com 10% de SBF) era trocado 2-3 vezes por semana com lavagem com 1 ml de PBS. Quando atingiam um nível de confluência de cerca de 70-80%, as células eram plaqueadas para uma nova passagem com 1 ml de tripsina, que permanecia durante 5 minutos em estufa a 5% de CO₂ e 37 °C. As células na 3ª, 10ª, 30ª e 52ª passagem foram criopreservadas misturando a suspensão de células em meio completo com solução de congelamento (10% de DMSO + 90% de SBF). As células permaneceram 30 minutos a -20 graus, sendo posteriormente armazenadas a -80 °C.

4.4 Curva de crescimento celular

As células da 39ª passagem foram retiradas da garrafa de cultura após a tripssinização e transferidas para um tubo falcon, onde foram adicionados 2 ml de meio completo. Em seguida, as células foram centrifugadas a 1000 rpm durante cinco minutos. O sobrenadante foi retirado e o pellet foi ressuspensionado em 3 ml de meio completo.

Em seguida, foram adicionados em um tubo eppendorf 10 µl da ressuspensão e 10 µl de azul de tripan. A mistura foi agitada delicadamente e foram retirados 10 µl para a contagem na câmara de Neubauer seguindo a seguinte equação: $x = \frac{N^{\circ} \cdot 10^4}{4}$.

Nesta equação, X representa o número de células em 1000 µl; N° é o número total de células contados na câmara; e 4 é o número de quadrantes da câmara. Levando em consideração que os 10 µl do volume adicionado na câmara foi diluído com azul de tripan e que as células foram inicialmente diluídas em 3 ml de meio, a equação final ficará: $X = \frac{N^{\circ} \cdot 10^4}{2} \times 3.000 \mu\text{l}$.

Após a contagem na câmara, foram retirados 800 µl do volume contido no tubo falcon e distribuídos em quatro garrafas de cultura (200 µl em cada garrafa). Nestas garrafas, foram adicionados 5 ml de meio completo e foram repetidos os

mesmos processos de rotina, centrifugação e contagem de células após 12, 24, 48 e 72 horas. O gráfico da curva de crescimento foi obtido pelo software GraphPad Prism 6.

4.5 Isolamento de DNA

4.5.1 Sangue

O DNA do sangue da paciente foi extraído seguindo três etapas, de acordo com protocolo do NPO: 1) lise de hemácias, 2) lise de leucócitos, 3) precipitação de proteínas.

1) Em um tubo eppendorf, foram adicionados 500µl de sangue e 1000µl de solução de lise de hemácias. O tubo foi agitado manualmente e em seguida centrifugado a 14.000 rpm durante 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados mais 900 µl de solução de lise de hemácias. O tubo permaneceu no agitador por 20 minutos e em seguida na centrifuga durante 3 minutos, a 14.000 rpm. O sobrenadante foi descartado para dar prosseguimento a etapa seguinte.

2) Foram acrescentados ao pellet 500 µl de lise de leucócitos. O tubo foi agitado em vórtex até dissolver o pellet e em seguida foi levado ao banho-maria por 30 minutos a 55 °C.

3) Foram acrescentados 200µl de solução de precipitação de proteínas à mistura, que em seguida foi agitada brevemente em vórtex. O tubo foi levado a banho-maria por 30 minutos a 55 °C. Em seguida, o tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 6 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo eppendorf e foram acrescentados 900 µl de isopropanol. O tubo foi agitado manualmente até o pellet de DNA ficar visível. O tubo foi centrifugado a 14.000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante foi desprezado. O pellet de DNA foi hidratado com 300 µl de tampão TEB.

4.5.2 Tecido e Linhagem

O DNA da 56ª passagem da linhagem celular e do tecido tumoral foram isolados utilizando o kit de isolamento de DNA QiAmp (Qiagen, Hilden, Alemanha) de acordo com o protocolo recomendado pelo fabricante. A

concentração e a pureza do DNA foram avaliadas por Nanodrop (NanoDrop Technologies, Houston, TX, EUA) e eletroforese em gel de agarose.

4.6 Análise de ancestralidade

Utilizando o DNA extraído do sangue da paciente, foi realizada a análise de ancestralidade baseada em um painel informativo de marcadores de ancestralidade, conforme descrito previamente por Santos et al. (2010).

Sessenta marcadores bialélicos foram previamente selecionados com base nos seguintes critérios: (1) Alta diferença nas frequências alélicas ($\delta \geq 40\%$) entre as populações Africana, Europeia, e/ou Nativa Americana; (2) Localização dos marcadores em diferentes cromossomos ou diferentes regiões físicas do mesmo cromossomo; e (3) Tamanhos variáveis entre 3 a 40 pares de base (bp) que permitem a genotipagem simultânea de múltiplos marcadores. A seleção foi feita baseada nos dados de Weber e colaboradores 2002 e do banco de dados online www.marsh-fieldclinic.org/mgs/pages/default.aspx?page=5&didp.

A amostra de DNA foi tipada para os marcadores bialélicos por meio de amplificações PCR. Para tal, utilizou-se 5,0 μL do kit QIAGEN Multiplex PCR (QIAGEN, Alemanha), 1,0 μL de Q-solution, 1,0 μL de Primer Mix, 2,0 μL de água e 1,0 μL de DNA (10ng). A amostra foi incubada a 95°C por 15 minutos, então 35 ciclos a 94°C por 45 segundos, 60°C por 90 segundos e 72°C por 60 segundos, com uma extensão final a 70°C por 30 minutos. Essa reação foi realizada no termociclador ABI Verity (Life Technologies, Foster City, CA, EUA).

Para a eletroforese capilar e análise de fragmento, 1,0 μL do produto de PCR foi adicionado a 8,5 μL da formamida deionizada HI-FI (Life Technologies, Foster City, CA, EUA) e a 0,5 μL de GeneScan 500 LIZ pattern size (Life Technologies, Foster City, CA, EUA). A separação desses fragmentos de DNA foi realizada com o ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer e a leitura dos picos foi realizada utilizando o programa GeneMapper ID v3.2, (Life Technologies Foster City, CA, EUA). A genotipagem foi analisada pelo software STRUCTURE v.2.2

4.7 Hibridização Genômica Comparativa em Array (aCGH)

Para maior resolução do perfil citogenético, foram realizadas análises de microarray de alta densidade de sondas para análise de CNAs. Para isso, foi utilizada a matriz SurePrint G3 Cancer CGH+SNP Array Bundle, 4x180K (Agilent Technologies, CA, USA). Essa matriz contém cerca de 120.000 sondas para identificação de CNAs e 60.000 SNPs. Estas análises foram realizadas no DNA do tecido tumoral e no DNA da linhagem estabelecida.

4.7.1 Digestão do DNA genômico

O DNA genômico (gDNA) extraído foi concentrado em água ultra-pura e então exposto a ação das enzimas *Alu I* e *Rsa I* para a formação de fragmentos de 200 a 500pb. Esta etapa também foi realizada com o gDNA de referência (Human Reference DNA Male ou Female, Agilent Technologies, CA, USA), disponibilizado no kit *SureTag Complete DNA Labeling*. Em cada tubo contendo o gDNA diluído, foi adicionado o *Digestion Master Mix*, composto de água ultra-pura, tampão de Restrição Enzimática 10X, albumina bovina e das enzimas *Alu I* e *Rsa I*. A mistura foi incubada em banho-maria a 37°C por 2 horas e logo em seguida a 65°C, por 20 minutos.

4.7.2 Marcação dos gDNA

Para a marcação dos gDNAs, foi utilizado o corante fluorescente *Cy5-dUTP* para as amostras teste e *Cy3-dUTP* para o gDNA de referência. Para isto, foram adicionados 5µL de um *primer* randômico à mistura. Os tubos contendo o gDNA foram incubados a 95 °C por 3 minutos, e depois em gelo por 5 minutos. Posteriormente, foram acrescentados 21µL do Labeling Master Mix, composto por água ultra-pura, Tampão de Reativação 5x, 10x dNTPs (nucleotídeos do DNA), *Cy3-dUTP* ou *Cy5-dUTP* e Exo-Klenow (uma DNA polimerase). Em seguida, as misturas foram incubadas a 37°C por 2 horas, e posteriormente a 65°C, durante 10 minutos.

4.7.3 Purificação do gDNA

Para a etapa de purificação do material, foram adicionados em cada amostra o tampão TE (pH 8.0), que posteriormente foram transferidas para

colunas de purificação para serem centrifugadas a 14000g por dez minutos. O sobrenadante foi descartado e mais TE (pH 8.0) foram adicionados.

Após a segunda centrifugação, a coluna foi invertida em novo tubo coletor de 2mL e centrifugada a 1000xg para obtenção do material purificado. Este foi quantificado em Nanodrop (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA) para a medição das concentrações do gDNA e dos marcadores e para a quantificação do volume final da amostra, para a estipulação dos valores de atividade específica dos marcadores e rendimento do processo de marcação. Estes valores indicaram o funcionamento das etapas anteriores e definiram a escolha dos pares de amostras (gDNA de referência e teste) que foram formados.

4.7.4 Preparação pré-hibridização

Nesta etapa, foram adicionados às amostras (gDNA de referência + gDNA da amostra testada) o *Hybridization Master Mix* (composto de tampão de hibridização, agente de bloqueio 10x concentrado e Cot-1 DNA). Essa mistura foi então incubada a 95°C por 3 minutos e imediatamente transferida para um banho-maria a 37°C, por 30 minutos. Após essa etapa, o material foi centrifugado por 1 minuto a 6000g para dar prosseguimento a etapa de hibridização.

4.7.5 Hibridização

Primeiramente, em uma lamínula específica foram adicionado 100µl da solução em cada um dos poços. Esta lamínula em seguida foi encaixada na lâmina de *microarray* e a este complexo foi acoplada uma base de fixação. O complexo foi movido verticalmente para que o líquido se espalhe uniformemente sobre cada *array* e para evitar a formação de possíveis bolhas de ar. O complexo foi fixado em uma câmara de hibridização e mantido a 65°C por 24 horas, com uma rotação de 20rpm.

4.7.6 Lavagem do *micorarrays*

O complexo lâmina/lamínula foi retirado da base de fixação e mergulhado em tampão de lavagem 1 (*Wash Buffer 1*) para auxiliar na dissociação. Posteriormente, as lâminas foram colocadas em uma cuba de vidro contendo novamente tampão de lavagem 1 sob agitação com magneto, por 5 minutos

(ambos os processos em temperatura ambiente). As lâminas foram então transferidas para uma terceira cuba contendo o tampão de lavagem 2 (*Wash Buffer 2*), em agitação com magneto, à temperatura de 37°C. Por fim, as lâminas foram cobertas com uma lamínula protetora, de modo a minimizar a exposição do gDNA marcado ao ozônio, e foram encaixadas em um estojo para dar seguimento à etapa seguinte.

4.7.7 Escaneamento e extração dos dados

Os estojos com os *microarrays* foram encaixados em cassetes do *Agilent Microarray Scanner* (PN G2565BA). O controle e obtenção das imagens foram feitos com o uso do *Feature Extraction software*, v10.10. A análise dos dados foi realizada através do programa *cytogenomics* (Agilent Technologies, CA, USA) e a validação dos dados foi realizada pelo site toppgene.cchmc.org. $\text{LogRatio} > 0.25$ e $\text{logRatio} < -0.25$ foram definidos para ganhos e perdas cromossômicos, respectivamente.

5 RESULTADOS

5.1 Cinética de crescimento celular

A cultura celular do tipo aderente (Fig. 6) apresentou um crescimento de colônias tumorais em detrimento dos fibroblastos a partir da passagem 18, estabilizando-se na passagem 30. Na 39ª passagem, foi realizada uma curva de crescimento celular, na qual o volume inicial de células foi de $265,5 \times 10^4$ em 3000 μl . Logo, os 200 μl semeados em cada garrafa continham $17,7 \times 10^4$ células (T0). A partir da quantificação inicial, as células foram quantificadas em 12 horas (T1), 24 horas (T2), 48 horas (T3) e 72 horas (T4). A curva de crescimento celular resultante pode ser observada no gráfico (Fig.7) a seguir

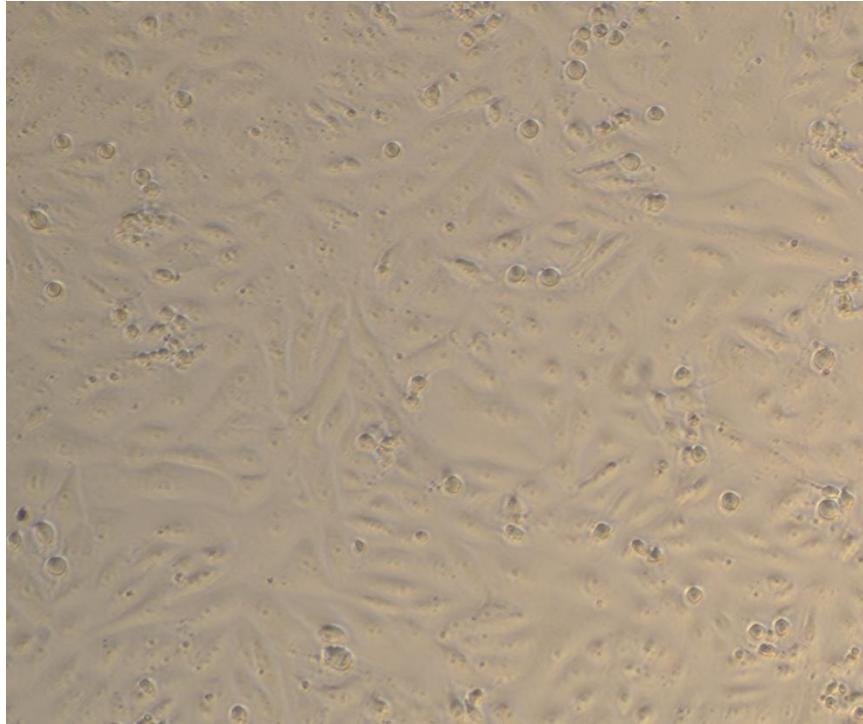


Figura 6: linhagem celular de CAC estabelecida na passagem 52, visualizada em microscópio invertido, objetiva de 40x.

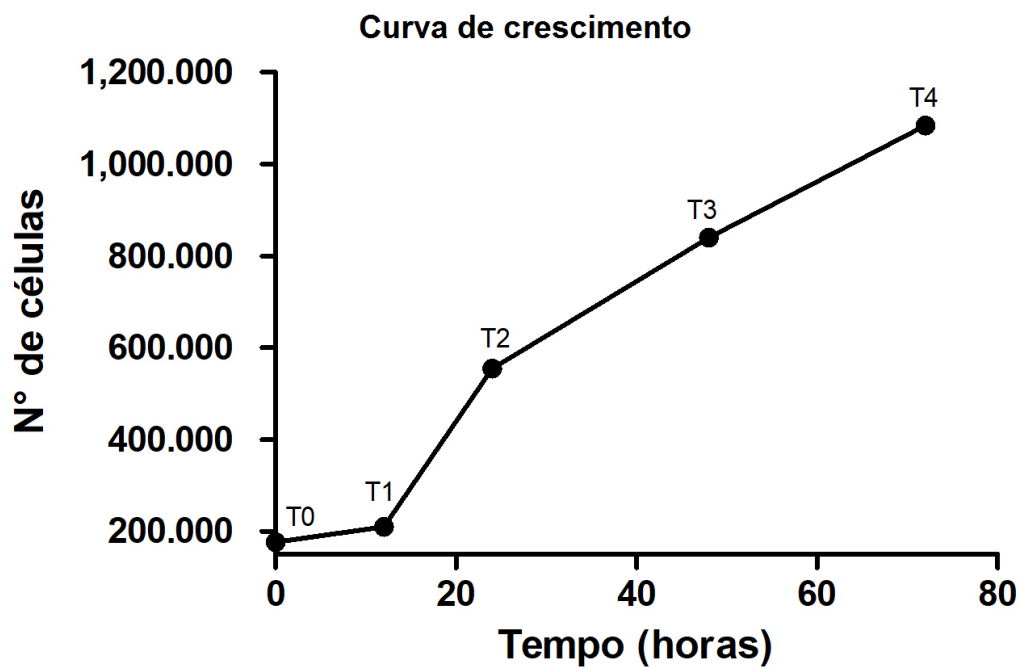


Figura 7: Gráfico da curva de crescimento celular. As células foram quantificadas na câmara de Neubauer e diluídas em uma concentração de 200 μ l de meio. T0 = 177.000 células; T1 = 210.000 células, T2 = 555.000 células, T3 = 840.000 células e T4 = 1.080.000 células.

5.2 Morfologia tecidual

Individualmente, foram observadas células neoplásicas mioepiteliais de aspecto basalóide com escasso citoplasma e núcleo basofílico. Histopatologicamente, as células neoplásicas se arranjam em grandes ilhas com áreas formando ductos e áreas de células mioepiteliais formando espaços pseudocísticos, caracterizando o padrão de crescimento tubular. Há presença de invasão perineural e infiltração profunda de planos musculares.

5.3 Ancestralidade

A genotipagem da paciente revelou uma contribuição de diferentes populações parentais compostas por 19% ameríndios, 31,5% de europeus e 49,5% de africanos, conforme pode ser observado na Figura 8.

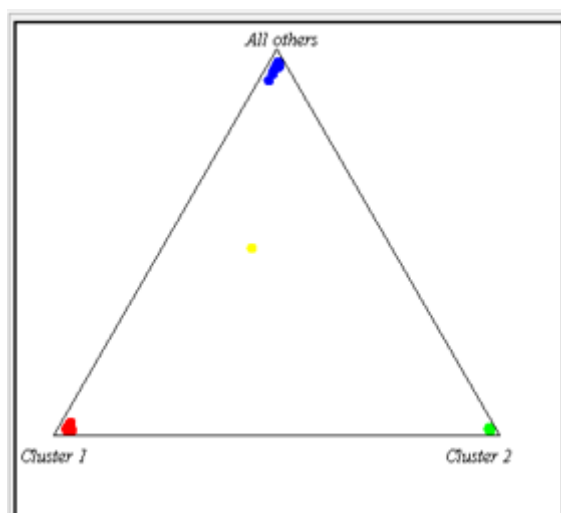


Figura 8: Representação esquemática da contribuição de diferentes populações parentais, usando o software STRUCTURE v.22 e assumindo frequências alélicas correlatas. Cluster verde: Ameríndio (0.190), cluster vermelho: europeu (0.315), cluster azul: africanos (0.495). Cluster amarelo: amostra da paciente.

5.4 Análise de alterações cromossômicas por aCGH

A análise pelo programa cytogenomics revelou importantes CNAs tanto na linhagem quanto no tecido tumoral e demonstrou que ambas as amostras mantiveram algumas alterações. Após revisão de literatura e análise no site [toppgene.cchmc.org.](http://toppgene.cchmc.org), foram destacadas as CNAs recorrentes no CAC e estas podem ser observadas na tabela 3. O tamanho destas alterações e a região de sobreposição são descritos em kilobases (kb).

Tabela 3: Alterações citogenéticas identificadas na linhagem e na amostra tumorais.

Alteração	Tamanho/sobreposição* (Kb)	Região	Gene de interesse	Amostra
Perda	13137.12	6q23.3 - q25.1	<i>PLAGL1</i>	Linhagem
Ganho	49335.11	7p22.1 - p11.2	<i>EGFR</i>	Linhagem
Amplificação	101.697	7q31.2	<i>MET</i>	Linhagem
Ganho	9.827.214	7q32.3 - q34	<i>BRAF</i>	Linhagem
Deleção	9.197.393	9p21.3 - p21.1	<i>CDKN2A/B</i>	Linhagem
Ganho	1484.01	17q12 - q21.2	<i>HER2</i>	Linhagem
Ganho	1.234.3527	Xq25 - q27.1	<i>SMARCA1</i>	Linhagem
Ganho	27.087	9q34.3	<i>NOTCH1</i>	Tecido
Ganho	82.413	5q32	<i>PDGFRβ</i>	Tecido
Amplificação	84.809	8p11.22	-----	Ambas as amostras
Perda	91.243	19p13.3 - p12	<i>CDKN2D</i>	Ambas as amostras
Amplificação	100	22q11.22	-----	Ambas as amostras

*A região de sobreposição somente é levada em consideração nas alterações que ocorreram em ambas as amostras.

6 DISCUSSÃO

O CAC é um tumor raro e agressivo, cuja base genética do seu desenvolvimento ainda é pouco conhecida. Devido sua raridade, o CAC carece

de modelos de estudo, o que dificulta a pesquisa básica para a compreensão da biologia molecular deste tumor, assim como testes com drogas alvo-específicas. Esta conjuntura faz do CAC um tumor com prognóstico ruim, resultando frequentemente no óbito dos pacientes. Para tentar auxiliar na reversão deste quadro, nós estabelecemos e caracterizamos citogeneticamente uma linhagem tumoral advinda de um tumor primário de CAC da cavidade oral.

A amostra tumoral foi extraída de uma paciente do sexo feminino de 59 anos de idade, com uma contribuição ancestral de 19% ameríndios, 31,5% de europeus e 49,5% de africanos. Como neste estudo não houve comparações entre amostras de diferentes indivíduos com CAC de uma mesma população, não foi possível determinar se alguma alteração cromossômica observada está associada com a ancestralidade. Também não há estudos na literatura com este propósito para efeitos comparativos, portanto, este trabalho fornece subsídios para estudos futuros que busquem avaliar se alterações cromossômicas características de uma população podem estar associadas ao risco de desenvolver CAC.

A linhagem estabelecida a partir desta amostra tumoral apresentou rápido crescimento de colônias tumorais a partir da passagem 18, estabilizando-se na passagem 30. A partir da passagem 39, em até 72 horas, a linhagem não entrou em fase estacionária, apresentando somente as fases de adaptação e crescimento exponencial, o que pode ser indicativo de crescimento lento ou da baixa concentração inicial de células. Portanto, é necessário avaliar se a cultura apresenta o mesmo comportamento partindo de uma concentração de células superior a 200 µl, além de haver a necessidade de realização do experimento em triplicata (PERES e CURI, 2005).

A análise citogenética revelou que a linhagem adquire alterações diferentes daquelas observadas no tecido, porém, ambas as amostras possuem alterações em comum. Entre estas alterações em comum, as amplificações em 8p11.22 e 22q11.22 não apresentaram genes de interesse para o CAC, após revisão na literatura. De fato, as amplificações são consideradas raras neste tumor, o que pode indicar que a manutenção destas alterações tanto na linhagem quanto no tumor é um evento aleatório (SEQUEIROS-SANTIAGO et al., 2009).

A perda em 19p13.3 - p12, também comum entre a linhagem e o tecido, será discutida posteriormente.

Na linhagem estabelecida ocorreram ganhos em loci que abrigam importantes fatores de crescimento, como em 7p22.1 - p11.2, que abriga o Receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFR*); e em 17q12 - q21.2, que abriga o Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (*HER2*).

A família ERBB são proteínas tirosina kinase composta por três membros de receptores: HER2, HER3 e o EGFR. Esta família de proteínas pode ativar importantes vias de proliferação, sobrevivência e motilidade celular, como a via Ras/MAPK e a via PI3K/AKT. Por conta deste papel central em importantes atividades celulares, o ganho do número de cópias, mutações e amplificação do *EGFR* são frequentemente descritos em diversos tipos de câncer (SIGISMUND et al., 2018). Mutações no gene *EGFR* são raramente descritas em CAC (COSMIC, 2019), enquanto amplificações não foram detectadas (SEQUEIROS-SANTIAGO et al., 2009; RAO et al., 2008; OGA et al., 2011), sendo este trabalho o primeiro a relatar esta alteração nesta neoplasia (2.394.669 Kb).

Ao contrário dos outros receptores da família ERBB, o HER2 não possui um ligante conhecido e pode permanecer em um estado ativado através de heterodimerização com um dos outros membros da família ERBB. Assim, o heterodímero estimula a atividade de tirosina quinase deste receptor e, por consequência, ativa as vias de sinalização (DEAN, 2015).

O ganho no número de cópias na região 17q12 que abriga o *HER2* não foi tão significativo quanto os outros receptores de fatores de crescimento (1484.01 Kb). Da mesma forma, Vekony et al. (2007) relataram ganho na região 17q11.2-q25.3 em apenas 5 de 28 tumores CAC, assim como Seethala et al. (2011), que descreveram ganhos na região 17q em apenas 2 amostras (em um total de 5). Além disso, a análise FISH no trabalho de Seethala et al. demonstrou um baixo nível de amplificação de *HER2* e a IHC não apontou a superexpressão da proteína, enquanto Dori et al. (2002) relataram a superexpressão de HER2 em apenas 16% de 32 amostras de tumores CAC.

As alterações em fatores de crescimento em seus receptores representam alvos significativos para terapias específicas. Neste sentido, o baixo nível de alterações ganhos/amplificação do *HER2* ou o baixo nível de superexpressão da proteína limitam a utilização do Herceptin ou outras terapias alvo-específicas para *HER2* em pacientes com CAC. Em contrapartida, a eficácia de inibidores de tirosina kinase (TKIs) têm sido frequentemente avaliada em pacientes com este tipo tumoral. Em um estudo de fase 2 com cetuximabe, Locati et al. (2009) relataram que 69% dos pacientes apresentaram estabilidade da doença em seis meses, mas não obtiveram respostas mais significativas. Neste estudo, os pacientes com CAC não apresentavam superexpressão do EGFR. Da mesma forma, em 2016, Ho et al. avaliaram a eficácia do Regorafenibe (TKI-PDGFRs) em pacientes com CAC incurável e apenas um subconjunto de pacientes demonstraram estabilidade da doença em seis meses. O Sunitinibe (TKI-VEGF, c-KIT, PDGFRs) também demonstrou ser eficaz em 62% dos pacientes com CAC no que diz respeito a estabilização da doença (CHAU et al., 2011). Em 2016, Ho et al., em um estudo de fase 2, observaram que 39,4% de pacientes com doença progressiva alcançaram estabilidade da doença em seis meses após o tratamento com axitinibe (TKI-VEGF, c-KIT, PDGFRs). Além disso, neste mesmo estudo, foram detectados em três pacientes a amplificação em 4q12 e em dois destes o axitinibe produziu regressão tumoral e estabilidade da doença por mais de seis meses.

Embora a maioria destes estudos tenha falhado em demonstrar respostas mais objetivas no controle da doença de forma geral, como impacto na sobrevida global e sobrevida livre de doença, o controle na estabilidade da doença em um período de seis meses pode representar um ganho na qualidade de vida para pacientes com CAC incurável, o que pode tornar o uso de TKIs uma alternativa de tratamento para um subgrupo de pacientes.

Além dos ganhos que englobam os receptores de fatores de crescimento descritos acima, significativas alterações na região 7q envolvendo importantes oncogenes também foram identificados na linhagem, como a amplificação na região 7q31.2 e o ganho na região 7q32.3 - q34, que abrigam os genes *MET* e *BRAF*, respectivamente.

O gene *MET* codifica uma proteína com duas cadeias: a α extracelular e a cadeia β transmembranar. A cadeia β transmembranar é composta por um domínio SEMA, um domínio PSI, quatro domínios IPT, um domínio transmembranar, um domínio justa-membrana, um domínio tirosina quinase e um local de acoplamento c-terminal. O domínio SEMA é onde o Fator de crescimento de hepatócitos (HGF) se liga ao MET. Por sua vez, o PSI pode estabilizar essa ligação, enquanto o domínio justa-membrana atua na regulação negativa do MET. Quando HGF se liga ao MET, o domínio tirosina quinase sofre fosforilação e permite a ligação de moléculas adaptadoras, como SHC, GRB2 e GAB1. Por consequência, o MET pode ativar importantes vias de sinalização, como o MAPK, KRAS e PI3K-AKT, promovendo a proliferação, progressão do ciclo, mobilidade celular e a transcrição das proteínas anti-apoptóticas BCL2 e BCL-XL (HO-YEN et al., 2015; ZHANG et al., 2018).

Em linhagens celulares de CAC, foi demonstrado que as interações HGF/MET podem estar associadas à maior capacidade de invasão celular (SUZUKI et al., 2003). Em 2005, Bell et al. relataram a superexpressão desta proteína em 52% de 200 amostras de CAC. A amplificação no locus 7q31.2 que abriga o gene *MET* na linhagem tumoral descrita neste trabalho pode ser um mecanismo para a superexpressão da proteína codificada por este gene.

As alterações em *MET* possuem importantes implicações terapêuticas. Em câncer de pulmão não pequenas células, a amplificação do *MET* pode estimular a via PI3K-AKT-mTOR pela ativação do ERBB3, levando ao crescimento do tumor independentemente da utilização de inibidores do EGFR, o que representa um mecanismo de resistência à terapias anti-EGFR (além de mutações no *EGFR*), como gefitinibe e erlotinibe (ENGELMAN et al., 2007; BENEDETTINI et al., 2010).

Apesar destes estudos destacarem câncer de pulmão, novas investigações são necessárias para averiguar se o mesmo mecanismo ocorre em outros tipos de câncer com alterações no *MET*. Além disso, como discutido acima, a maioria de TKIs não apresenta respostas satisfatórias em pacientes com CAC, portanto, é necessário investigar se a amplificação do *MET* implica na resposta de pacientes a terapias alvo-específicas.

A família RAF é um grupo de proteínas com atividade serina/treonina-quinase, que é composta por três membros: RAF-1/C-RAF, B-RAF e A-RAF, os quais atuam como ativadores diretos do MEK e efetores do Ras. O B-RAF é o ativador mais potente do MEK, que por sua vez, ativa o ERK e desencadeia processos celulares como diferenciação, proliferação, crescimento e apoptose. A regulação dessa via é crucial para a manutenção da homeostase em resposta à sinalização extracelular a sua alteração pode desencadear a tumorigênese (MATALLANAS et al., 2011; CANTWELL-DORRIS et al., 2011).

As alterações em B-RAF nos tumores CAC de glândulas salivares são raras. As mutações no gene codificante dessa proteína ocorrem em baixa frequência, e alterações no número de cópias não foram relatadas na literatura até o momento (DAHSE et al., 2009; SAIDA et al., 2019). Portanto, este é o primeiro trabalho que relata um ganho no número de cópias do *BRAF*. No CAC de pulmão, mama e glândulas lacrimais, as alterações em *BRAF* também ocorrem em baixa frequência, sugerindo que este gene talvez não seja fundamental no desenvolvimento deste tipo tumoral (MARTELOTTO et al., 2015; HUO et al., 2015; SANT et al., 2017).

Outra importante classe de genes que é frequentemente alterada no CAC são os remodeladores da cromatina. Nos eucariotos, o DNA se encontra compactado no núcleo das células. Essa compactação do DNA requer o envolvimento desta molécula em um octâmero de histonas formado por quatro principais proteínas: H1, H2A, H2B, H3 e H4. As histonas, o DNA e outras proteínas formam os nucleossomos, que são a unidade básica da cromatina. O nível de compactação da cromatina impacta diretamente na expressão gênica, pois quanto maior o nível de condensação, maior a dificuldade de acesso da maquinaria de transcrição. As enzimas que compõem os complexos especializados de remodelação da cromatina dependente de ATP são essenciais para garantir este acesso, principalmente as da família SWI/SNF (BUSCHBECK e HAKE, 2017; CLAPIER et al., 2017).

Os mamíferos têm dois homólogos do ISWI: SNF2L (codificado pelo gene *SMARCA1*) e SNF2H (codificado pelo gene *SMARCA5*) (CLAPIER et al., 2017). No presente trabalho, foi detectado um ganho no número de cópias (12.343.527

Kb) na região Xq25 - q27.1, que abriga o gene *SMARCA1*, na linhagem tumoral. Aliado a este resultado, Ho et al. (2013) relataram a presença de mutações em remodeladores da cromatina, incluindo *SMARCA2* (5%) *SMARCE1* (2%), *ARID1A* (2%) e *ATRX* (2%) em um total de 60 amostras de CAC. Da mesma forma, Stephens et al. (2013) também observaram a presença de mutações somáticas em *SMARCA2* em 3 de 24 amostras tumorais. Este trabalho foi o primeiro a relatar um ganho no número de cópias de *SMARCA2* no CAC, porém está alinhado com outros resultados na literatura, demonstrando que as alterações nos genes remodeladores da cromatina podem impactar no controle da expressão gênica no CAC.

Da mesma forma que os ganhos, as deleções na linhagem tumoral também foram um achado significativo neste trabalho, principalmente as que afetam importantes genes supressores tumorais (GSTs). Em particular, as kinases dependentes de ciclina (CDKs) desempenham um papel central na regulação do ciclo celular. Na resposta ao estímulo de mitogênio no início da fase G1, os níveis de ciclina do tipo D aumentam e ativam CDK4 e CDK6. Estas CDKs fosforilam Rb, que então libera parcialmente a sua atividade inibitória sobre proteínas reguladoras de genes da família E2F, as quais são essenciais para a passagem através do ponto de restrição em G1. A partir deste ponto, a CDK2 é ativada, levando à hiperfosforilação de Rb e permitindo que as células saiam da fase G1 e iniciem a fase S. Na fase S, as ciclinas E e A ativam CDK2 e CDK1, promovendo a progressão até a fase G2. A partir de então, as ciclinas do tipo B, principalmente a B1 e CDK1, conduzem a célula à mitose (WANG et al., 2011; SÁNCHEZ-MARTÍNEZ et al., 2015).

As atividades das CDKs deve ser rigorosamente controlada para evitar a proliferação celular excessiva que pode resultar em câncer. Os inibidores das CDKs são divididos em famílias, entre as quais a família INK4 inclui os membros p15, p16, p18 e p19. O *CDKN2B* (p15) e *CDKN2A* (p16), ambos localizados na região 9p21, assim como o *CDKN2D* (p19), codificam proteínas que podem se ligar à CDK4 e 6, inibindo sua capacidade de formar os complexos de kinase com ciclinas do tipo D. Consequentemente, a atividade inibitória de Rb sobre E2F é mantida, e o ciclo celular é interrompido na fase G1 (LAW et al., 2015).

A deleção de 9p21 descrita neste trabalho (9.197.393 Kb) já foi relatada anteriormente. Bernheim et al. (2008) demonstraram deleções em *CDKN2A/B* em 0,34% (2/17) de amostras de CAC analisadas. Similarmente, Ross et al. (2014) demonstraram a mesma alteração nos dois genes em 7% (2/28) das amostras estudadas. Além disso, outras alterações envolvendo os genes *CDKN2B* e *CDKN2A* foram descritas no CAC, entre as quais podem-se destacar mutações somáticas e perda de heterozigose (LOH) de *CDKN2A* (STEPHENS et al., 2013) e metilação do promotor de ambos os genes (MARUYA et al., 2002; LI et al., 2005; DAA et al., 2008). Por outro lado, a perda em 19p13.3 - p12, locus que abriga o gene *CDKN2D*, ainda não foi relatada em estudos prévios de CAC e, curiosamente, esta alteração foi mantida tanto no tecido quanto na linhagem tumoral, demonstrando ser importante para a progressão da doença. O conjunto destes resultados sugerem que tanto alterações genéticas quanto epigenéticas contribuem a perda de função dos inibidores de CDKs no CAC e que estas alterações podem representar um mecanismo chave para o desenvolvimento deste tipo tumoral.

Além dos inibidores de CDKs, a regulação do ciclo depende também da atuação de diversas outras proteínas, como o *PLAGL1*. Entre as principais funções da *PLAGL1* está a regulação do ciclo celular através da interação com p53. Ambas as proteínas induzem a expressão do receptor do peptídeo ativador da adenil ciclase hipofisária (PACAP1-R). Quando ativada por seus ligantes, esta proteína induz à transcrição gênica da proteína ativadora 1 (AP-1), desencadeando a apoptose. Além disso, *PLAGL1* e p53 induzem p21 WAF1/Cip1, cuja função é bloquear a transcrição da ciclina A, processo que causa a parada do ciclo celular na fase G1. O *PLAGL1* também pode inibir a progressão do ciclo celular através da indução da expressão de PPAR γ , a qual desencadeia a indução de p21 Cip1 (VEGA-BENEDETTI et al., 2016).

O *PLAGL1* é de fundamental importância no desenvolvimento de adenomas pleomórficos de glândula salivar. Devido a presença do rearranjo t (3; 8) (p21; q12), frequentemente presente nestes tumores, o *PLAGL1* foi descoberto e caracterizado. A deleção de 6q24, locus do gene *PLAGL1*, se mostra um evento frequente em CAC, independente da localização anatômica do tumor (WA'EL et al., 2001; ABDOLLAHI, 2007). Stallmach et al. (2002)

revelaram que marcadores de microssatélites em 6q24 apresentaram altas taxas de LOH em tumores do subtipo histológico cribriforme e que estas taxas estão associadas a fatores clinicopatológicos, como estadiamento avançado, evolução desfavorável do paciente e em tumores mistos com mais de 10% de crescimento de padrão sólido. Neste trabalho, a perda em 6q23.3-q25.1 (1.313.712 Kb) observada na linhagem estabelecida apoia estes resultados e demonstra que o *PLAGL1* é provavelmente um gene *driver* no CAC.

Até o momento, poucas linhagens tumorais de CAC foram estabelecidas, e algumas delas têm sua autenticidade questionada principalmente devido a co-contaminação. Neste sentido, vale destacar que a linhagem de CAC estabelecida possui um perfil de alterações citogenéticas diferente das linhagens gástricas manipuladas no mesmo ambiente (PHUCHAREON et al., 2009; LEAL et al., 2009).

O trabalho de Li et al. (2014), cuja autenticidade da linhagem é comprovada, também analisa os ganhos e perdas cromossômicas por aCGH. A linhagem MDA-ACC-01, estabelecida por estes autores, provém da base da língua de um paciente do sexo masculino. As alterações relatadas por estes autores são diferentes das observadas na linhagem descrita neste estudo. No entanto, as alterações observadas por eles no tecido também foram perdidas na linhagem ao longo das passagens. Além disso, Li et al. (2014) utilizaram a superexpressão do gene da transcriptase reversa da telomerase humana (hTERT) para a imortalização de sua cultura, ao contrário da linhagem estabelecida neste trabalho. Isto pode ocorrer devido as taxas de alterações cromossômicas na nossa linhagem serem relativamente mais elevadas do que na linhagem MDA-ACC-01 e a instabilidade genética tem demonstrado ser um fator importante para a imortalização de linhagens celulares tumorais (RATSCH et al., 2001; COWELL et al., 2005).

Em relação ao tecido tumoral, houve um ganho significativo na região 9q34.3 (27.087 Kb) e na região 5q32 (82.413 Kb). Na região 9q, o gene candidato de maior interesse é o *NOTCH*. A via de sinalização NOTCH atua na proliferação e diferenciação celulares, além do desenvolvimento embrionário e apoptose. Esta via é composta por quatro receptores (NOTCH1-4) e cinco ligantes: ligante

tipo delta 1 (DLL1), ligante tipo delta 3 (DLL3), ligante tipo delta 4 (DLL4), Jagged-1 (JAG1) e Jagged-2 (JAG2). Alterações na via de sinalização NOTCH são frequentemente descritas em câncer, especificamente, o receptor transmembrana NOTCH1 está associado a quimioresistência, a proliferação e migração celular (YUAN et al., 2015).

Estudos de sequenciamento têm relatado mutações em *NOTCH1* associadas ao ganho de função de NOTCH1 em CAC (STEPHENS et al., 2013; HO et al., 2013). Em modelos *in vitro* e *in vivo*, foi demonstrado que o knockout de *NOTCH-1* inibe a migração de células de CAC e diminuí nódulos metastáticos no pulmão de camundongos (CHEN et al., 2015). Além disso, Ferrarotto et al. (2016) relataram que pacientes com mutações em *NOTCH1* apresentam uma doença mais agressiva, com alta tendência para metástases no fígado e um pior prognóstico. Em 2019, Ho et al. reafirmaram que mutações em *NOCTH1* estão associadas a um pior prognóstico. Em nosso trabalho, o aumento do número de cópias de *NOCTH1* pode representar um mecanismo alterativo para a desregulação da via de sinalização NOTCH no CAC.

As alterações na via de sinalização NOTCH oferecem uma oportunidade para terapias alvo-específicas. Neste sentido, a combinação de quimioterapia ou radioterapia com inibidores de NOTCH têm demonstrado bons resultados (YUAN et al., 2015). Para o CAC, os ensaios clínicos para estes inibidores ainda são limitados, no entanto, em um ensaio clínico de fase I, Even et al. (2017) demonstraram que o inibidor LY3039478 (NOTCH1-4) ofereceu uma taxa de controle da doença em seis meses em 73% de 22 pacientes com doença metastática. Este resultado positivo encoraja novos estudos com coortes mais significativas e outros possíveis inibidores, além de reforçar a necessidade da caracterização de modelos *in vitro* e *in vivo* para pesquisa básica.

O ganho na região 5q engloba o Receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas beta (PDGFR β). A via de sinalização do Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) é composta por quatro membros: PDGF-A, B, C e D, cujas isoformas ativas podem se ligar e dimerizar dois receptores tirosina kinase: PDGFR α e PDGFR β . Assim, os PDGFs e seus receptores atuam principalmente em resposta à baixa tensão de oxigênio, ou

através do estímulo de fatores de crescimento e citocinas; e atuam no reparo tecidual e a cicatrização de feridas. Em 2007, Vekony et al. já haviam relatado o ganho do número de cópias no locus do PDGFR β em 40% de 18 amostras tumorais de CAC. (WANG et al., 2016; PAPADOPOULOS e LENNARTSSON, 2017).

As alterações em quaisquer membros da via de sinalização do PDGF possuem um papel central no crescimento tumoral e na metástase e são descritas em cerca de 30% dos pacientes com câncer. Particularmente, o PDGFR β têm sido relatado como importante para a motilidade de células tumorais e é apontado como importante biomarcador de cânceres infantis, como glioblastoma, neuroblastoma, sarcoma de Ewing e astrocitoma, o que o torna um importante candidato a oncogene no CAC (FAROOQI e SIDDIK, 2016; WANG et al., 2016).

Embora não tenham sido mantidas na linhagem, ambas as alterações observadas no tecido reforçam dados já publicados na literatura e contribuí com informações importantes sobre a biologia tumoral do CAC, reforçando que os dois genes de interesse podem ser determinantes na carcinogênese deste tumor.

7 CONCLUSÃO

Os mecanismos de desenvolvimento do CAC não são claros. Atualmente, não há estudos que relatem a contribuição ancestral como um fator importante para a carcinogênese deste tipo tumoral. Neste estudo, a análise da ancestralidade na amostra tumoral revelou uma contribuição ancestral de 19% de ameríndios, 31,5% de europeus e 49,5% de africanos.. Além disso, este trabalho reforçou achados já descritos na literatura, ressaltando que as alterações citogenéticas são importantes para o desenvolvimento do CAC. Entre as importantes alterações observadas na linhagem estabelecida, destacam-se os ganhos em loci que abrigam os genes *EGFR* (7p22.1-p11.2), *BRAF* (7q32.3-q34), *HER2* (17q12-q21.2) e *SMARCA1* (Xq25-q27.1). Além disso, também foram observados na linhagem a amplificação no locus do gene *MET* (7q31.2), deleção envolvendo os genes *CDKN2A/B* (9p21.3-p21.1) e a perda na região do *PLAGL1* (6q23.3-q25.1). Por sua vez, no tecido tumoral foram observados

apenas ganhos nas regiões 9q34.3 e 5q32, as quais abrigam os genes *NOTCH1* e *PDGFR β* , respectivamente. Entre as alterações observadas em ambas as amostras, a perda na região 19p13.3-p12 envolve o gene *CDKN2D*. A maioria das alterações cromossômicas relatadas não são comuns entre a amostra tecidual e a linhagem estabelecida, todavia, é comum que as células percam algumas características iniciais do tumor ao longo da progressão da cultura. Além disso, a instabilidade cromossômica também contribuiu para a heterogeneidade intratumoral, portanto, é possível que a cultura estabelecida tenha evoluído baseada na seleção das variantes mais agressivas da amostra tecidual do tumor. Além de realçar o papel de vias de sinalização, fatores de crescimento e supressores tumorais na carcinogênese do CAC, este trabalho sinaliza que estas alterações representam alvos para terapias específicas. Por fim, apesar de ter adquirido um perfil citogenético diferente do tecido original, a linhagem pode ser um bom modelo *in vitro* para a investigação da patogênese do CAC e pode auxiliar na pesquisa básica para novas modalidades terapêuticas.

Referências:

ABDOLLAHI, A. LOT1 (ZAC1/PLAGL1) and its family members: mechanisms and functions. **Journal of cellular physiology**, v. 210, n. 1, p. 16-25, 2007.

ALBERTSON, D. G. Gene amplification in cancer. **TRENDS in Genetics**, v. 22, n. 8, p. 447-455, 2006.

ALMEIDA, L. O. et al. Unlocking the chromatin of adenoid cystic carcinomas using HDAC inhibitors sensitize cancer stem cells to cisplatin and induces tumor senescence. **Stem cell research**, v. 21, p. 94-105, 2017.

ARGYRIS, P. P. et al. Clinical utility of myb rearrangement detection and p63/p40 immunophenotyping in the diagnosis of adenoid cystic carcinoma of minor salivary glands: a pilot study. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 121, n. 3, p. 282-289, 2016.

BAHL, A. et al. Evaluation of Multimodality Management of Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery**, p. 1-5, 2018.

BAKKER, B. et al. How to count chromosomes in a cell: An overview of current and novel technologies. **BioEssays**, v. 37, n. 5, p. 570-577, 2015.

BELL, D. et al. Analysis and significance of c-MET expression in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. **Cancer biology & therapy**, v. 16, n. 6, p. 834-838, 2015.

BENEDETTINI, E. et al. Met activation in non-small cell lung cancer is associated with de novo resistance to EGFR inhibitors and the development of brain metastasis. **The American journal of pathology**, v. 177, n. 1, p. 415-423, 2010.

BEROUKHIM, R. et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. **Nature**, v. 463, n. 7283, p. 899, 2010.

BERNHEIM, A. et al. High-resolution array comparative genomic hybridization analysis of human bronchial and salivary adenoid cystic carcinoma. **Laboratory investigation**, v. 88, n. 5, p. 464, 2008.

BOER, J. M. et al. Prognostic value of rare IKZF1 deletion in childhood B-cell precursor acute lymphoblastic leukemia: an international collaborative study. **Leukemia**, v. 30, n. 1, p. 32, 2016.

BRAYER, K. J. et al. Recurrent fusions in MYB and MYBL1 define a common, transcription factor–driven oncogenic pathway in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Cancer discovery**, v. 6, n. 2, p. 176-187, 2016.

BRILL II, L. B. et al. Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. **Modern pathology**, v. 24, n. 9, p. 1169, 2011.

BUJNICKI, T. et al. Inhibition of Myb-dependent gene expression by the sesquiterpene lactone mexicanin-I. **Leukemia**, v. 26, n. 4, p. 615, 2012.

BUSCHBECK, M.; HAKE, S. B. Variants of core histones and their roles in cell fate decisions, development and cancer. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 18, n. 5, p. 299, 2017.

CALCAGNO, D. Q. et al. MYC, FBXW7 and TP53 copy number variation and expression in gastric cancer. **BMC gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 141, 2013.

CANTWELL-DORRIS, E. R.; O'LEARY, J. J.; SHEILS, O. M. BRAFV600E: implications for carcinogenesis and molecular therapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 10, n. 3, p. 385-394, 2011.

CARLOS-BREGNI, R. et al. Primary intraosseous adenoid cystic carcinoma of the mandible: histopathological and immunohistochemical analysis. **Pathology & Oncology Research**, v. 15, n. 4, p. 659-664, 2009.

CHAU, N. G. et al. A phase II study of sunitinib in recurrent and/or metastatic adenoid cystic carcinoma (ACC) of the salivary glands: current progress and challenges in evaluating molecularly targeted agents in ACC. **Annals of oncology**, v. 23, n. 6, p. 1562-1570, 2011.

CHAE, Y. K. et al. Adenoid cystic carcinoma: current therapy and potential therapeutic advances based on genomic profiling. **Oncotarget**, v. 6, n. 35, p. 37117, 2015.

CHEN, J-C; GNEPP, D. R.; BEDROSSIAN, C. WM. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: an immunohistochemical analysis. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 65, n. 3, p. 316-326, 1988.

CHEN, A. M. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated by surgery with or without postoperative radiation therapy: prognostic features of recurrence. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 66, n. 1, p. 152-159, 2006.

CHEN, W. et al. Notch-1 knockdown suppresses proliferation, migration and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma cells. **Journal of translational medicine**, v. 13, n. 1, p. 167, 2015.

CHO, E. K. et al. Array-based comparative genomic hybridization and copy number variation in cancer research. **Cytogenetic and genome research**, v. 115, n. 3-4, p. 262-272, 2006.

CLAPIER, C. R. et al. Mechanisms of action and regulation of ATP-dependent chromatin-remodelling complexes. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 18, n. 7, p. 407, 2017.

COCA-PELAZ, A. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—An update. **Oral oncology**, v. 51, n. 7, p. 652-661, 2015.

CORDESMEYER, R. et al. Clinical prognostic factors of salivary adenoid cystic carcinoma: a single-center analysis of 61 patients. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 11, p. 1784-1787, 2017

COSMIC - Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. 2019. Cancer browser. Disponível em: <<https://cancer.sanger.ac.uk/cosmic/browse/tissue?hn=carcinom>

a&in=t&sh=adenoid_cystic_carcinoma&sn=salivary_gland&ss=NS>. Acesso em: 01 de Nov. de 2019.

COSTA, A. F. et al. Analysis of MYB oncogene in transformed adenoid cystic carcinomas reveals distinct pathways of tumor progression. **Laboratory investigation**, v. 94, n. 6, p. 692, 2014.

COWELL, J. K. et al. Molecular characterization of the t (3; 9) associated with immortalization in the MCF10A cell line. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 163, n. 1, p. 23-29, 2005.

DAA, T. et al. Aberrant methylation in promoter regions of cyclin-dependent kinase inhibitor genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. **Apmis**, v. 116, n. 1, p. 21-26, 2008.

DEAN, L. Trastuzumab (herceptin) therapy and ERBB2 (HER2) genotype. **Medical Genetics Summaries [Internet]**, 2015.

DE PAZ, J. F. et al. aCGH-MAS: Analysis of aCGH by means of Multiagent System. **BioMed research international**, v. 2015, 2015.

DILLON, P. M. et al. Adenoid cystic carcinoma: a review of recent advances, molecular targets, and clinical trials. **Head & neck**, v. 38, n. 4, p. 620-627, 2016.

DOUGLAS, J. G. et al. Treatment of locally advanced adenoid cystic carcinoma of the head and neck with neutron radiotherapy. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 46, n. 3, p. 551-557, 2000.

DORI, S. et al. HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 31, n. 8, p. 463-467, 2002.

DRIER, Y. et al. An oncogenic MYB feedback loop drives alternate cell fates in adenoid cystic carcinoma. **Nature genetics**, v. 48, n. 3, p. 265, 2016

EDELMANN, L.; HIRSCHHORN, K. Clinical utility of array CGH for the detection of chromosomal imbalances associated with mental retardation and multiple congenital anomalies. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1151, n. 1, p. 157-166, 2009.

ENGELMAN, J. A. et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. **science**, v. 316, n. 5827, p. 1039-1043, 2007.

EVEN, C. et al. Notch pathway inhibition with LY3039478 in adenoid cystic carcinoma (ACC). **Journal of clinical oncology**. 2017.

FANCIULLI, M.; PETRETTO, E.; AITMAN, T. J. Gene copy number variation and common human disease. **Clinical genetics**, v. 77, n. 3, p. 201-213, 2010.

FAROOQI, A. A. & SIDDIK, Z. H. Platelet-derived growth factor (PDGF) signalling in cancer: rapidly emerging signalling landscape. **Cell biochemistry and function**, v. 33, n. 5, p. 257-265, 2015.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: Mechanisms and novel therapeutic targets. **In: Seminars in cancer biology**. Academic Press, 2015. p. S25-S54.

FERRAROTTO, R. et al. Activating NOTCH1 mutations define a distinct subgroup of patients with adenoid cystic carcinoma who have poor prognosis, propensity to bone and liver metastasis, and potential responsiveness to Notch1 inhibitors. **Journal of Clinical Oncology**, v. 35, n. 3, p. 352, 2017.

FREEDMAN, M. L. et al. Admixture mapping identifies 8q24 as a prostate cancer risk locus in African-American men. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 103, n. 38, p. 14068-14073, 2006.

FRESHNEY, R. I. Culture of animal cells: a manual of basic technique and specialized applications. New Jersey: John Wiley & Sons, 2015.

FUJII, K. et al. MYB, MYBL 1, MYBL 2 and NFIB gene alterations and MYC overexpression in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Histopathology**, v. 71, n. 5, p. 823-834, 2017.

FUKASAWA, K. Centrosome amplification, chromosome instability and cancer development. **Cancer letters**, v. 230, n. 1, p. 6-19, 2005.

FURUYA, T. et al. CNVs associated with susceptibility to cancers: A mini-review. **Journal of Cancer Therapy**, v. 6, n. 05, p. 413, 2015.

GERAGHTY, R. J. et al. Guidelines for the use of cell lines in biomedical research. **British journal of cancer**, v. 111, n. 6, p. 1021, 2014.

GIAM, M.; RANCATI, G. Aneuploidy and chromosomal instability in cancer: a jackpot to chaos. **Cell division**, v. 10, n. 1, p. 3, 2015.

GREAVES, M.; MALEY, C. C. Clonal evolution in cancer. **Nature**, v. 481, n. 7381, p. 306, 2012.

GOMEZ, D. R. et al. Outcomes and prognostic variables in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a recent experience. **International Journal of Radiation Oncology* Biology* Physics**, v. 70, n. 5, p. 1365-1372, 2008.

GONCALVES, P. H. et al. A phase 2 study of vorinostat in locally advanced, recurrent, or metastatic adenoid cystic carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 20, p. 32918, 2017.

GONDIVKAR, S. M. et al. Adenoid cystic carcinoma: a rare clinical entity and literature review. **Oral oncology**, v. 47, n. 4, p. 231-236, 2011.

HAIMAN, C. A. et al. Genome-wide association study of prostate cancer in men of African ancestry identifies a susceptibility locus at 17q21. **Nature genetics**, v. 43, n. 6, p. 570, 2011.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

- HILLMAN, S. C. et al. Additional information from array comparative genomic hybridization technology over conventional karyotyping in prenatal diagnosis: a systematic review and meta-analysis. **Ultrasound in Obstetrics & Gynecology**, v. 37, n. 1, p. 6-14, 2011.
- HO, A. L. et al. Phase II study of regorafenib in progressive, recurrent/metastatic adenoid cystic carcinoma. 2016.
- HO, A. L. et al. A phase II study of axitinib (AG-013736) in patients with incurable adenoid cystic carcinoma. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 10, p. 1902-1908, 2016.
- HO, A. S. et al. The mutational landscape of adenoid cystic carcinoma. **Nature genetics**, v. 45, n. 7, p. 791, 2013.
- HO, A. S. et al. Genetic hallmarks of recurrent/metastatic adenoid cystic carcinoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 129, n. 10, 2019.
- HO-YEN, C. M.; JONES, J. L.; KERMORGANT, S. The clinical and functional significance of c-Met in breast cancer: a review. **Breast Cancer Research**, v. 17, n. 1, p. 52, 2015.
- HUO, Z. et al. Molecular genetic studies on EGFR, KRAS, BRAF, ALK, PIK3CA, PDGFRA, and DDR2 in primary pulmonary adenoid cystic carcinoma. **Diagnostic pathology**, v. 10, n. 1, p. 161, 2015.
- ISLAM, F. et al. Cancer Stem Cells: Role in Tumor Progression and Treatment Resistance. **In: Oncogenomics. Academic Press**, 2019. p. 77-87.
- JAGIELSKA, B. et al. Advanced adenoid cystic carcinoma (ACC) is featured by SWI/SNF chromatin remodeling complex aberrations. **Journal of cancer research and clinical oncology**, v. 145, n. 1, p. 201-211, 2019.
- JASO, J.; MALHOTRA, R. Adenoid cystic carcinoma. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 4, p. 511-515, 2011.
- KALLIONIEMI, A. CGH microarrays and cancer. **Current opinion in biotechnology**, v. 19, n. 1, p. 36-40, 2008.
- KAPALCZYŃSKA, M. et al. 2D and 3D cell cultures—a comparison of different types of cancer cell cultures. **Archives of medical science: AMS**, v. 14, n. 4, p. 910, 2018.
- KOKEMUELLER, H. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—a 20 years experience. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 33, n. 1, p. 25-31, 2004.
- KRISHNAMURTI, U.; SILVERMAN, J. F. HER2 in breast cancer: a review and update. **Advances in anatomic pathology**, v. 21, n. 2, p. 100-107, 2014.
- LARSEN, S. R. et al. Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 8, p. 598-602, 2012.

- LAW, M. E. et al. Cyclin-dependent kinase inhibitors as anticancer therapeutics. **Molecular pharmacology**, v. 88, n. 5, p. 846-852, 2015.
- LEAL, M. F. et al. Establishment and conventional cytogenetic characterization of three gastric cancer cell lines. **Cancer genetics and cytogenetics**, v. 195, n. 1, p. 85-91, 2009.
- LI, J.; EL-NAGGAR, A.; MAO, L. Promoter methylation of p16INK4a, RASSF1A, and DAPK is frequent in salivary adenoid cystic carcinoma. **Cancer**, v. 104, n. 4, p. 771-776, 2005.
- LI, J. et al. Development and characterization of salivary adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral oncology**, v. 50, n. 10, p. 991-999, 2014.
- LIU, Y. et al. Deletions linked to TP53 loss drive cancer through p53-independent mechanisms. **Nature**, v. 531, n. 7595, p. 471, 2016.
- LIU, X. et al. Reassessing the potential of Myb-targeted anti-cancer therapy. **Journal of Cancer**, v. 9, n. 7, p. 1259, 2018.
- LIU, X. et al. The value of MYB as a prognostic marker for adenoid cystic carcinoma: Meta-analysis. **Head & neck**, v. 41, n. 5, p. 1517-1524, 2019.
- LOCATI, L. D. et al. Cetuximab in recurrent and/or metastatic salivary gland carcinomas: a phase II study. **Oral oncology**, v. 45, n. 7, p. 574-578, 2009.
- MAGADUM, S. et al. Gene duplication as a major force in evolution. **Journal of genetics**, v. 92, n. 1, p. 155-161, 2013.
- MALHOTRA, D.; SEBAT, J. CNVs: harbingers of a rare variant revolution in psychiatric genetics. **Cell**, v. 148, n. 6, p. 1223-1241, 2012.
- MARTELOTTO, L. G. et al. Genomic landscape of adenoid cystic carcinoma of the breast. **The Journal of pathology**, v. 237, n. 2, p. 179-189, 2015.
- MASTERS, J. RW. Human cancer cell lines: fact and fantasy. **Nature reviews Molecular cell biology**, v. 1, n. 3, p. 233, 2000.
- MATALLANAS, D. et al. Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. **Genes & cancer**, v. 2, n. 3, p. 232-260, 2011.
- MATSUBA, H. M. et al. Adenoid cystic salivary gland carcinoma: a histopathologic review of treatment failure patterns. **Cancer**, v. 57, n. 3, p. 519-524, 1986.
- MENDENHALL, W. M. et al. Radiotherapy alone or combined with surgery for adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 26, n. 2shen, p. 154-162, 2004.
- MIRABELLI, P.; COPPOLA, L.; SALVATORE, M. Cancer Cell Lines Are Useful Model Systems for Medical Research. **Cancers**, v. 11, n. 8, p. 1098, 2019.
- MITANI, Y. 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. **Clinical cancer research**, v. 17, n. 22, p. 7003-7014, 2011.

MITANI, Y. et al. Comprehensive analysis of the MYB-NFIB gene fusion in salivary adenoid cystic carcinoma: incidence, variability and clinicopathological significance. **Clinical cancer research**, p. clincanres. 0463.2010, 2012.

MITANI, Y. et al. Novel MYBL1 gene rearrangements with recurrent MYBL1–NFIB fusions in salivary adenoid cystic carcinomas lacking t (6; 9) translocations. **Clinical cancer research**, v. 22, n. 3, p. 725-733, 2016.

OGA, A. et al. Loss of 6q or 8p23 is associated with the total number of DNA copy number aberrations in adenoid cystic carcinoma. **Oncology reports**, v. 26, n. 6, p. 1393-1398, 2011.

PADMAVATHI, G.; THAKUR, K. K.; KUNNUMAKKARA, A. B. MYB-NFIB Fusion Gene—Hallmark of Adenoid Cystic Carcinoma (ACC). **Fusion Genes And Cancer**, p. 245-251, 2017.

PAPADOPOULOS, Natalia; LENNARTSSON, Johan. The PDGF/PDGFR pathway as a drug target. **Molecular aspects of medicine**, v. 62, p. 75-88, 2018.

PAPASPYROU, G. et al. Chemotherapy and targeted therapy in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review. **Head & neck**, v. 33, n. 6, p. 905-911, 2011.

PARK, H. et al. Phase I dose-escalation study of the mTOR inhibitor sirolimus and the HDAC inhibitor vorinostat in patients with advanced malignancy. **Oncotarget**, v. 7, n. 41, p. 67521, 2016.

PARK, P. J. Experimental design and data analysis for array comparative genomic hybridization. **Cancer investigation**, v. 26, n. 9, p. 923-928, 2008.

PERES C. M., CURI, R. Como cultivar células. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2005.

PERSSON, M. et al. Recurrent fusion of MYB and NFIB transcription factor genes in carcinomas of the breast and head and neck. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, n. 44, p. 18740-18744, 2009.

PERSSON, M. et al. Clinically significant copy number alterations and complex rearrangements of MYB and NFIB in head and neck adenoid cystic carcinoma. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 51, n. 8, p. 805-817, 2012.

PERZIN, K. H.; GULLANE, P.; CLAIRMONT, A. C. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands. A correlation of histologic features and clinical course. **Cancer**, v. 42, n. 1, p. 265-282, 1978.

PETTKE, A. et al. Suberanilohydroxamic acid (vorinostat) synergistically enhances the cytotoxicity of doxorubicin and cisplatin in osteosarcoma cell lines. **Anti-cancer drugs**, v. 27, n. 10, p. 1001-1010, 2016.

- PETRAK, K. Precision medicine and drug targeting: The promise versus reality of target-specific drug delivery. In: Nanostructures for the Engineering of Cells, Tissues and Organs. **William Andrew Publishing**, 2018. p. 155-166.
- PHUCHAREON, J. et al. Genetic profiling reveals cross-contamination and misidentification of 6 adenoid cystic carcinoma cell lines: ACC2, ACC3, ACCM, ACCNS, ACCS and CAC2. **PloS one**, v. 4, n. 6, p. e6040, 2009.
- POLLACK, J. R. Cancer Genomics. In: **The Molecular Basis of Human Cancer**. Humana Press, New York, NY, 2017. p. 43-63.
- RASK-ANDERSEN, M.; ALMÉN, M. S.; SCHIÖTH, H. B. Trends in the exploitation of novel drug targets. **Nature reviews Drug discovery**, v. 10, n. 8, p. 579, 2011.
- RAO, P. H. et al. Deletion of 1p32-p36 is the most frequent genetic change and poor prognostic marker in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Clinical cancer research**, v. 14, n. 16, p. 5181-5187, 2008.
- RAPIDIS, A. D. et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck.: Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. **Oral oncology**, v. 41, n. 3, p. 328-335, 2005.
- RATSCH, S. B. et al. Multiple genetic changes are required for efficient immortalization of different subtypes of normal human mammary epithelial cells. **Radiation research**, v. 155, n. 1, p. 143-150, 2001.
- RETTIG, E. M. et al. MYB rearrangement and clinicopathologic characteristics in head and neck adenoid cystic carcinoma. **The Laryngoscope**, v. 125, n. 9, p. E292-E299, 2015.
- RETTIG, E. M. et al. Whole-genome sequencing of salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Cancer Prevention Research**, v. 9, n. 4, p. 265-274, 2016.
- SANCHEZ-MARTINEZ, C. et al. Cyclin dependent kinase (CDK) inhibitors as anticancer drugs. **Bioorganic & medicinal chemistry letters**, v. 25, n. 17, p. 3420-3435, 2015.
- SANT, D. W. et al. Whole exome sequencing of lacrimal gland adenoid cystic carcinoma. **Investigative ophthalmology & visual science**, v. 58, n. 6, p. BIO240-BIO246, 2017.
- SAVAS, S.; LIU, G. Genetic variations as cancer prognostic markers: review and update. **Human mutation**, v. 30, n. 10, p. 1369-1377, 2009.
- SCHOMBURG, C. et al. Natural sesquiterpene lactones as inhibitors of Myb-dependent gene expression: Structure–activity relationships. **European journal of medicinal chemistry**, v. 63, p. 313-320, 2013.
- SEQUEIROS-SANTIAGO, G. et al. Oncogene amplification pattern in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Oncology reports**, v. 21, n. 5, p. 1215-1222, 2009.

- SHEN, C. et al. Treatment outcomes and prognostic features in adenoid cystic carcinoma originated from the head and neck. **Oral oncology**, v. 48, n. 5, p. 445-449, 2012.
- SHINAWI, M.; CHEUNG, S. W. The array CGH and its clinical applications. **Drug discovery today**, v. 13, n. 17-18, p. 760-770, 2008.
- SHLIEN, A.; MALKIN, D. Copy number variations and cancer. **Genome medicine**, v. 1, n. 6, p. 62, 2009.
- SHLIEN, A.; MALKIN, D. Copy number variations and cancer susceptibility. *Current opinion in oncology*, v. 22, n. 1, p. 55-63, 2010.
- SIGISMUND, S.; AVANZATO, D.; LANZETTI, L. Emerging functions of the EGFR in cancer. **Molecular oncology**, v. 12, n. 1, p. 3-20, 2018.
- SILVERMAN, D. A. et al. Role for postoperative radiation therapy in adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **The Laryngoscope**, v. 114, n. 7, p. 1194-1199, 2004.
- STAAF, J.; BORG, Å. Zoom-in array comparative genomic hybridization (aCGH) to detect germline rearrangements in cancer susceptibility genes. **In: Cancer Susceptibility**. Humana Press, Totowa, NJ, 2010. p. 221-235.
- STALLMACH, I. et al. Loss of heterozygosity at chromosome 6q23–25 correlates with clinical and histologic parameters in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Virchows Archiv**, v. 440, n. 1, p. 77-84, 2002.
- STENMAN, G.; ANDERSSON, M. K.; ANDRÉN, Y. New tricks from an old oncogene: gene fusion and copy number alterations of MYB in human cancer. **Cell Cycle**, v. 9, n. 15, p. 3058-3067, 2010.
- SEETHALA, R. R. et al. Progressive genetic alterations of adenoid cystic carcinoma with high-grade transformation. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 135, n. 1, p. 123-130, 2011.
- STEPHENS, P. J. et al. Whole exome sequencing of adenoid cystic carcinoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 123, n. 7, p. 2965-2968, 2013.
- SUZUKI, K.; CHENG, J.; WATANABE, Y. Hepatocyte growth factor and c-Met (HGF/c-Met) in adenoid cystic carcinoma of the human salivary gland. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 32, n. 2, p. 84-89, 2003.
- THAKKAR, J. P. et al. Epidemiologic and molecular prognostic review of glioblastoma. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 23, n. 10, p. 1985-1996, 2014.
- TIAN, Z. et al. Differences in MYB expression and gene abnormalities further confirm that salivary cribriform basal cell tumors and adenoid cystic carcinoma are two distinct tumor entities. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 45, n. 9, p. 698-703, 2016.

TOMASETTI, C.; LI, L.; VOGELSTEIN, B. Stem cell divisions, somatic mutations, cancer etiology, and cancer prevention. **Science**, v. 355, n. 6331, p. 1330-1334, 2017.

VAN BEERS, E. H.; NEDERLOF, P. M. Array-CGH and breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 3, p. 210, 2006.

VAN WEERT, S. et al. Differences in patterns of survival in metastatic adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **Head & neck**, v. 39, n. 3, p. 456-463, 2017.

VEGA-BENEDETTI, A. F. et al. PLAGL1: an important player in diverse pathological processes. **Journal of applied genetics**, v. 58, n. 1, p. 71-78, 2017.

VÉKONY, H. et al. DNA copy number gains at loci of growth factors and their receptors in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Clinical cancer research**, v. 13, n. 11, p. 3133-3139, 2007.

WA'EL E-R et al. Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12-q13 in adenoid cystic carcinoma. **Neoplasia (New York, NY)**, v. 3, n. 3, p. 173, 2001.

WANG, Y. et al. Intrinsic disorder mediates the diverse regulatory functions of the Cdk inhibitor p21. **Nature chemical biology**, v. 7, n. 4, p. 214, 2011.

WANG, X. et al. Clinical Significance of PTEN Deletion, Mutation, and Loss of PTEN Expression in De Novo Diffuse Large B-Cell Lymphoma. **Neoplasia**, v. 20, n. 6, p. 574-593, 2018.

WARNER, K. A. et al. UM-HACC-2A: MYB-NFIB fusion-positive human adenoid cystic carcinoma cell line. **Oral oncology**, v. 87, p. 21-28, 2018.

WEAVER, B. A.; CLEVELAND, D. W. The role of aneuploidy in promoting and suppressing tumors. **The Journal of cell biology**, v. 185, n. 6, p. 935-937, 2009.

WYSOCKI, P. T. et al. Adenoid cystic carcinoma: emerging role of translocations and gene fusions. **Oncotarget**, v. 7, n. 40, p. 66239, 2016.

YUAN, X. et al. Notch signaling: an emerging therapeutic target for cancer treatment. **Cancer letters**, v. 369, n. 1, p. 20-27, 2015.

YOO, C. et al. Vorinostat in combination with capecitabine plus cisplatin as a first-line chemotherapy for patients with metastatic or unresectable gastric cancer: phase II study and biomarker analysis. **British journal of cancer**, v. 114, n. 11, p. 1185, 2016.

ZACK, T. I. et al. Pan-cancer patterns of somatic copy number alteration. **Nature genetics**, v. 45, n. 10, p. 1134, 2013.

ZHANG, Y. et al. Function of the c-Met receptor tyrosine kinase in carcinogenesis and associated therapeutic opportunities. **Molecular cancer**, v. 17, n. 1, p. 45, 2018.

