

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Programa de Pós-graduação em Patologia

AMANDA GABRIELLE DE SOUSA

**ESTUDO MOLECULAR DO CARCINOMA EPITELIAL-MIOEPITELIAL DA
GLÂNDULA SALIVAR**

Belo Horizonte

2025

AMANDA GABRIELLE DE SOUSA

**ESTUDO MOLECULAR DO CARCINOMA EPITELIAL-MIOEPITELIAL DA
GLÂNDULA SALIVAR**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Patologia do Instituto de Ciências Biológicas/Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dra. Marina Gonçalves Diniz

**Belo Horizonte
2025**

043

Sousa, Amanda Gabrielle de.

Estudo molecular do carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar [manuscrito] / Amanda Gabrielle de Sousa. – 2025.
62 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Prof. Dra. Marina Gonçalves Diniz.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia.

1. Patologia. 2. Neoplasias das Glândulas Salivares. 3. Proteínas Quinases Ativadas por Mitógeno. 4. Fosfatidilinositol 3-Quinases. I. Diniz, Marina Gonçalves. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 616



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA DA UFMG - ICB/UFMG - SECRETARIA

ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO Nº 509 DE AMANDA GABRIELLE DE SOUSA

Realizou-se, no dia 27 de agosto de 2025, às 14 horas, no formato presencial, na Sala de Reuniões do Departamento de Patologia Geral – ICB/UFMG, Bloco C, 3ª andar, a defesa de Dissertação, intitulada “**Estudo Molecular do Carcinoma Epitelial-Mioepitelial da Glândula Salivar**”, apresentada por **Amanda Gabrielle de Sousa** número de registro 2023705929, graduada no curso de Ciências Biológicas, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em PATOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: **Profa. Dra. Sílvia Ferreira de Sousa**, FAO/UFMG; **Profa. Dra. Carolina Cavalieri Gomes**, ICB/UFMG; **Profa. Dra. Marina Gonçalves Diniz**, ICB/UFMG – **ORIENTADORA**.

A Comissão considerou a Dissertação:

(x) APROVADA

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 27 de agosto de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Marina Gonçalves Diniz, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2025, às 12:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Carolina Cavalieri Gomes, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2025, às 14:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Sílvia Ferreira de Sousa, Professora do Magistério Superior**, em 29/08/2025, às 14:36, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4465809** e o código CRC **0D66BF24**.

Dedico este trabalho à minha irmã Fernanda, cuja força, coragem e fé diante da luta contra o câncer me inspiraram profundamente. Este trabalho é também por você, por tudo o que enfrentamos juntas e por tudo o que ainda construiremos com esperança. Que a ciência, com toda sua luz, continue abrindo caminhos de cura, dignidade e vida.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus, por ter me permitido realizar esse sonho e ter me sustentado todos os dias.

Agradeço aos meus pais, José e Guiomar, à minha irmã Fernanda e aos meus sobrinhos pelo apoio, suporte e encorajamento constantes ao longo da minha trajetória acadêmica. Amo vocês e sei que nada disso seria possível sem vocês.

Ao meu noivo Júnior, não encontro palavras suficientes para expressar minha gratidão. Obrigada por segurar a minha mão, me encorajar e acreditar em mim mesmo nos momentos em que eu duvidava. Eu te amo e sem você teria sido impossível enfrentar esse processo tão desafiador e, ao mesmo tempo, tão enriquecedor

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marina, minha sincera gratidão por toda a orientação, paciência, dedicação e incentivo ao longo desta caminhada. Agradeço não apenas pelos ensinamentos, mas também por todo apoio, oportunidades e confiança. Sua contribuição foi fundamental para a realização deste trabalho e para o meu crescimento acadêmico e pessoal.

Aos professores do Laboratório de Biologia Integrativa, Vanessa Bernardes, Carolina Cavalieri, Renato Santana e Renan Pedra, expressei minha sincera gratidão pelo apoio, colaboração e convivência. Estendo meus agradecimentos a todos os colegas do Laboratório de Biologia Integrativa e do Laboratório de Patologia Molecular da UFMG, pelo apoio, troca de conhecimento e convivência ao longo desta jornada.

Ao professor Ricardo Gomez, agradeço pela valiosa colaboração e apoio durante o desenvolvimento desta pesquisa.

À professora Roberta Chaves e Dra. Monique França, sou grata pela parceria, atenção e contribuição ao longo deste trabalho.

Agradeço aos professores do programa de Pós-graduação em Patologia da UFMG, cujas aulas e orientações contribuíram significativamente para minha formação científica e para o amadurecimento deste trabalho.

Gratidão às minhas parceiras de laboratório Laís, Josi, Flavinha, Ana, Giovanna e Júlia. Caminhar ao lado de vocês foi mais do que um privilégio, foi um presente. Obrigada por cada gesto de apoio, pelas conversas, pela leveza no dia a dia e por fazerem parte dessa caminhada com tanta generosidade e companheirismo. À Josi e à Laís, meu agradecimento mais especial. Vocês foram verdadeiros presentes que a Patho/UFMG me deu. A presença de vocês tornou tudo mais leve e humano. Obrigada por cada momento vivido juntas, pelo apoio incondicional, pelas palavras, pela escuta, pelos aprendizados e pelas risadas compartilhadas. Não tenho

dúvidas de que vocês fizeram toda a diferença nesta jornada. Também agradeço de coração à Ana, pela ajuda nos últimos experimentos que foi essencial para a conclusão deste trabalho. Sua dedicação e parceria foram indispensáveis nesse momento tão importante. Levarei vocês para a vida.

À Ana Paula, agradeço por ter me apresentado mais profundamente o mundo da patologia, por todo o apoio desde a época de Iniciação Científica, pelo aprendizado compartilhado e pela escuta atenta. Sou imensamente grata pela parceria e pela amizade construída ao longo dessa trajetória.

Às amigas que fiz na pós-graduação, Kathy e Serena, registro minha gratidão por ter conhecido vocês, pelos momentos que compartilhamos, pelo apoio nas disciplinas e por todo o aprendizado vivido juntas.

Agradeço a todos que estiveram presentes e me apoiaram de diversas formas durante este período.

Por fim, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro por meio da concessão da bolsa de estudo. Também registro meus agradecimentos às agências de fomento CAPES, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo suporte financeiro e incentivo à pesquisa científica.

Deixo aqui meu mais sincero agradecimento.

“Descobri que existe uma harmonia maravilhosa nas verdades complementares da ciência e da fé. O Deus da Bíblia também é o Deus do genoma.”

Dr. Francis Collins

RESUMO

O carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) é uma neoplasia maligna incomum de baixo grau, acometendo predominantemente a glândula parótida. Possui crescimento lento e baixo potencial metastático e, apesar de infrequente, transformações para padrões de alto grau podem ocorrer, impactando negativamente o prognóstico. Mutações nos genes *HRAS*, *PIK3CA* e *AKT*, foram descritas no CEM. Em conjunto, estas mutações podem estar associadas à ativação da via Ras e das vias a jusante RAF/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR (PI3K), responsáveis por processos como proliferação celular, sobrevivência e progressão tumoral. No entanto, ainda não se sabe qual o impacto destas mutações presentes no CEM na expressão dos genes da via Ras e o papel dessas vias na patobiologia do CEM. Este trabalho teve como objetivo investigar a expressão gênica de componentes da via Ras em amostras de CEM por meio de RT-qPCR, além de realizar análises de enriquecimento funcional e caracterizar as amostras quanto mutações no gene *PIK3CA*. A análise da expressão gênica no CEM (n=8) revelou superexpressão dos genes *FOS* e *JUN*, enquanto *PLD1*, *MAPK9*, *MAP2K3*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* e *VEGFC* apresentaram expressão reduzida comparado ao controle (glândula salivar normal, n=4). A análise funcional indicou enriquecimento principalmente da via de sinalização MAPK. A mutação no éxon 20 (p.H1047R) do gene *PIK3CA* foi analisada em 5 das 8 amostras incluídas na análise de expressão gênica e em 5 amostras adicionais e nenhuma mutação foi encontrada. Esses achados reforçam o papel da via Ras, em especial a via a jusante MAPK, e do fator de transcrição AP-1 (composto por JUN e FOS), no contexto da patologia molecular do CEM. Os resultados podem subsidiar o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas futuras.

Palavras-chave:

Neoplasias das Glândulas Salivares; Carcinoma epitelial-mioepitelial; glândula salivar; MAPK; *PI3KCA*

ABSTRACT

Epithelial-myoepithelial carcinoma (EMC) is an uncommon, low-grade malignant neoplasm, predominantly affecting the parotid gland. It has slow growth and low metastatic potential. Although uncommon, transformation to high-grade patterns can occur, negatively impacting prognosis. Mutations in the *HRAS*, *PIK3CA*, and *AKT* genes have been described in EMC. These mutations may be associated with activation of the Ras pathway and the downstream RAF/MEK/ERK (MAPK) and PI3K/AKT/mTOR (PI3K) pathways, responsible for processes such as cell proliferation, survival, and tumor progression. However, the impact of mutations in EMC on the expression of Ras pathway genes and its canonical and non-canonical downstream pathways, and the Ras pathway role in the pathobiology of EMC, remains unknown. This study aimed to investigate the gene expression of Ras pathway components in EMC samples by RT-qPCR, in addition to performing functional enrichment analyses and characterizing the samples for mutations in the *PIK3CA* gene. Gene expression analysis in EMC (n = 8) revealed overexpression of the genes *FOS* and *JUN*, while *PLD1*, *MAPK9*, *MAP2K3*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* and *VEGFC* showed reduced expression compared to the control (normal salivary gland, n = 4). Functional analysis indicated greater enrichment mainly of the MAPK signaling pathway. The mutation in exon 20 (p.H1047R) of the *PIK3CA* gene was analyzed in 5 of the 8 samples included in RT-qPCR analysis and in 5 additional samples, and no mutation was found. These findings reinforce the role of the Ras pathway, especially the downstream MAPK pathway, and the AP-1 transcription factor (composed of *JUN* and *FOS*) in the molecular context of EMC. These results may inform the development of future diagnostic and therapeutic strategies.

Keywords:

Salivary Gland Neoplasms; Epithelial-myoepithelial carcinoma; Salivary Gland; MAPK; *PIK3CA*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação da localização das glândulas salivares maiores	16
Figura 2 - Fotomicrografia de corte histológico do carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar	17
Figura 3 - Via Ras e seus efetores a jusante Raf/MEK/MAPK e PI3K/Akt.....	20
Figura 4 - Perfil de expressão diferencial de genes associados a vias de sinalização em carcinoma epitelial-mioepitelial: análise geral	37
Figura 5 - Perfil de expressão diferencial de genes associados a vias de sinalização em carcinoma epitelial-mioepitelial: análise filtrada	40
Figura 6 – Representação dos genes diferentemente expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial e suas vias de sinalização celular.....	41
Figura 7 – Análise de Enriquecimento Funcional dos Processos biológicos (<i>Gene Ontology</i>) dos Genes Diferencialmente Expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar	43
Figura 8 - Análise de Enriquecimento Funcional (<i>Gene Ontology</i>) – Funções Moleculares dos Genes Expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar.....	44
Figura 9 – Análise de Enriquecimento Funcional (<i>Gene Ontology</i>) – Componentes Celulares dos Genes Expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar	45
Figura 10 – Top 20 das vias de sinalização KEGG enriquecidas a partir dos genes diferentemente expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar.	47
Figura 11 - Análise do códon 1047 (c.3140A) no éxon 20 do gene <i>PIK3CA</i> por sequenciamento Sanger no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1– Frequência de mutações gênicas descritas no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar.....	18
Tabela 2 – Genes avaliados por RT-qPCR no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar	26
Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a identificação de mutação do gene <i>PIK3CA</i>	33
Tabela 4 – Caracterização das amostras de carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar incluídas no estudo	34
Tabela 5 – Lista de genes diferencialmente expressos com respectivos valores <i>fold change</i> : análise geral	36
Tabela 6 – Flags de baixa qualidade.....	37
Tabela 7 – Lista de genes diferencialmente expressos com respectivos valores <i>fold change</i> : análise filtrada.....	38

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DE LITERATURA	14
2.1. Glândulas salivares	14
2.2. Carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar	16
2.3. Via MAPK	20
2.4. Via PI3K	22
3. OBJETIVOS	23
3.1 OBJETIVOS GERAIS	23
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	23
4. MATERIAL E MÉTODOS	23
4.1. Aspectos éticos	23
4.2. Seleção das amostras	24
4.3. Extração do RNA	24
4.4. Síntese de cDNA	25
4.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR	25
4.6. Análise de Enriquecimento Funcional (DAVID)	32
4.7. Extração de DNA	32
4.8. Sequenciamento de Sanger	33
5. RESULTADOS	34
5.1 Caracterização da Amostra	34
5.2 Expressão gênica	35
5.2.1. Análise geral	35
5.2.2. Análise filtrada	37
5.3. Enriquecimento Funcional (DAVID): análise geral	42
5.3.1 Processos Biológicos:	42
5.3.2. Funções Moleculares	43
5.3.3. Componentes Celulares	44
5.3.4. Análise das Vias de Sinalização (KEGG)	45
5.4 Sequenciamento do gene <i>PIK3CA</i>	47
6. DISCUSSÃO	48
7. CONCLUSÃO	54
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS	54
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	55

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma epitelial-mioepitelial (CEM) das glândulas salivares é uma neoplasia maligna incomum, de baixo grau, correspondendo menos de 2% dos tumores malignos deste sítio (WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2022). Histologicamente, o CEM apresenta estruturas ductais compostas por células epiteliais eosinofílicas envoltas por uma camada de células mioepiteliais claras. Existem outras neoplasias malignas e benignas que se assemelham histologicamente ao CEM, como carcinoma adenoide cístico, adenocarcinoma basocelular e carcinoma mioepitelial, o que pode dificultar um diagnóstico preciso desse tumor (Urano *et al.*, 2019; Nakaguro *et al.*, 2022). Casos raros de transformação para um padrão de alto grau podem ocorrer, estando associados a pior prognóstico (Urano *et al.*, 2019; WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2022). O CEM mostra discreta predileção pelo sexo feminino e acomete, em geral, indivíduos entre a sexta e a sétima década de vida (Nakaguro; Nagao, 2021; WHO Classification of Tumours Editorial Board, 2022; Kumar *et al.* 2025), afetando predominantemente as glândulas parótidas, seguido pelas submandibulares (Seethala; Barnes; Hunt, 2007; Urano *et al.*, 2019).

As principais alterações genéticas descritas no CEM envolvem mutação nos genes *HRAS*, *PIK3CA* e *AKT*. É importante destacar que a mutação em *HRAS* não é observada em neoplasias de glândulas salivares com características histológicas semelhantes às do CEM, como carcinoma adenoide cístico, adenocarcinoma basocelular e carcinoma mioepitelial (Urano *et al.*, 2019). O *HRAS* codifica uma proteína da família RAS, que participam de vias essenciais de sinalização celular. As proteínas desta família (*HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) funcionam como interruptores moleculares intracelulares e, quando mutadas, desencadeiam a superativação da via Ras e seus efetores MAPK e PI3K, ambas fortemente associadas à tumorigênese (Chiosea; Miller; Seethala, 2014; Urano *et al.*, 2019). A *PIK3CA* codifica a subunidade p110 α da PI3K. A mutação de *PIK3CA* e *AKT* resultam na ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR, favorecendo o crescimento celular, a sobrevivência e a proliferação tumoral (De Luca *et al.*, 2012).

No contexto do CEM, mutações ativadoras em *HRAS*, *PIK3CA* e *AKT* podem contribuir para a tumorigênese por meio da hiperativação da via Ras e seus efetores canônicos a jusante: RAF/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR (PI3K), o que poderia promover crescimento celular desregulado, resistência à apoptose e outros processos biológicos relacionados ao câncer

(Yoo; Robinson, 2000; Cuesta; Arévalo-Alameda; Castellano, 2021). A via de sinalização MAPK é ativada por receptores tirosina quinase (RTKs), que, na presença do ligante, sofrem dimerização e autofosforilação, gerando resíduos de tirosina fosforilados que atuam como sítios de ancoragem para proteínas adaptadoras, como Grb2 e SOS. Essa interação resulta na ativação da GTPase Ras por meio da troca de GDP por GTP. A RAS ativada desencadeia uma cascata de fosforilações envolvendo a ativação sequencial das quinases RAF (MAPKKK), MEK1/2 (MAPKK) e ERK1/2 (MAPK). Após a ativação, as proteínas ERK translocam-se para o núcleo, onde fosforilam diversos fatores de transcrição, regulando a expressão de genes ligados à proliferação, diferenciação e crescimento celular (Zhang; Liu, 2002; Dhillon *et al.*, 2007; Cargnello; Roux, 2011; De Luca *et al.*, 2012; Cseh; Doma; Baccarini, 2014). Além disso, a forma ativa de RAS (RAS-GTP) pode interagir com a subunidade p110, promovendo a ativação da PI3K na membrana plasmática, o que leva à geração de PIP3 e ao recrutamento de AKT. Uma vez fosforilada e ativada, a proteína AKT regula processos celulares fundamentais, como crescimento, proliferação, sobrevivência, motilidade e metabolismo (Thorpe; Yuzugullu; Zhao, 2015).

Considerando que mutações oncogênicas nos genes da família RAS desempenham um papel central na ativação das vias de sinalização a jusante MAPK e PI3K, e que o CEM pode apresentar mutações tanto em *HRAS* quanto em *PIK3CA* e *AKT*, compreender a regulação da expressão gênica dos componentes da via Ras pode contribuir significativamente para a compreensão do impacto dessas mutações na patogênese do CEM, assim como para o desenvolvimento de terapias combinadas mais eficazes, bem como para o aprimoramento de estratégias diagnósticas e prognósticas. Diante disso, o presente estudo tem como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados a via Ras em amostras de CEM, por meio da técnica de RT-qPCR, a fim de identificar o perfil molecular dessa neoplasia. O trabalho também tem como objetivo caracterizar as principais mutações presentes no CEM e possíveis correlações com a expressão genica.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Glândulas salivares

As glândulas salivares são glândulas exócrinas compostas por três pares de glândulas salivares maiores, sendo glândula parótida, glândula submandibular e glândula sublingual, das

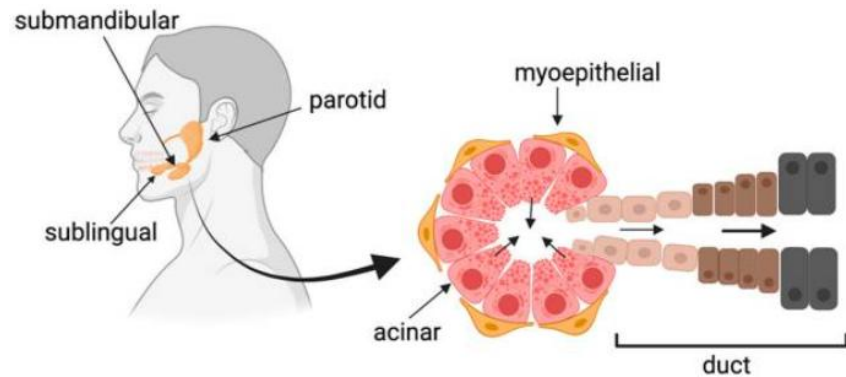
quais a parótida é a maior. Além dessas, existem centenas de glândulas salivares menores espalhadas pela mucosa oral presentes na região labial, bucal, palatina, lingual e retromolar da submucosa oral (Pedersen *et al.*, 2018; Pillai *et al.*, 2025). Elas são responsáveis pela produção da saliva, um fluido aquoso composto por enzimas, eletrólitos, mucinas e outros componentes que atuam na lubrificação da boca, manutenção da homeostase, na digestão inicial e na higiene oral, além de atuar como tamponante para prevenir infecções orais (Piraino *et al.*, 2021). A saliva tem sido considerada um potencial biomarcador biológico que vai desde mudanças em componentes químicos, materiais genéticos (DNA/RNA) e proteínas, até alterações na composição da microbiota. O uso da saliva no auxílio em diagnósticos ou até mesmo substituição por exames mais invasivos é promissor, uma vez que a coleta é relativamente simples, segura e não invasiva (Zhao *et al.*, 2025).

As glândulas salivares maiores compartilham uma arquitetura semelhante, caracterizada por um sistema de ductos ramificados que se abrem na cavidade oral e se conectam a unidades secretoras especializadas que são responsáveis pela produção e secreção de 90% da saliva (Holmberg; Hoffman, 2014; Pedersen *et al.*, 2028; Pillai *et al.*, 2025). O parênquima das GS, é composto por células acinares conectadas a um sistema ductal. Os ácinos, são circuncidadas por células mioepiteliais e produzem um fluido primário isotônico, esse fluido, é conduzido por uma rede de ductos que reabsorvem os íons, transformando a saliva em hipotônica, supersaturada com cálcio e fosfato, esses ductos, se iniciam pelos ductos intercalares (revestidos por epitélio cúbico simples), seguindo para ductos estriado (revestidos por epitélio colunar simples) e finalmente nos ductos excretores (epitélio colunar pseudoestratificado), que lançam o conteúdo na cavidade oral (Emmerson *et al.*, 2018) (Figura 1). As células mioepiteliais, são células epiteliais especializadas e apresentam morfologia estrelada e se dispõem ao redor do epitélio glandular. Elas possuem propriedades contráteis e também contribuem para a liberação da saliva em resposta a estímulos neurais, além de exercerem uma função protetora sobre os componentes epiteliais (Morales; Wang, 2014). O estroma que envolve o epitélio glandular é constituído por células imunológicas, vasos sanguíneos, vasos linfáticos, fibroblastos e terminações nervosas. Estes últimos são fundamentais para a organogênese, a função secretora e a manutenção dos ácinos (Hauser; Hoffman, 2015).

A glândula parótida é constituída predominantemente por ácinos serosos, sendo responsável principalmente pela produção de saliva serosa. Por outro lado, as glândulas submandibulares e sublingual são classificadas como glândulas mistas, pois apresentam tanto ácinos serosos quanto mucosos. No entanto, a glândula submandibular apresenta predomínio

de ácinos serosos, com menor proporção de células mucosas, enquanto a glândula sublingual é composta majoritariamente por ácinos mucosos (Holmberg; Hoffman 2014).

Figura 1 - Representação da localização das glândulas salivares maiores



Fonte: Piraino (2021)

Legenda: Localização anatômica e estrutura funcional das glândulas salivares maiores. Estão representadas a localização das glândulas parótida, submandibular e sublingual, além da organização histológica da unidade secretora, composta por ácinos (regiões produtoras de saliva), células mioepiteliais e o sistema de ductos (que conduz a saliva até a cavidade oral).

2.2. Carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar

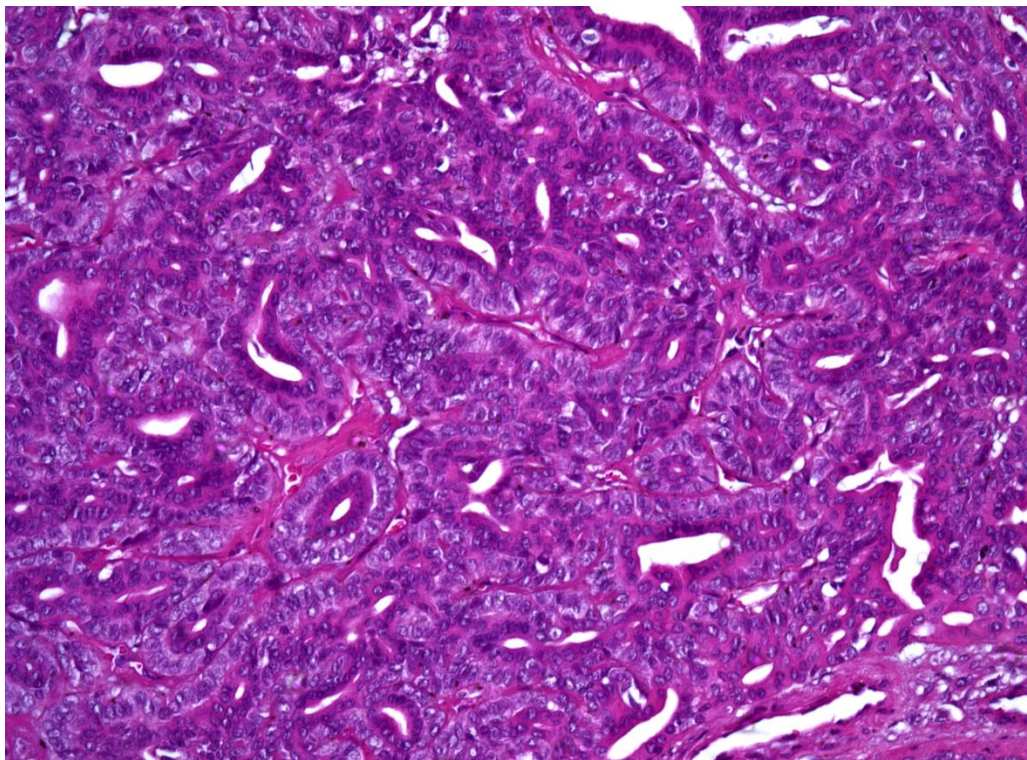
O CEM é um tumor incomum das glândulas salivares, classificado como neoplasia maligna de baixo grau (Urano *et al.*, 2019), porém, casos raros de transformação para um padrão de alto grau podem ocorrer, estando associados a pior prognóstico (Nakaguro *et al.*, 2021). Essa neoplasia é incomum e corresponde a menos de 2% de todos os tumores malignos de glândulas salivares (Urano *et al.*, 2019; Okuyama *et al.*, 2021), a localização mais acometida dessa são as glândulas parótidas, embora casos também sejam descritos nas glândulas submandibulares, glândulas salivares menores (Seethala *et al.*, 2007; Okuyama *et al.*, 2021; Han; Pan, 2024). O CEM acomete principalmente adultos de meia-idade e idosos, com discreto predomínio no sexo feminino (Okuyama *et al.*, 2021; Han; Pan, 2024).

Clinicamente, esse tipo de carcinoma costuma se manifestar como uma massa de crescimento lento e indolor (Wang *et al.*, 2020). As taxas de recorrência variam entre 30% e 50%, podendo haver metástases em linfonodos regionais, embora a ocorrência de metástases à distância seja incomum e uma alta taxa de sobrevida (Vázquez *et al.*, 2015; Wang *et al.*,

2020; Kalmegh *et al.*, 2023). O principal tratamento é a excisão cirúrgica com margens livres (Wockner *et al.*, 2023).

Histologicamente, o CEM apresenta uma arquitetura tubular, composta por dois tipos celulares: células epiteliais ductais internas eosinofílicas, formando a luz dos túbulos e células mioepiteliais externas, com citoplasma claro (Urano *et al.*, 2019; Okuyama *et al.*, 2021; Nakaguro *et al.*, 2021) (Figura 2). As células mioepiteliais, são geralmente positivas para actina de músculo liso (SMA) e pancitoqueratina (pan-CK AE1/AE3), enquanto as células epiteliais luminais são positivas para Citoqueratina 7 (Seethala *et al.*, 2007; Nakaguro *et al.*, 2021). Existem outras neoplasias benignas e malignas que exibem células bifásicas, com células mioepiteliais claras se assemelhando ao CEM como como carcinoma adenoide cístico, adenocarcinoma basocelular e carcinoma mioepitelial, o que dificulta o seu diagnóstico preciso (Urano *et al.*, 2019; Nakaguro *et al.*, 2021).

Figura 2 - Fotomicrografia de corte histológico do carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar



Fonte – Cortesia Prof. Jean Nunes

Observa-se células ductais, com diferencial epitelial, envolvidas por células mioepiteliais

Diversos estudos já descreveram alterações moleculares recorrentes no CEM (Tabela 1), especialmente em genes associados à via Ras e MAPK, como *HRAS*, bem como genes ligados à via PI3K/AKT, como os genes *PIK3CA* e *AKT*. A Tabela 1 resume as principais mutações já identificadas em casos de CEM, com suas respectivas frequências e referências. As principais alterações genéticas descritas são mutações no gene *HRAS*, *PIK3CA* e *AKT*, sendo a mutação *HRAS* p.Q61R a mais prevalente (Tabela 1). O *HRAS* codifica uma das proteínas pertencentes à família RAS, que participam de importantes vias de sinalização celular. As proteínas da família RAS (*HRAS*, *KRAS* e *NRAS*) atuam como interruptores moleculares intracelulares e tem como principais vias canônicas jusante RAF/MEK/ERK (MAPK) e PI3K/AKT/mTOR (PI3K) (Figura 3), ambas fortemente envolvidas na tumorigênese (Urano *et al.*, 2019). Mutações em *PIK3CA* (que codifica a subunidade p110a da PI3K) e *AKT* levam à ativação constitutiva da via PI3K/AKT/mTOR, promovendo crescimento celular, sobrevivência e proliferação tumoral (De Luca *et al.*, 2012; Urano *et al.*, 2019).

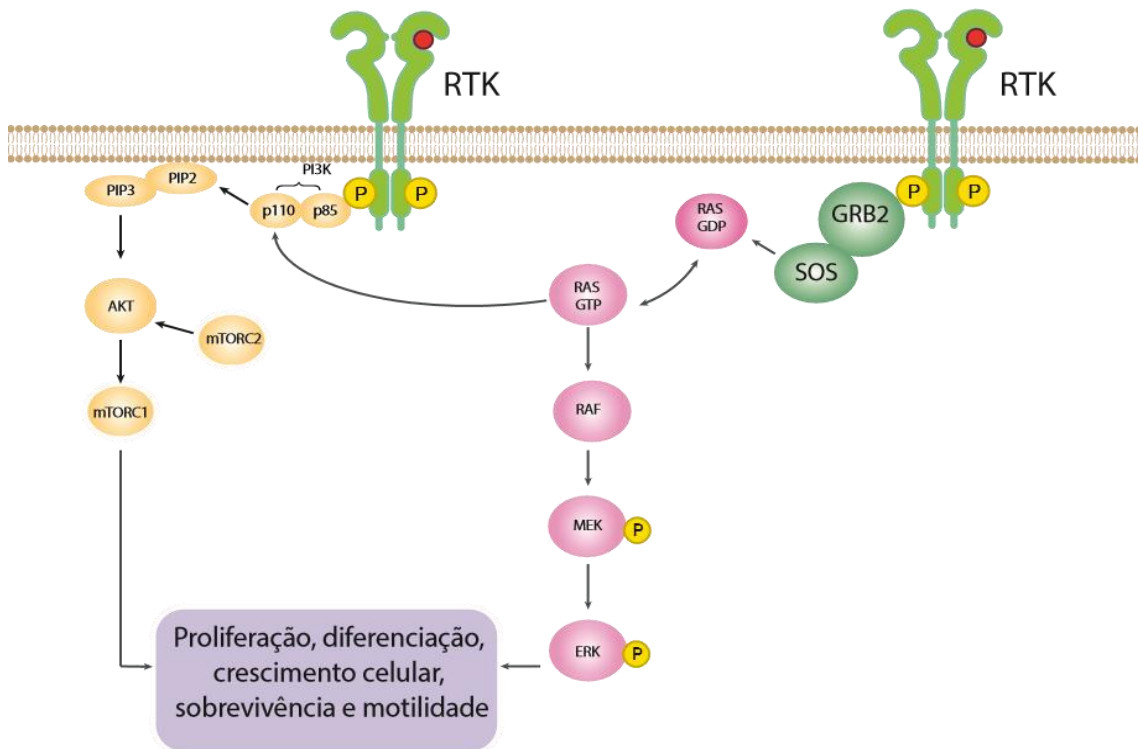
Tabela 1– Frequência de mutações gênicas descritas no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar

Genes	Mutação	Estudo	
<i>HRAS</i>	Éxon 2 e 3	p.G13R	
		p.Q61R	Urano <i>et al.</i> , 2019; Nakaguro <i>et al.</i> , 2021; Grunewald <i>et al.</i> , 2015; Chiosea <i>et al.</i> , 2013
		p.Q61K	
<i>PIK3CA</i>	Éxon 9 e 20	p.Q61(STOP)	Urano <i>et al.</i> , 2019; Grunewald <i>et al.</i> , 2015
		p.E542K	
		p.E545K	
		p.H1047L	
<i>AKT1</i>	Éxon 2 e 4	p.1047R	Urano <i>et al.</i> , 2019; Grunewald <i>et al.</i> , 2015
		p.E17G	
<i>BRAF</i>	Éxon 15	p.E17K	Urano <i>et al.</i> , 2019
		p.V600E	

<i>CTNNB1</i>	Éxon 3	p.I35T	Grunewald et al., 2015
<i>MSH3</i>	Éxon 7	p.K383fs	França <i>et al.</i> , 2025
<i>KRAS</i>	Éxon 2	p.G12D	Fonseca <i>et al.</i> , 2016
<i>NRAS</i>	Éxon 2	p.G12D	Fonseca <i>et al.</i> , 2016

A tabela apresenta os genes mutados e os respectivos autores dos estudos. Esses dados foram obtidos por diferentes metodologias de sequenciamento em coortes variadas.

Figura 3 - Via Ras e seus efetores a jusante Raf/MEK/MAPK e PI3K/Akt



Fonte: Autoria própria

A ligação de ligantes extracelulares aos receptores tirosina-quinase (RTKs) leva à sua autofosforilação, promovendo o recrutamento de proteínas adaptadoras, como GRB2 e SOS, que ativam a proteína RAS (forma GTP). RAS então inicia a cascata de sinalização MAPK, ativando sequencialmente as quinases RAF, MEK e ERK, paralelamente, RAS também ativa a via PI3K através da subunidade p110. Simultaneamente, os RTKs ativam a via PI3K/AKT/mTOR por meio da fosforilação de PI3K, que converte PIP2 em PIP3, permitindo a ativação de AKT e seus alvos, como o complexo mTORC1. Ambas as vias cooperam na regulação do crescimento celular, motilidade e resistência à apoptose.

2.3. Via MAPK

A via MAPK (via das proteínas quinases ativadas por mitógenos) é uma das principais rotas de sinalização intracelular envolvidas na regulação de processos biológicos fundamentais, como proliferação, diferenciação, sobrevivência celular, apoptose e resposta ao estresse (Cargnello; Roux, 2011; Chakraborty *et al.*, 2023). Essa cascata é organizada em três níveis principais: uma MAPKKK (quinase quinase de MAPK) ativa uma MAPKK (quinase de MAPK), que por sua vez ativa uma MAPK terminal. Cada ativação ocorre por fosforilação sequencial, propagando e amplificando o sinal a partir da membrana celular até o núcleo (Cargnello; Roux, 2011; Yue; López, 2020). A via canônica MAPK é iniciada geralmente por fatores de crescimento, hormônios e quimiocinas, que se ligam a receptores tirosina-quinase (RTKs) (De Luca *et al.*, 2012). Essa ativação leva à interação de proteínas adaptadoras, como

GRB2 e SOS, com a proteína RAS, promovendo sua ativação. A RAS ativa, ligada ao GTP, recruta a quinase RAF, que fosforila MEK1/2, que por sua vez, ativam as proteínas ERK1/2 (Figura 3). As ERKs ativadas translocam-se para o núcleo e regulam a expressão gênica por meio da fosforilação de diversos fatores de transcrição, como c-FOS e c-JUN, além de proteínas envolvidas no ciclo celular, como a ciclina D1. Esse eixo RAS–RAF–MEK–ERK1/2 é fortemente associado à proliferação celular e ao crescimento tumoral em diversos tipos de câncer (Cargnello; Roux, 2011; Lavoie; Gagnon; Therrien, 2020; Chakraborty *et al.*, 2023).

Além dessa via clássica, outras vias MAPK também exercem funções importantes. A via JNK (Jun N-terminal kinase), composta pelas proteínas JNK1, JNK2 e JNK3, é ativada predominantemente por estresse celular e os alvos principais incluem os fatores c-JUN e ATF2. A ativação da via JNK está relacionada à indução de apoptose e proliferação celular (Cargnello; Roux, 2011). A via p38 MAPK é ativada por estresses oxidativos, citocinas inflamatórias (como TNF- α e IL-1) e agentes ambientais. Suas isoformas (p38 α , p38 β , p38 γ e p38 δ) são ativadas principalmente pelas MAP2Ks MKK3 e MKK6 e participam da regulação da resposta inflamatória, proliferação celular e sobrevivência (Cuadrado; Nebreda, 2010; Cargnello; Roux, 2011). Outras MAPKs menos estudadas, mas igualmente importantes, incluem a via ERK5 (MAPK7), que é ativada por estímulos como fatores de crescimento e estresse oxidativo, por meio da quinase MEK5, e está associada à sobrevivência celular e proliferação celular. As MAPKs atípicas, como ERK3 (MAPK6) e ERK4 (MAPK4), apresentam características estruturais distintas e vias de ativação menos compreendidas. ERK3 e ERK4 atuam principalmente na regulação da quinase MK5, e têm sido associadas a processos de diferenciação, progressão e proliferação celular (Cargnello; Roux, 2011).

A mutação do gene *HRAS*, especialmente no códon 61 (Q61R), tem papel central na patogênese do CEM das glândulas salivares. Estudos demonstram que mutações no *HRAS* estão presentes em aproximadamente 65–83% dessa neoplasia (Urano *et al.*, 2019; Nakaguro *et al.* 2021), mutação nesse gene não foi identificada em neoplasias de glândulas salivares com características histológicas semelhantes às do CEM, como adenoma pleomórfico, carcinoma adenoide cístico, adenocarcinoma basocelular e carcinoma mioepitelial. Essas alterações são particularmente restritas aos CEM. A mutação *HRAS* pode ativar constitutivamente a via MAPK e PI3K, podendo promover a oncogênese (Urano *et al.*, 2019). Essas mutações muitas vezes ocorrem junto com alterações em *PIK3CA* e/ou *AKT1*, o que pode indicar uma interação entre vias oncogênicas que influenciam o comportamento da neoplasia (Urano *et al.*, 2019).

2.4. Via PI3K

A via PI3K (via de sinalização do fosfoinosítídeo 3-quinase) é uma das principais vias de sinalização intracelular envolvida em processos de crescimento, sobrevivência, metabolismo e migração celular, sendo fundamental no contexto do câncer (Fruman *et al.*, 2017; Gonçalves *et al.*, 2018). As PI3Ks são divididas em três classes (I, II e III) com base na preferência por substratos. No entanto, apenas as PI3Ks da classe IA estão associadas ao desenvolvimento do câncer em humanos (De Luca *et al.*, 2012; Fruman *et al.*, 2017). A PI3K de classe I, composta por uma subunidade catalítica (p110 α , p110 β ou p110 δ) e uma subunidade regulatória (p85 α , p55 α , p50 α , p85 β ou p55 γ) (De Luca *et al.*, 2012). A ativação dessa via ocorre através da ligação de fatores de crescimento a receptores tirosina quinase (RTKs). As subunidades regulatórias da PI3K reconhecem resíduos de tirosina fosforilada nos RTKs e recrutam a subunidade catalítica para a membrana plasmática, onde ocorre a fosforilação do fosfatidilinositol 4,5-bifosfato (PIP2), gerando o fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3). Este segundo mensageiro lipídico recruta proteínas como AKT e PDK1. A AKT é então ativada por fosforilação em dois sítios-chave (Thr308 por PDK1 e Ser473 por mTORC2), passando a regular diversas proteínas envolvidas em sobrevivência celular, crescimento, metabolismo e proliferação (Vasan; Toska; Scaltriti, 2019; Yang *et al.*, 2019). A fosfatase PTEN atua como reguladora negativa dessa via, convertendo PIP3 de volta em PIP2 e limitando a ativação de AKT, sendo sua perda funcional associada a diversas neoplasias (Hoxhaj; Manning, 2019). Além disso, a forma ativa de RAS (RAS-GTP) pode interagir com a subunidade p110, promovendo a ativação da PI3K na membrana plasmática (Figura 3) (Thorpe; Yuzugullu Zhao, 2015).

O gene *PIK3CA*, que codifica a subunidade catalítica p110 α , está frequentemente mutado em diversos tipos de neoplasias malignas como em câncer de mama, endométrio, colorretal, trato urinário e ovário (De Luca *et al.*, 2012). Essas mutações resultam na ativação constitutiva da via PI3K, favorecendo a proliferação, sobrevivência, migração, invasão, angiogênese e resistência a tratamentos (VanLandingham *et al.*, 2023; Wang *et al.*, 2024) e ocorrem predominantemente em hotspots localizados nos exons 9 (E542K, E545K) e 20 (H1047R, H1047L) (De Luca *et al.*, 2012; VanLandingham *et al.*, 2023).

No estudo realizado por Urano e colaboradores (2019), foi identificado mutações no gene *PIK3CA* no gene *AKT* em 20,7% e 6,5% dos casos de CEM, respectivamente, indicando uma participação relevante dessa via na patogênese tumoral. Essas mutações foram frequentemente observadas em associação com alterações em *HRAS*, sugerindo uma possível

cooperação oncogênica entre as vias PI3K-AKT e MAPK. Além disso, a identificação dessas mutações pode auxiliar na diferenciação diagnóstica entre essa neoplasia e outras neoplasias morfológicamente semelhantes, já que a mutação de *HRAS* e *PIK3CA* parece ser exclusiva do CEN (Urano *et al.*, 2019). A mutação nestes genes pode representar um marcador molecular de relevância diagnóstica e potencial alvo terapêutico.

Considerando que mutações oncogênicas em genes da via Ras ocorrem com elevada frequência no CEM, e que diferentes vias a jusante podem ser ativadas a partir dessas alterações, a elucidação dos mecanismos que regulam a expressão dos genes da via Ras — incluindo aqueles pertencentes às vias canônicas e não canônicas a jusante — pode contribuir significativamente para o entendimento dos processos moleculares subjacentes à patobiologia do CEM. Esse conhecimento poderá abrir novas perspectivas para o desenvolvimento de terapias combinadas mais eficazes, além de aprimorar estratégias diagnósticas e prognósticas.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar o papel da via Ras na patobiologia do carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os níveis de expressão de genes da via Ras no carcinoma epitelial-mioepitelial e comparar com glândula salivar normal por meio da RT-qPCR.
- Realizar análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial.
- Avaliar a presença de mutações no gene *PIK3CA* nas amostras de carcinoma epitelial-mioepitelial utilizando o sequenciamento de Sanger.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Aspectos éticos

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o número 6.853.798 e encontra-se registrado na Plataforma Brasil, sob a identificação CAAE - 79389124.2.0000.5149. Os materiais fixados em formol e incluídos em parafina, foram cedidos pelo Laboratório de Patologia Buco-maxilo-

facial da FO/UFGM e foram utilizados juntamente com os dados clínicos extraídos das fichas clínicas que acompanham os materiais. Foram coletadas informações clínico-patológica de idade, sexo, localização do tumor, tamanho do tumor, invasão vascular e invasão perineural.

4.2. Seleção das amostras

Este é um estudo retrospectivo que incluiu casos de CEM de glândula salivar humana. Em razão da baixa ocorrência observada, adotou-se a amostragem por conveniência como estratégia metodológica. As amostras de CEM e de glândula salivar normal utilizadas foram fixadas em formol e incluídas em parafina. Foram selecionadas 13 amostras de CEM e 12 amostras de glândula salivar normal como controle. As glândulas salivares normais utilizadas como grupo controle foram obtidas de amostras cirúrgicas de mucocelos bucais sem sinais de inflamação. As áreas correspondentes à glândula salivar normal foram submetidas à microdissecção manual. A mucocelo foi escolhida como controle por se tratar de uma lesão benigna que acomete a mucosa oral, região onde se localizam as glândulas salivares menores. Essa condição caracteriza-se pelo aumento de volume e formação de nódulos únicos, geralmente decorrentes de trauma mecânico nos ductos excretores das glândulas salivares, o que pode resultar em ruptura ductal e extravasamento de mucina. O tratamento indicado é a excisão cirúrgica. Foram incluídas somente amostras com diagnóstico confirmado de CEM e foram excluídos casos com dados clínicos incompletos nas fichas de biópsia e prontuários analisados e casos cujos materiais tenham quantidades escassas ou insuficientes para serem utilizados. A revisão dos diagnósticos foi realizada por um patologista bucal experiente.

4.3. Extração do RNA

A extração do RNA total foi realizada utilizando o kit *ReliaPrep (TM) FFPE Total RNA Miniprep System Technical Manual* (Promega Corporation, USA) conforme as instruções do fabricante. Inicialmente, os tecidos fixados e incluídos em parafina, foram seccionados em micrótomo manual, obtendo-se de 10 a 15 cortes de 5 µm de espessura, conforme a disponibilidade de amostra. Os materiais seccionados, foram transferidos para tubos de microcentrífuga de 1,5 mL, sendo utilizado um tubo por amostra. A desparafinização dos tecidos foi realizada por adição de óleo mineral, seguida de incubação a 80 °C por 1 minuto. Para etapa de lise celular, foi adicionado *Lysis Buffer*, seguido de centrifugação e adição da Proteinase K, posteriormente foram incubadas em banho seco a uma temperatura de 56°C para a digestão do tecido (até o conteúdo ficar translúcido), por cerca de 15 horas, seguidamente, a temperatura foi elevada para 80°C e as amostras permaneceram por mais 1 hora. Após esse

período, as amostras foram tratadas com um mix de DNase buffer, DNA I *enzyme* e $MnCl_2$ 0.09M e incubadas por 15 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado tampão de ligação (*BL Buffer*) e isopropanol à fase aquosa resultante da etapa anterior, as amostras foram centrifugadas e após essa etapa, a fase aquosa do tubo, foi cuidadosamente transferida para a coluna de purificação. As amostras foram centrifugadas, permitindo a adsorção do RNA à membrana de sílica. Para a etapa de lavagem das colunas, foi adicionado *Wash Solution* e as amostras foram submetidas a centrifugação, essa fase foi realizada por duas vezes seguidas. A eluição do RNA foi realizada duas vezes com 25 μ l e 20 μ l respectivamente, adicionando *nuclease-free water* sobre a membrana da coluna de sílica, seguido da centrifugação. As amostras selecionadas para a síntese de cDNA e posterior realização da PCR em tempo real foram aquelas que apresentaram maiores concentrações de RNA, expressas em ng/ μ L, conforme quantificado pelo espectrofotômetro *NanoDrop Lite Plus Spectrophotometers* (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.4. Síntese de cDNA

A síntese de cDNA foi realizada a partir do *SuperScript™ VILO™ cDNA Synthesis Kit* (Invitrogen, USA) seguindo as especificações do fabricante. Ao total, para essa etapa, foram selecionadas 4 amostras de mucocela e 8 de CEM que continham concentração de RNA suficiente. Cada reação foi composta por 4 μ l de 5X *VILO™ Reaction Mix*, 2 μ l de 10X *SuperScript™ Enzyme Mix*, 2500 ng de RNA Total e volume complementar de água de injeção até atingir 20 μ L. As reações foram conduzidas no termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem, USA), utilizando o seguinte programa de incubação: 25°C por 10 minutos, 42°C por 60 minutos e 85°C por 5 minutos para inativação da enzima.

4.5. Análise da expressão gênica por RT-qPCR

A análise da expressão gênica foi realizada por PCR em tempo real (RT-qPCR) utilizando o sistema de detecção *TaqMan Array* (Thermo Fisher Scientific, USA). As placas utilizadas foram pré-configuradas com uma seleção de ensaios de expressão gênica *TaqMan* para via RAS por meio do kit *TaqMan™ Array Human RAS Pathway* (Thermo Fisher Scientific, USA). As placas do tipo 96-poços padrão (0,2 mL) continham 92 ensaios-alvo relacionados à via Ras e 4 genes endógenos (Tabela 2). Foram utilizadas uma placa por amostra, totalizando 12 placas (4 controles e 8 casos). A reação foi preparada seguindo recomendação do fabricante, utilizando 1.080 μ L de *Master Mix* (2x) e 1.080 μ L de cDNA diluído em água de injeção, totalizando 2.160 μ L. Foram distribuídos 20 μ L por poço. Após o preparo, as placas

foram homogeneizadas por vortex e centrifugadas brevemente para coletar todo o conteúdo do fundo dos poços.

As reações foram feitas no termociclador *QuantStudio™ 5 Real-Time PCR System* (Thermo Fisher Scientific, USA), utilizando o seguinte protocolo térmico: ativação inicial da enzima UDG a 50°C por 2 minutos, ativação enzimática a 95 °C por 20 segundos, seguida de 40 ciclos de desnaturação a 95 °C por 1 segundo e anelamento/extensão a 60 °C por 20 segundos.

A análise da expressão gênica foi conduzida por quantificação relativa, utilizando o método $2^{(-\Delta\Delta CT)}$. A análise da quantificação relativa foi realizada na plataforma Thermo Fisher Cloud™ (<https://apps.thermofisher.com>) a partir da normalização global, que calcula a média geométrica dos valores de Ct de genes expressos em níveis constantes nas amostras analisadas. O teste estatístico aplicado para a expressão gênica foi o T-Test com correção do valor de p, considerando como critérios de significância um valor de $p \leq 0,05$ e fold change ≥ 2 para genes superexpressos (upregulated) ou ≤ -2 para genes com expressão reduzida (downregulated).

O software de análise Thermo Fisher Cloud da Applied Biosystems inclui um conjunto de configurações que, quando ativadas, fazem com que o software rastreie os dados do experimento processado em busca de indicadores qualidades (flags) que podem sugerir possíveis problemas de análise. Os poços sinalizados com as flags de qualidade foram vistoriados manualmente as análises foram conduzidas incluindo todos os poços (análise geral) e excluindo aqueles sinalizados com flags de qualidade (análise filtrada).

Tabela 2 – Genes avaliados por RT-qPCR no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar

<i>Assay ID</i>	<i>Gene Symbol</i>	<i>Gene Name</i>
Hs99999901_s1	<i>18S</i>	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>
Hs99999905_m1	<i>GAPDH</i>	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
Hs99999909_m1	<i>HPRT1</i>	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
Hs99999908_m1	<i>GUSB</i>	<i>glucuronidase, beta</i>
Hs00559403_m1	<i>ACTA1</i>	<i>actin, alpha 1, skeletal muscle</i>
Hs00909449_m1	<i>ACTA2</i>	<i>actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>
Hs99999903_m1	<i>ACTB</i>	<i>actin, beta</i>
Hs02340971_gH	<i>ACTG1</i>	<i>actin, gamma 1</i>
Hs01123712_m1	<i>ACTG2</i>	<i>actin, gamma 2, smooth muscle, enteric</i>
Hs00176427_m1	<i>ARAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
Hs00869394_s1	<i>ARHGAP5</i>	<i>Rho GTPase activating protein 5</i>
Hs00180327_m1	<i>ARHGEF1</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 1</i>
Hs00207600_m1	<i>ARHGEF11</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 11</i>
Hs00190884_m1	<i>ARHGEF2</i>	<i>rho/rac guanine nucleotide exchange factor (GEF) 2</i>
Hs00374462_m1	<i>ARHGEF6</i>	<i>Rac/Cdc42 guanine nucleotide exchange factor (GEF) 6</i>
Hs00388776_m1	<i>ARHGEF7</i>	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7</i>
Hs00153179_m1	<i>ATF2</i>	<i>activating transcription factor 2</i>
Hs00269944_m1	<i>BRAF</i>	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>

Hs00167901_m1	<i>CD247</i>	<i>CD247 molecule</i>
Hs99999153_m1	<i>CD3E</i>	<i>CD3e molecule, epsilon (CD3-TCR complex)</i>
Hs00741586_mH	<i>CDC42</i>	<i>cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)</i>
Hs01099999_m1	<i>EGF</i>	<i>epidermal growth factor (beta-urogastrone)</i>
Hs01076078_m1	<i>EGFR</i>	<i>epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)</i>
Hs00428286_g1	<i>ELK1</i>	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>
Hs01001580_m1	<i>ERBB2</i>	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)</i>
Hs00361126_m1	<i>FGF1</i>	<i>fibroblast growth factor 1 (acidic)</i>
Hs00266645_m1	<i>FGF2</i>	<i>fibroblast growth factor 2 (basic)</i>
Hs00170630_m1	<i>FOS</i>	<i>v-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
Hs00412832_m1	<i>GPLD1</i>	<i>glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1</i>
Hs00157817_m1	<i>GRB2</i>	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
Hs00610483_m1	<i>HRAS</i>	<i>v-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Hs00609566_m1	<i>IGF1R</i>	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
Hs01116228_m1	<i>ITGA2B</i>	<i>integrin, alpha 2b (platelet glycoprotein IIb of IIb/IIIa complex, antigen CD41)</i>
Hs00233790_m1	<i>ITGAV</i>	<i>integrin, alpha V (vitronectin receptor, alpha polypeptide, antigen CD51)</i>
Hs00559595_m1	<i>ITGB1</i>	<i>integrin, beta 1 (fibronectin receptor, beta polypeptide, antigen CD29 includes MDF2, MSK12)</i>
Hs00164957_m1	<i>ITGB2</i>	<i>integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4 subunit)</i>
Hs01001469_m1	<i>ITGB3</i>	<i>integrin, beta 3 (platelet glycoprotein IIIa, antigen CD61)</i>

Hs99999141_s1	<i>JUN</i>	<i>jun oncogene</i>
Hs00911700_m1	<i>KDR</i>	<i>kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)</i>
Hs00174029_m1	<i>KIT</i>	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
Hs00364282_m1	<i>KRAS</i>	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
Hs00178427_m1	<i>LCK</i>	<i>lymphocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
Hs00605615_mH	<i>MAP2K1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
Hs00360961_m1	<i>MAP2K2</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
Hs00177127_m1	<i>MAP2K3</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>
Hs00387426_m1	<i>MAP2K4</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
Hs00992389_m1	<i>MAP2K6</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
Hs00178198_m1	<i>MAP2K7</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>
Hs00394890_m1	<i>MAP3K1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
Hs01046830_m1	<i>MAPK1</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 1</i>
Hs00373461_m1	<i>MAPK10</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 10</i>
Hs00268060_m1	<i>MAPK12</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 12</i>
Hs00385075_m1	<i>MAPK3</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 3</i>
Hs00833126_g1	<i>MAPK6</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 6</i>
Hs00177079_m1	<i>MAPK7</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 7</i>
Hs01548508_m1	<i>MAPK8</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 8</i>

Hs00177102_m1	<i>MAPK9</i>	<i>mitogen-activated protein kinase 9</i>
Hs00180035_m1	<i>NRAS</i>	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
Hs00176815_m1	<i>PAK1</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
Hs00605586_m1	<i>PAK2</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 2</i>
Hs00176828_m1	<i>PAK3</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 3</i>
Hs01100061_m1	<i>PAK4</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 4</i>
Hs00379318_m1	<i>PAK7</i>	<i>p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 7</i>
Hs00180679_m1	<i>PIK3CA</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
Hs00927728_m1	<i>PIK3CB</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide</i>
Hs00192399_m1	<i>PIK3CD</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>
Hs00381459_m1	<i>PIK3R1</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
Hs00178181_m1	<i>PIK3R2</i>	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)</i>
Hs00275279_m1	<i>PLCE1</i>	<i>phospholipase C, epsilon 1</i>
Hs00160118_m1	<i>PLD1</i>	<i>phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific</i>
Hs00160163_m1	<i>PLD2</i>	<i>phospholipase D2</i>
Hs00202172_m1	<i>PLD3</i>	<i>phospholipase D family, member 3</i>
Hs01025984_m1	<i>RAC1</i>	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 1 (rho family, small GTP binding protein Rac1)</i>
Hs01032884_m1	<i>RAC2</i>	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)</i>
Hs00414037_g1	<i>RAC3</i>	<i>ras-related C3 botulinum toxin substrate 3 (rho family, small GTP binding protein Rac3)</i>

Hs00234119_m1	<i>RAF1</i>	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
Hs00800233_s1	<i>RALA</i>	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog A (ras related)</i>
Hs00182275_m1	<i>RALB</i>	<i>v-ral simian leukemia viral oncogene homolog B (ras related; GTP binding protein)</i>
Hs00183639_m1	<i>RALBP1</i>	<i>ralA binding protein 1</i>
Hs00325141_m1	<i>RALGDS</i>	<i>ral guanine nucleotide dissociation stimulator</i>
Hs00234123_m1	<i>RAP1A</i>	<i>RAP1A, member of RAS oncogene family</i>
Hs00243115_m1	<i>RASA1</i>	<i>RAS p21 protein activator (GTPase activating protein) 1</i>
Hs00357608_m1	<i>RHOA</i>	<i>ras homolog gene family, member A</i>
Hs00269660_s1	<i>RHOB</i>	<i>ras homolog gene family, member B</i>
Hs00237129_m1	<i>RHOC</i>	<i>ras homolog gene family, member C</i>
Hs00750922_s1	<i>RHOG</i>	<i>ras homolog gene family, member G (rho G)</i>
Hs00170603_m1	<i>RND3</i>	<i>Rho family GTPase 3</i>
Hs00196699_m1	<i>RRAS</i>	<i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog</i>
Hs00273367_m1	<i>RRAS2</i>	<i>related RAS viral (r-ras) oncogene homolog 2</i>
Hs00427539_m1	<i>SHC1</i>	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 1</i>
Hs00375042_m1	<i>SHC3</i>	<i>SHC (Src homology 2 domain containing) transforming protein 3</i>
Hs00362308_m1	<i>SOS1</i>	<i>son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
Hs00183311_m1	<i>SOS2</i>	<i>son of sevenless homolog 2 (Drosophila)</i>
Hs00413846_g1	<i>TRD δ</i>	<i>T cell receptor delta locus</i>

Hs00900055_m1	<i>VEGFA</i>	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
Hs01099203_m1	<i>VEGFC</i>	<i>vascular endothelial growth factor C</i>

Lista dos genes analisados por RT-qPCR no presente estudo, com seus respectivos símbolos genéticos, nomes completos e códigos de identificação dos ensaios (*Assay ID*). Os genes selecionados incluem componentes das vias de sinalização RAS/MAPK e PI3K/AKT, além de genes de referência (*housekeeping*), como GAPDH, 18S, HPRT1 e GUSB.

4.6. Análise de Enriquecimento Funcional (DAVID)

A análise de enriquecimento funcional dos genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando a ferramenta *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>). Foram utilizadas as categorias de *Gene Ontology* (GO): Processos Biológicos (PB), Funções Moleculares (FM) e Componentes Celulares (CC) e as vias de sinalização do banco KEGG (Huang et al., 2009). O valor de $P < 0,05$ foi definido como critério de corte para significância. A análise de enriquecimento funcional foi realizada com o conjunto de resultados da análise geral, ou seja, incluindo todos os poços.

4.7. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA FFPE Tissue (Qiagen, Germany), seguindo os protocolos dos fabricantes. Inicialmente, os tecidos fixados e incluídos em parafina, foram seccionados em micrótomo manual, obtendo-se de 10 a 15 cortes de 5 μm de espessura, conforme a disponibilidade de amostra. A desparafinização dos tecidos foi realizada por adição da solução desparafinizadora (Qiagen, Germany) e, em seguida, as amostras foram incubadas a 56° C por 15 minutos. Após esse processo, foi adicionado o Buffer ATL, seguido da proteinase K e incubação a 56° C para lise das amostras em banho seco por até 24 horas e posteriormente, por incubação a 90°C durante 1 hora. Foi adicionado Buffer AL e etanol, e o produto foi cuidadosamente transferido para a coluna de purificação QIAamp Min Elute column (QIAampMinElute® Columns). Para etapa de lavagem, foi adicionado Buffer AW1 e Buffer AW2 e as amostras foram submetidas a centrifugação. A eluição do DNA foi feita com buffer ATE sobre a membrana da coluna de sílica, seguido da centrifugação. O

produto extraído foi quantificado pelo espectrofotômetro NanoDrop Lite Plus Spectrophotometers (Thermo Fisher Scientific, USA).

4.8. Sequenciamento de Sanger

Ao total, 10 amostras de DNA foram quantificadas e armazenadas a -20°C . A reação de PCR foi realizada para amplificação da região do éxon 20 do gene *PIK3CA*, onde se localiza a mutação p.H1047R (c.3140A>G). Foram utilizados primers específicos contendo as caudas universais M13. A inclusão das sequências M13 Forward (5'GTAAAACGACGGCCAGT3') e M13 Reverse (5'CAGGAAACAGCTATGAC-3') permite a utilização de primers universais em etapas posteriores de sequenciamento Sanger (Tabela 3).

Tabela 3 - Iniciadores utilizados para a identificação de mutação do gene *PIK3CA*.

Gene	Iniciador	Amplicon (pares de base)
<i>PIK3CA</i>	Senso GTAAAACGACGGCCAGT ACTGAGCAAGAGGCTTTGGAG	150 pb
	Antissenso CAGGAAACAGCTATG ACCCAGAGTGAGCTTTCATTTTCTC	

Iniciadores com as caudas M13 destacadas em negrito. Os primers foram sintetizados pela empresa Integrated DNA Technologies.

Para a reação de PCR, foram utilizados 12,5 μL de *MyTaq HS Red Mix* (Bioline, UK), 1 μL de primer senso e 1 μL de primer antissenso (concentração 10pmol) e 30ng de DNA, em solução final de 25ml. As reações foram realizadas no termociclador *Veriti™ 96-Well Thermal Cycler* (Applied Biosystem, USA), utilizando o seguinte programa de incubação: 95°C por 3 minutos, seguido de 45 ciclos nas temperaturas 95°C por 15 segundos, 60°C por 15 segundos, e 72°C por 30 minutos, e para finalizar, as amostras foram incubadas a 72°C por 10 minutos, seguido de resfriamento a 4°C . Nas reações, foram utilizados controles negativos com ausência de gDNA. A eletroforese em gel de agarose foi utilizada para verificar a amplificação dos produtos de PCR. Para confecção do gel, foi usado agarose a 1,5% e o reagente *SYBR™ Safe DNA gel stain* (Introgen by Thermo Fisher Scientific, USA) para a fluorescência. A visualização foi feita através do fotodocumentador *iBright 750* (Invitrogen, USA).

Os produtos de PCR foram submetidos a purificação utilizando a enzima *ExoSAP IT* (Applied Biosystems, USA) com o objetivo de remover primers e nucleotídeos não incorporados. Em tubos de microcentrifuga de 0,2 µL foram utilizados 7,5 µL de amostra de DNA e 3 µL da enzima. As amostras foram incubadas a uma temperatura de 37° C por 15 minutos e posteriormente a 80° C por 15 minutos. Em seguida, a quantificação foi realizada utilizando o fluorômetro *Qubit™ 4* (Invitrogen, USA), com o kit *Qubit™ dsDNA BR Assay Kit* (Invitrogen by Thermo Fisher Scientific, USA). Para a calibração, foram utilizadas 10 µL de cada padrão fornecido pelo kit em 190 µL de *work solution*. Para cada amostra, foi utilizado 1 µL de DNA em 199 µL de *working solution*, previamente preparada na proporção 1:200 entre reagente e tampão, conforme as instruções do fabricante. As amostras foram incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e posteriormente foram realizadas as leituras.

As amostras para sequenciamento foram preparadas utilizando 10 ng de produto purificado e o sequenciamento foi realizado a partir dos iniciadores M13 e de forma bidirecional. O sequenciamento dos produtos purificados foi realizado posteriormente em laboratório terceirizado especializado, utilizando o método de terminação de cadeia com corantes fluorescentes (BigDye™ Terminator Cycle Sequencing, Applied Biosystems, USA), baseado na metodologia de Sanger.

5. RESULTADOS

5.1 Caracterização da Amostra

Foram incluídas no estudo 13 amostras de CEM de glândulas salivares. Os dados clínicos das amostras e os experimentos conduzidos com cada uma das amostras se encontram na Tabela 4. Dos pacientes avaliados, 61,54% eram do sexo feminino e 38,46% do sexo masculino, com mediana de idade de 64 anos. A parótida foi a localização mais frequentemente acometida, representando 76,92% dos casos, quanto ao tratamento, 69,23% dos pacientes foram submetidos exclusivamente à cirurgia, em relação à invasão vascular ou perineural, foi identificada somente em 1 caso. As margens cirúrgicas foram livres em 69,23% dos pacientes avaliados. Quanto à ocorrência de metástase, foi identificada em apenas 1 caso (Tabela 4).

Tabela 4 – Caracterização das amostras de carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar incluídas no estudo

Caso	Idade (Anos)	Sexo	Localização	Tamanho (cm)	Tratamento	Metástase	RT-qPCR	Sequenciamento
1	50	F	Parótida	8	Cirurgia	Linfonodos	X	
2	65	M	Parótida	3	Cirurgia e radioterapia	Não	X	
3	52	F	Parótida	1,5	Cirurgia	Não	X	X
4	67	F	Parótida	NI	Cirurgia	Não	X	X
5	71	F	Parótida	0,7	Cirurgia	NI	X	
6	32	F	Região cervical	8	Cirurgia e radioterapia	Não	X	X
7	71	M	Parótida	5	Cirurgia	NI	X	X
8	65	F	Parótida	2,3	Cirurgia	NI	X	X
9	30	F	Parótida	5	Cirurgia	Não		X
10	64	M	Parótida	3,5	Cirurgia e radioterapia	Não		X
11	59	F	Parótida	4	Cirurgia e radioterapia	Não		X
12	51	M	Palato	3	Cirurgia	Não		X
13	84	M	Palato	3,5	Cirurgia	Não		X

Dados referentes ao perfil clínico e patológico dos pacientes incluídos no estudo.
F = Feminino, M = Masculino, NI = Não informado

5.2 Expressão gênica

A expressão gênica foi avaliada por RT-qPCR em oito amostras de CEM e quatro amostras controle. Os sinais dos poços marcados com flag de qualidade foram verificados manualmente. Como as curvas de expressão genica destes poços não foram todas atípicas, a análise foi conduzida de duas formas: utilizando todos os resultados obtidos (análise geral) e, posteriormente, excluindo manualmente os poços marcados com flags de baixa qualidade (análise filtrada). Os genes *PLD1*, *FOS*, *MAPK9*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* e *JUN* apresentaram desregulação em ambas as abordagens analíticas.

5.2.1. Análise geral

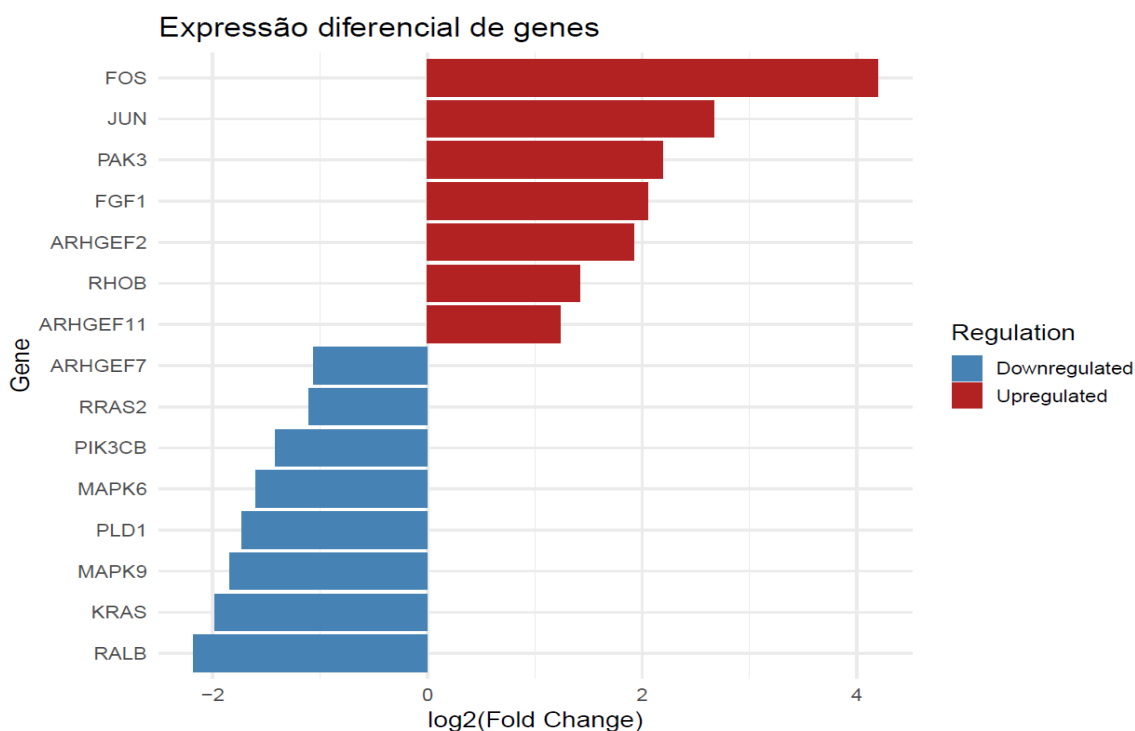
Foram identificados 15 genes diferencialmente expressos, dos quais 8 apresentaram redução na expressão (*down-regulated*) e 7 apresentaram aumento (*up-regulated*) quando comparados ao grupo controle. Os genes com superexpressão foram: *FOS*, *PAK3*, *ARHGEF2*, *ARHGEF11*, *RHOB*, *FGF1* e *JUN*. Já os genes com baixa expressão incluíram: *MAPK6*, *MAPK9*, *PIK3CB*, *KRAS*, *RALB*, *RRAS2*, *PLD1* e *ARHGEF7* (Tabela 5) (Figura 4).

Tabela 5 – Lista de genes diferencialmente expressos com respectivos valores *fold change*: análise geral

Assay ID	Gene	Fold Change	Valor de p corrigido	Regulação
Hs00207600_m1	<i>ARHGEF11</i>	1,23	0,045	<i>Up-regulated</i>
Hs00269660_s1	<i>RHOB</i>	1,42	0,028	<i>Up-regulated</i>
Hs00190884_m1	<i>ARHGEF2</i>	1,93	0,045	<i>Up-regulated</i>
Hs00361126_m1	<i>FGF1</i>	2,05	0,033	<i>Up-regulated</i>
Hs00176828_m1	<i>PAK3</i>	2,19	0,043	<i>Up-regulated</i>
Hs99999141_s1	<i>JUN</i>	2,67	0,005	<i>Up-regulated</i>
Hs00170630_m1	<i>FOS</i>	4,19	0,001	<i>Up-regulated</i>
Hs00388776_m1	<i>ARHGEF7</i>	-1,06	0,028	<i>Down-regulated</i>
Hs00273367_m1	<i>RRAS2</i>	-1,10	0,045	<i>Down-regulated</i>
Hs00927728_m1	<i>PIK3CB</i>	-1,41	0,033	<i>Down-regulated</i>
Hs00833126_g1	<i>MAPK6</i>	-1,60	0,033	<i>Down-regulated</i>
Hs00160118_m1	<i>PLD1</i>	-1,72	0,001	<i>Down-regulated</i>
Hs00177102_m1	<i>MAPK9</i>	-1,84	0,033	<i>Down-regulated</i>
Hs00364282_m1	<i>KRAS</i>	-1,98	0,045	<i>Down-regulated</i>
Hs00182275_m1	<i>RALB</i>	-2,18	0,005	<i>Down-regulated</i>

Genes diferencialmente expressos identificados por PCR em tempo real. O valor de fold change, o valor de p corrigido (FDR - False Discovery Rate - método de correção do valor de p utilizado para reduzir o risco de falsos positivos em análises com múltiplas comparações, como na avaliação simultânea da expressão de vários genes) e a direção da regulação (Up-regulated ou Down-regulated) no grupo CEM em comparação ao grupo controle.

Figura 4 - Perfil de expressão diferencial de genes associados a vias de sinalização em carcinoma epitelial-mioepitelial: análise geral



Fonte – Autoria própria

Representação dos genes diferencialmente expressos com base nos valores de \log_2 (Fold Change), indicando genes superexpressos (vermelho) e subexpressos (azul). Os dados referem-se à análise de expressão gênica em amostras de carcinoma epitelial-mioepitelial comparado a mucocele (grupo controle).

5.2.2. Análise filtrada

Na análise filtrada, os poços marcados com flags de baixa qualidade (Tabela 6) foram vistoriados e excluídos da análise da expressão genica. Nesta análise, 9 genes apresentaram desregulação na expressão gênica, sendo 7 com redução na expressão (*down-regulated*) e 2 com aumento (*up-regulated*) quando comparados ao grupo controle. Os genes com superexpressão foram: *FOS* e *JUN*. Já os genes com expressão reduzida incluíram: *PLD1*, *MAPK9*, *MAP2K3*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* e *VEGFC* (Tabela 7) (Figura 5). Os genes *PLD1*, *FOS*, *MAPK9*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* e *JUN* apresentaram desregulação em ambas as abordagens analíticas e fazem parte majoritariamente da via MAPK canônica e não-canônica e estão ilustrados no Figura 6.

Tabela 6 – Flags de baixa qualidade

Flag	Significado	Implicação na prática
------	-------------	-----------------------

CQCONF	Confiança calculada no valor de Cq é baixa	O valor de Cq pode não ser confiável - sinal instável, ruído ou baixa eficiência de amplificação.
AMPSCORE	Pontuação de amplificação	Indica a qualidade geral da curva de amplificação. Baixo valor sugere amplificação ruim ou não específica
EXPFAIL	O software não consegue identificar a região exponencial da curva de amplificação	Curva não apresenta padrão típico de amplificação - possível falha técnica, inibição ou baixa expressão
NOAMP	A amostra não amplificou	Pode indicar falha de PCR, RNA degradado, erro de pipetagem ou gene não expresso
THOLDFAIL	O software não consegue calcular o limiar	A curva não permite definição de threshold - muito ruídos ou sem amplificação clara

Descrição das *flags* e a implicação na prática

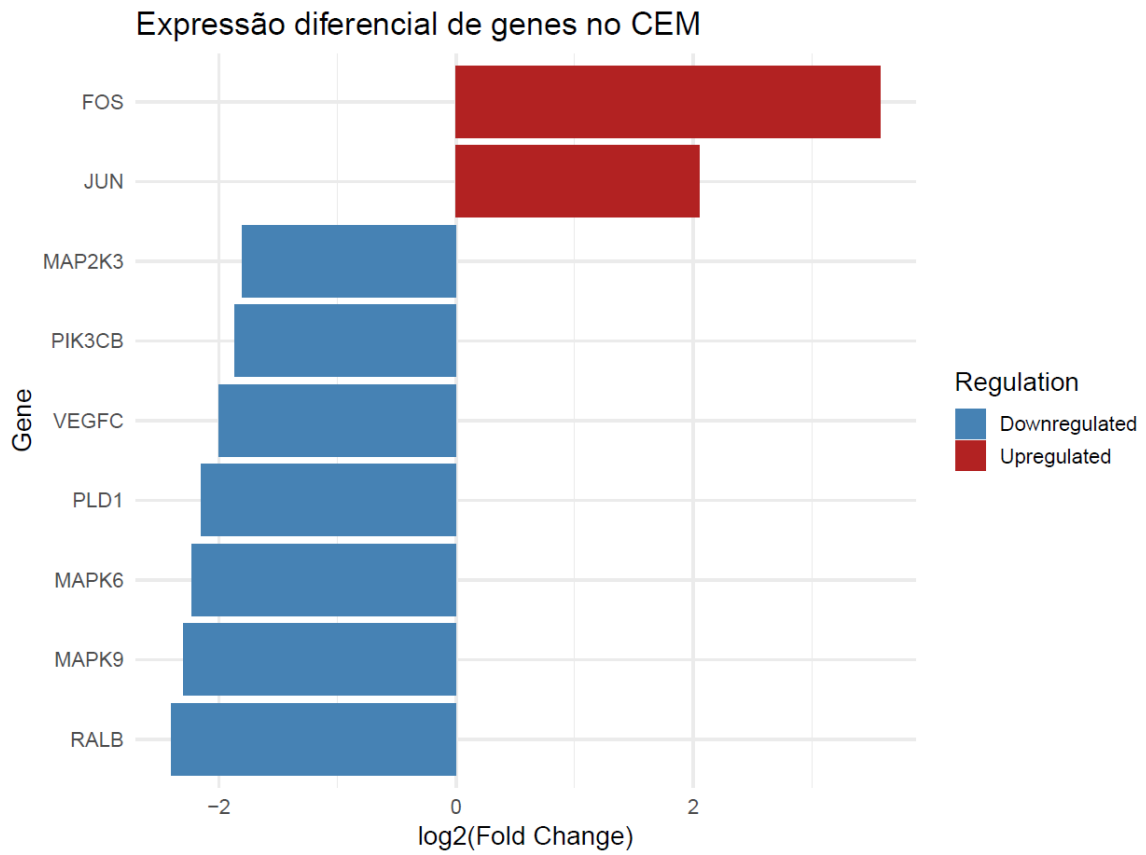
Tabela 7 – Lista de genes diferencialmente expressos com respectivos valores fold change: análise filtrada

Código	Gene	Fold Change	Valor de p corrigido	Expressão
Hs00170630_m1	<i>FOS</i>	3,57	0,011	<i>Up-regulated</i>

Hs99999141_s1	<i>JUN</i>	2,05	0,032	<i>Up-regulated</i>
Hs00177127_m1	<i>MAP2K3</i>	-1,80	0,012	<i>Down-regulated</i>
Hs00927728_m1	<i>PIK3CB</i>	-1,87	0,012	<i>Down-regulated</i>
Hs01099203_m1	<i>VEGFC</i>	-2,00	0,036	<i>Down-regulated</i>
Hs00160118_m1	<i>PLDI</i>	-2,15	0,009	<i>Down-regulated</i>
Hs00833126_g1	<i>MAPK6</i>	-2,23	0,009	<i>Down-regulated</i>
Hs00177102_m1	<i>MAPK9</i>	-2,30	0,022	<i>Down-regulated</i>
Hs00182275_m1	<i>RALB</i>	-2,40	0,006	<i>Down-regulated</i>

Genes diferencialmente expressos identificados por PCR em tempo real. O valor de fold change (expresso em escala log2), o valor de p corrigido (FDR) e a direção da regulação (Up-regulated ou Down-regulated) no grupo CEM em comparação ao grupo controle.

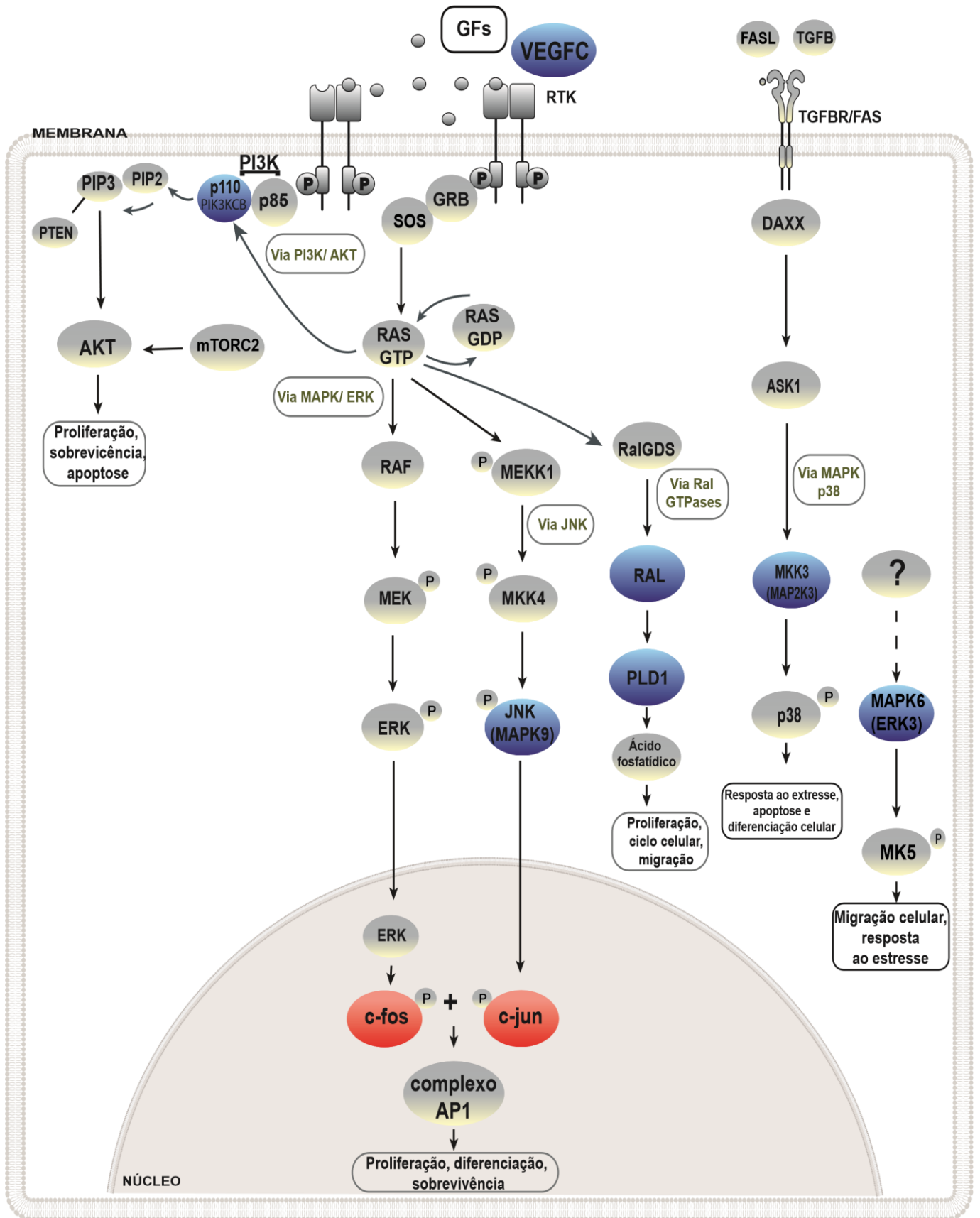
Figura 5 - Perfil de expressão diferencial de genes associados a vias de sinalização em carcinoma epitelial-mioepitelial: análise filtrada



Fonte – Autoria própria

Representação dos genes diferencialmente expressos com base nos valores de \log_2 (Fold Change), indicando genes superexpressos (vermelho) e subexpressos (azul). Os dados referem-se à análise de expressão gênica em amostras de carcinoma epitelial-mioepitelial comparado a mucocele (grupo controle).

Figura 6 – Representação dos genes diferentemente expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial e suas vias de sinalização celular.



Fonte – Autoria própria

Representação

esquemática das vias de sinalização intracelular associadas aos genes diferencialmente expressos no estudo. Genes destacados em vermelho estão superexpressos (*up-regulated*), enquanto os destacados em azul estão subexpressos (*down-regulated*), com base nos dados de expressão gênica obtidos. Os genes *PLD1*, *FOS*, *MAPK9*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* e *JUN* apresentaram desregulação em ambas as abordagens analíticas.

5.3. Enriquecimento Funcional (DAVID): análise geral

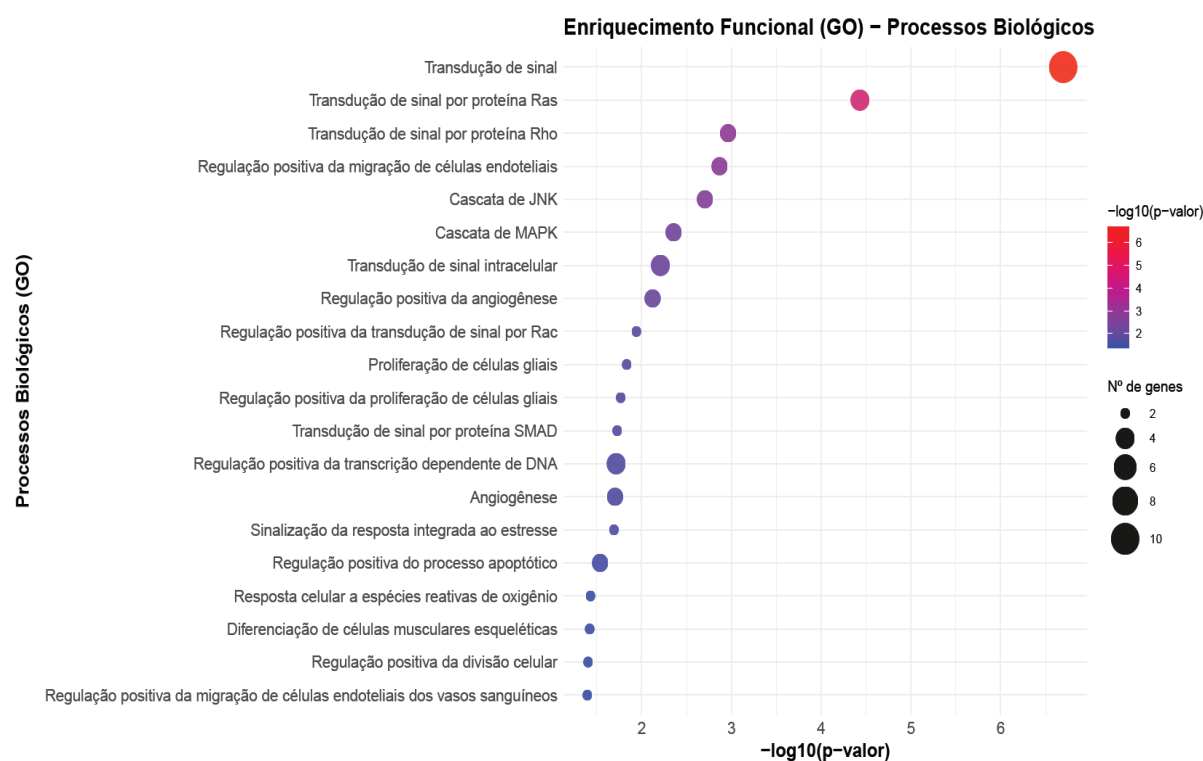
Para a análise dos processos biológicos, componentes celulares, funções moleculares e vias de sinalização associados aos genes diferencialmente expressos com a lista de genes sem aplicação do filtro, foi realizada a análise de enriquecimento funcional utilizando a ferramenta DAVID (Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery) (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>). A análise contemplou as categorias *Gene Ontology* e *KEGG Pathways* (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*). Na categoria *Gene Ontology*, foram avaliadas as seguintes subcategorias: Processos Biológicos (PB), Funções Moleculares (FM) e Componentes Celulares (CC).

5.3.1 Processos Biológicos:

A análise de enriquecimento funcional mostrou PB altamente significativos que envolvem genes diretamente relacionados às vias de sinalização MAPK e PI3K, bem como a processos clássicos associados à tumorigênese (Figura 6). O processo Transdução de sinal apresentou o menor valor de p ($2,01 \times 10^{-7}$), refletindo a ampla participação de genes como *MAP2K3*, *MAPK6*, *KRAS*, *PIK3CB*, *FGF1*, *RALB*, *VEGFC*, *RRAS2*, *ARHGEF7* e *RHOB*. A via MAPK também foi evidenciada nos processos de Cascata JNK e Cascata MAPK, com valores de p de 0,0019 e 0,0044, respectivamente. O processo Cascata JNK com p valor de 0,0020, apresentou enriquecimento dos genes *MAP2K3*, *MAPK6* e *MAPK9*, enquanto a Cascata MAPK com p valor de 0,0044 incluiu *MAP2K3*, *KRAS* e *PAK3*. A via PI3K está representada em processos como Regulação positiva da migração de células endoteliais e Transdução de sinal intracelular, com valores de p iguais a 0,0014 e 0,0062, respectivamente. O primeiro processo inclui genes como *PIK3CB*, *FGF1* e *RHOB*, enquanto o segundo envolve *PAK3*, *PLD1*, *ARHGEF7* e *MAPK6*. Processos relacionados à via Ras, com p -valor de $3,7 \times 10^{-5}$, incluem genes como *KRAS*, *RRAS2*, *RALB* e *PLD1*. Já a Via Rho, com $p = 0,0011$, envolve genes como *ARHGEF7*, *RHOB* e *ARHGEF11*. Esses genes atuam na integração dos sinais das vias PI3K e MAPK. Adicionalmente, termos como Angiogênese e Regulação positiva da angiogênese

reforçam a participação de *VEGFC*, *FGF1* e *RHOB*, com valores de p 0,0198 e 0,0076 respectivamente.

Figura 7 – Análise de Enriquecimento Funcional dos Processos biológicos (*Gene Ontology*) dos Genes Diferencialmente Expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar



Fonte – Autoria própria

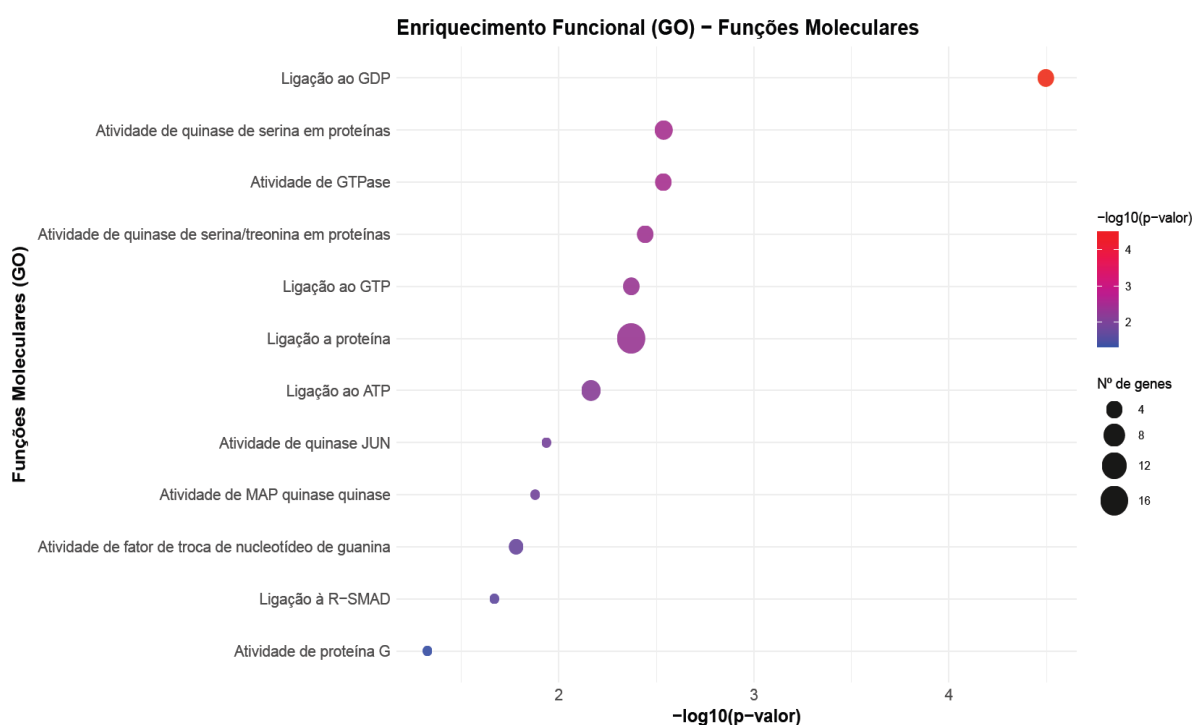
Gráfico de bolhas representando os processos biológicos enriquecidos (*Gene Ontology* – GO) a partir dos genes diferencialmente expressos em amostras de CEM. O eixo Y indica os termos biológicos enriquecidos, enquanto o eixo X representa a significância estatística do enriquecimento ($-\log_{10}$ do valor de p). O tamanho das bolhas indica o número de genes associados a cada termo, e a cor representa o grau de significância (quanto mais intenso o vermelho, menor o p-valor).

5.3.2. Funções Moleculares

O enriquecimento funcional, destacou a presença de diversas FM significativamente associadas aos genes diferencialmente expressos, destacando mecanismos diretamente ligados às vias de sinalização MAPK e PI3K, amplamente implicadas na tumorigênese (Figura 7). Entre os termos mais significativos, destacam-se Ligação ao GDP ($p = 3,19 \times 10^{-5}$) com participação dos genes e Atividade de GTPase ($p = 0,0029$), que envolvem genes como *KRAS*, *RHOB*, *RALB* e *RRAS2*, membros da superfamília RAS, cuja ativação representa um passo inicial crítico na ativação das vias MAPK e PI3K/AKT. Termos como Atividade de proteína quinase de serina ($p = 0,0036$) e atividade quinase MAPK ($p = 0,0132$) refletem a participação de genes como *MAPK6*, *MAPK9*, com destaque adicional para *MAP2K3* e *PAK3* na Atividade

de proteína quinase de serina. Adicionalmente, a função Atividade de fator de troca de nucleotídeo de guanina ($p = 0,0166$), representada por *ARHGEF2*, *ARHGEF7* e *ARHGEF11*. A presença de genes como *PIK3CB* reforça o envolvimento da via PI3K. Além disso, a função Ligação ao GTP ($p = 0,0042$), também mediada pelos genes *RALB*, *RRAS2*, *KRAS*, *RHOB*.

Figura 8 - Análise de Enriquecimento Funcional (*Gene Ontology*) – Funções Moleculares dos Genes Expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar



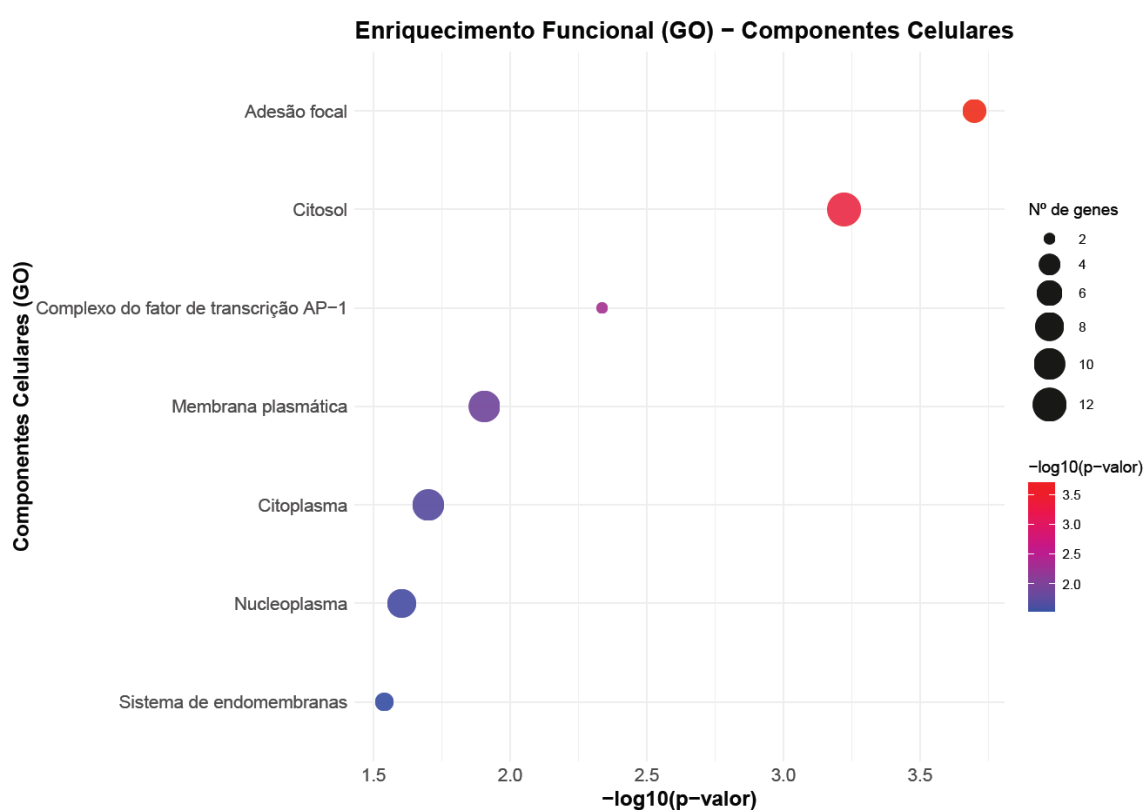
Fonte – Autoria própria Gráfico de bolhas representando as funções moleculares enriquecidas (*Gene Ontology* – GO) com base nos genes diferencialmente expressos em amostras de CEM. O eixo Y mostra os termos moleculares identificados, enquanto o eixo X apresenta a significância estatística do enriquecimento ($-\log_{10}$ do valor de p). O tamanho das bolhas reflete o número de genes associados a cada função molecular, e a coloração indica a significância estatística (vermelho mais intenso = p -valor mais significativo).

5.3.3. Componentes Celulares

A análise de enriquecimento funcional revelou processos relacionados a CC significativamente associados a genes que participam ativamente das vias de sinalização MAPK e PI3K, além de mecanismos relacionados ao câncer (Figura 8). Dentre os destaques, a adesão focal apresentou a maior significância com valor de $p = 0,0002$, com envolvimento dos genes *RRAS2*, *KRAS*, *ARHGEF2*, *ARHGEF7* e *RHOB*. No citosol ($p = 0,0006$) e no citoplasma ($p = 0,0199$), observou-se um reforço na participação dos genes *ARHGEF11*, *MAP2K3*, *MAPK9*, *KRAS*, *PIK3CB*, *ARHGEF2*, *FGF1*, *PAK3*, *ARHGEF7* e *MAPK6*, com destaque adicional para *FOS* e *RHOB* no citosol. O complexo do fator de transcrição AP-1

também foi identificado como significativamente associado ($p = 0,0046$), com envolvimento dos genes *JUN* e *FOS*. Na membrana plasmática ($p = 0,0124$), foram observados os genes *ARHGEF11*, *MAPK9*, *RALB*, *RRAS2*, *KRAS*, *PIK3CB*, *PAK3*, *PLD1*, *ARHGEF7* e *RHOB*. Já no nucleoplasma o valor de p foi 0,0249, destacaram os genes *ARHGEF11*, *MAP2K3*, *MAPK9*, *JUN*, *FOS*, *PIK3CB*, *FGF1* e *MAPK6*. Por fim, o sistema de endomembranas ($p = 0,0289$) apresentou enriquecimento com os genes *RRAS2*, *KRAS* e *PLD1*.

Figura 9 – Análise de Enriquecimento Funcional (*Gene Ontology*) – Componentes Celulares dos Genes Expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar



Fonte – Autoria própria

Gráfico de bolhas representando os componentes celulares enriquecidos (*Gene Ontology* – GO) com base nos genes diferencialmente expressos em amostras de CEM. O eixo Y mostra os termos moleculares identificados, enquanto o eixo X apresenta a significância estatística do enriquecimento ($-\log_{10}$ do valor de p). O tamanho das bolhas reflete o número de genes associados a cada função molecular, e a coloração indica a significância estatística (vermelho mais intenso = p -valor mais significativo).

5.3.4. Análise das Vias de Sinalização (KEGG)

A análise de enriquecimento funcional das vias de sinalização evidenciou o envolvimento significativo da via MAPK ($p = 5.39 \times 10^{-7}$), apresentando a expressão alterada de MAP2K3, MAPK9, JUN, VEGFC, RRAS2, KRAS, FOS e FGF1. Na via PI3K-Akt, os genes PIK3CB, KRAS, VEGFC e FGF1 estiveram significativamente enriquecidos ($p =$

0.0280). A via de sinalização Ras, com p valor de 3.46×10^{-9} , que atua a montante de MAPK e PI3K, também foi destacada, com a presença de MAPK9, RALB, VEGFC, RRAS2, KRAS, PIK3CB, FGF1, PAK3 e PLD1. Outras vias de destaque incluem a via do câncer (valor de $p = 1.04 \times 10^{-7}$) e a via do câncer colorretal (valor de $p = 3.92 \times 10^{-7}$), que reuniram genes como ARHGEF11, MAPK9, JUN, RALB, VEGFC, KRAS, FOS, PIK3CB, FGF1, PLD1 e MAPK9, JUN, RALB, KRAS, FOS, PIK3CB respectivamente. Além disso, a via Expressão de PD-L1 e via de ponto de verificação de PD-1 no câncer (p valor = 1.91×10^{-5}), contou com a participação dos genes MAP2K3, JUN, KRAS, FOS e PIK3CB, já a via do câncer pancreático, com valor de $p = 1.03 \times 10^{-5}$, também apresentaram enriquecimento com genes como MAPK9, RALB, KRAS, PIK3CB e PLD1 (Figura 9).

Figura 10 – Top 20 das vias de sinalização KEGG enriquecidas a partir dos genes diferentemente expressos no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar.



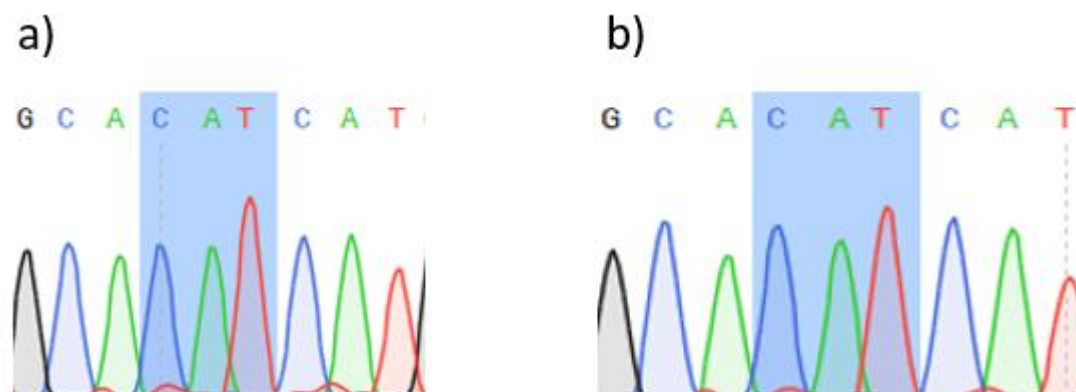
Fonte – Autoria própria

Gráfico bolha das principais vias KEGG no contexto tumoral. O tamanho do nó é proporcional à contagem de genes enriquecida em cada item. A cor do nó varia de verde a vermelho, indicando significância estatística crescente ($-\log_{10} P$ -valor), com o vermelho representando os valores de P mais baixos (mais significativos).

5.4 Sequenciamento do gene *PIK3CA*

Foram analisadas 10 amostras de CEM por sequenciamento do éxon 20 do gene *PIK3CA*, com foco específico no códon 1047. Das 8 amostras incluídas no estudo de expressão gênica, apenas 5 foi possível obter o DNA para uso no sequenciamento. Em todas as amostras, foi identificada a presença da sequência de referência (*wild-type*), sem evidência de mutações nesse local, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 11 - Análise do códon 1047 (c.3140A) no éxon 20 do gene *PIK3CA* por sequenciamento Sanger no carcinoma epitelial-mioepitelial da glândula salivar



Cromatogramas representativos do sequenciamento de duas amostras 12 e 6 respectivamente na região do códon 1047 do gene *PIK3CA* (c.3140).

Fonte: autoria própria

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, as características clinicopatológicas do tumor estão alinhadas com os dados previamente descritos na literatura, a mediana de idade dos pacientes foi de 64 anos, com maior incidência na sexta e sétima décadas de vida (Nakaguro; Nagao, 2021; WHO; Kumar *et al.*, 2025) corroborando com a literatura. Neste estudo, houve uma maior incidência no sexo feminino (75%), em concordância com um estudo de Gore (2018). De acordo com Seethala e colaboradores (2007) e Urano e colaboradores (2019), a predominância do local da lesão é a glândula parótida, o que vai de acordo com os achados neste estudo onde essa glândula representou 87,5% dos casos. O tamanho do tumor foi semelhante ao descrito por França e colaboradores (2025), 4,07 cm. Gore (2018) relata o baixo acometimento linfonodal, destacando que, no presente estudo, apenas 1 dos 8 casos analisados apresentou comprometimento linfonodal. Além disso, o autor evidencia que o tratamento cirúrgico constitui a abordagem mais adequada, sendo que 6 pacientes foram tratados exclusivamente com cirurgia, enquanto apenas 2 receberam tratamento combinado de cirurgia e radioterapia.

Recentemente, mutações exclusivas em *HRAS*, uma das isoformas Ras, mostraram promissoras para o diagnóstico diferencial do CEM (Urano *et al.*, 2019). Ras é um ator central em múltiplas vias de sinalização diferentes e, desvendar as alterações moleculares nas diferentes vias a jusante de Ras pode fornecer informações importantes para o tratamento, diagnóstico e prognóstico da lesão. A via Ras e suas vias a jusante MAPK e PI3K estão entre

os principais mecanismos envolvidos na tumorigênese, atuando na regulação da proliferação, invasão, migração e neovascularização (Chiosea, Miller e Seethala, 2014; Urano *et al.*, 2019). No CEM, o papel dessas vias ainda não está completamente elucidado. A compreensão dos mecanismos moleculares associados ao desenvolvimento dessa neoplasia é fundamental para aprimorar o diagnóstico, o prognóstico e, potencialmente, o tratamento. Na análise dos genes diferentemente expressos, o *FOS* e o *JUN* (*up-regulated*), assim como *PLD1*, *MAPK9*, *RALB*, *MAPK6* e *PIK3CB* (*down-regulated*), foram identificados tanto na análise geral quanto da análise filtrada. Por outro lado, os genes *VEGFC* e *MAP2K3*, ambos com expressão reduzida, foram detectados exclusivamente após a filtragem dos dados, sugerindo que sua identificação pode estar associada à redução do ruído de fundo e ao aumento da sensibilidade analítica. Em contraste, os genes *PAK3*, *ARHGEF2*, *ARHGEF11*, *RHOB* e *FGF1* (*up-regulated*), assim como *RRAS2*, *KRAS* e *ARHGEF7* (*down-regulated*), foram observados apenas na análise sem filtragem.

FOS e *JUN* são proteínas que formam um complexo chamado Proteína Ativadora-1 (AP-1), que atua como um fator de transcrição. A AP-1 regula a expressão gênica, desempenhando papéis em vários processos celulares, como crescimento, diferenciação e apoptose celular. Comumente, *FOS* é um efetor a jusante da via de sinalização MAPK/ERK, enquanto *JUN* é efetor da via MAPK/JNK. No presente estudo, *FOS* e *JUN* encontram-se superexpressos em comparação ao tecido normal, o que pode indicar uma superativação da via MAPK, contribuindo para a progressão e o crescimento tumoral no CEM. Hu *et al.* (2020) fez uma análise computacional usando dados de pacientes com câncer de fígado, identificando que o gene *FOS* está altamente expresso nos tumores quando comparado ao tecido normal. Além disso, indivíduos com níveis altos de *FOS* tinham pior prognóstico. Foi construído ainda, uma rede usando uma plataforma de bioinformática conectando genes com diversas vias de sinalização, *FOS* foi o gene mais interagiu com diversas vias importantes para o câncer, como MAPK, (crescimento e sobrevivência celular), GPCR (resposta a sinais externos), JAK/STAT (resposta inflamatória e proliferação), e via da insulina (metabolismo e crescimento). Nos Sarcomas indiferenciados de partes moles, Mariani e colaboradores (2007), demonstraram que *JUN* estava superexpresso e que essa alteração bloqueia a diferenciação em adipócitos, contribuindo para um fenótipo tumoral mais agressivo.

Os genes *MAP2K3*, *MAPK9* e *MAPK6* fazem parte da família das MAPKs, porém atuam em cascatas distintas. *MAPK9*, também conhecido como JNK2, participa da via JNK, sendo ativado por MAP2K4 e MAP2K7, enquanto MAP2K3 atua preferencialmente na ativação de MAPKs da via p38 (Cargnello, Roux 201). Já *MAPK6*, por ser uma MAPK atípica, possui rotas

de ativação ainda pouco compreendidas. A subexpressão de *MAP2K3*, *MAPK9* e *MAPK6* no presente estudo pode indicar uma supressão ampla das vias MAPK, exceto MAPK/ERK, com possíveis implicações na regulação da resposta ao estresse, diferenciação e apoptose no contexto tumoral analisado. Segundo o estudo realizado por Wu *et al.* (2019), o gene *MAPK6*, que codifica a quinase atípica ERK3, responsável por estar envolvida em processos celulares como proliferação celular, progressão do ciclo celular e diferenciação celular (Cargnello; Roux, 2011), atua como um fator oncogênico no câncer cervical, sendo regulado negativamente pelo microRNA miR-144-3p. Os autores demonstraram que a superexpressão de *MAPK6* promove a proliferação, migração e invasão celular, enquanto sua inibição reduz significativamente o potencial tumoral *in vitro* e *in vivo*. No entanto, em contraste com esses achados, os dados do presente estudo revelaram uma subexpressão de *MAPK6*, o que pode indicar uma diferença funcional associada ao tipo de câncer estudado, à linhagem celular ou ao microambiente tumoral. Esses resultados sugerem que a função de *MAPK6* na tumorigênese pode ser contexto-dependente, variando entre atuar como oncogene ou, possivelmente, não ter papel ativo em determinadas condições tumorais.

O estudo de Piastra e colaboradores (2022) destaca que a expressão do gene *MAP2K3*, que codifica a quinase MKK3, é altamente dependente do tipo tumoral e do microambiente celular. Em tumores agressivos, como o colorretal e melanoma, o gene está frequentemente superexpresso, promovendo proliferação, invasão e resistência a quimioterápicos. No entanto, em tumores de comportamento menos agressivo, como o carcinoma espinocelular do pulmão e o de mama ER+, o *MAP2K3* pode estar subexpresso, se associando a funções onco-supressoras. A subexpressão observada em nosso estudo, no CEM, reforça esse padrão, sugerindo uma menor ativação da via p38 MAPK e, possivelmente, um papel menos proeminente na progressão tumoral, o que é compatível com o fenótipo de crescimento lento e baixa agressividade dessa neoplasia. No presente estudo, foi observada a subexpressão do gene *MAPK9* no CEM. Esse achado pode sugerir o gene *MAPK9*, pode ter participação limitada na progressão tumoral nesse contexto específico. Diferentemente do que é descrito em tumores mais agressivos, como o glioma, onde a superexpressão de *MAPK9* está associada à proliferação celular, invasão e pior prognóstico. A sua baixa expressão no CEM pode refletir a menor atividade mitogênica e invasiva. Esses dados reforçam a heterogeneidade funcional dos genes da via MAPK em diferentes tipos tumorais e ressaltam a importância da análise contextualizada de sua expressão conforme o perfil biológico do tumor estudado. Em conjunto, estes resultados indicam uma modulação atenuada da cascata MAPK p38 e JNK.

VEGFC codifica uma proteína sinalizadora envolvida na angiogênese. No carcinoma espinocelular cutâneo, a superexpressão de *VEGFC* está diretamente associada à progressão tumoral, invasão perineural e pior sobrevida livre de doença, reforçando seu papel na promoção da angiogênese, linfangiogênese e disseminação tumoral. No contexto do CEM, a regulação negativa de *VEGFC* observada pode refletir redução da neovascularização e formação de vasos linfáticos, o que parece ser coerente com o comportamento biológico deste tumor, caracterizado por crescimento lento, baixo grau histológico e reduzida capacidade metastática (García-Pérez *et al.*, 2023).

Nesse estudo, foi observada a subexpressão do gene *PIK3CB* (subunidade catalítica p110 β) no CEM, o que pode sugerir mecanismos alternativos de ativação da via PI3K ou à menor dependência dessa via para manutenção do fenótipo tumoral. Um estudo realizado por Bonin e colaboradores (2019), demonstrou que no câncer de mama a superexpressão de *PIK3CB* está associada a tumores com características menos agressivas, como o subtipo Luminal A, além de estar correlacionada à ausência de metástase linfonodal e a um melhor prognóstico. Essa diferença ressalta que o papel funcional de *PIK3CB* é altamente dependente do contexto tumoral.

Os dados obtidos neste trabalho, indicaram que o gene *PLD1* encontra-se *down-regulated* nas amostras analisadas, o que contrasta com o estudo de Zhou e colaboradores (2024), que mostrou que a superexpressão de *PLD1* promove a fosforilação e a translocação nuclear do fator RELA, aumentando tanto a atividade da via NF- κ B quanto a própria expressão de *PLD1*, favorecendo processos tumorais como proliferação, inflamação e sobrevivência celular. Nesse sentido, a redução da expressão de desse gene observada pode refletir uma quebra desse ciclo, o que pode impactar diretamente a ativação da via NF- κ B e, conseqüentemente, modular eventos associados à progressão tumoral.

O gene *RALB*, é uma pequena GTPase da família RAS-like e nessa pesquisa, o gene *RALB* apresentou-se subexpresso, indicando uma possível ativação reduzida de vias associadas à proliferação, migração e invasão celular. Esse resultado contrasta com achados prévios em outros tipos tumorais, como o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, onde esse gene está frequentemente superexpresso, estando associado a pior prognóstico, maior agressividade tumoral e maior incidência de metástases linfonodais (Zhou *et al.*, 2024). A redução da expressão de *RALB* em nosso modelo pode refletir um perfil biológico menos invasivo ou a ativação de mecanismos moleculares alternativos na progressão do CEM.

A análise de enriquecimento funcional dos genes, foi realizada na ferramenta *Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery* (DAVID) para compreender os

processos biológicos, funções moleculares, composições celulares e vias de sinalização potencialmente impactadas pela alteração na expressão dos genes estudados (Huang *et al.*, 2009). Os genes *MAPK6*, *MAP2K3* e *MAPK9*, *FOS* e *JUN* estão diretamente associados a processos biológicos fundamentais para a tumorigênese, como sinalização celular, resposta ao estresse oxidativo, senescência celular, resposta integrada ao estresse e regulação positiva da transcrição. Além disso, no contexto das funções moleculares, os genes apresentam envolvimento em atividade quinase de proteínas serina/treonina, atividade quinase JUN e atividade de ligação a regiões regulatórias de transcrição, refletindo tanto sua atuação na transmissão de sinais quanto no controle da expressão gênica (Cargnello; Roux, 2011; Shi *et al.*, 2024). No que se refere às vias de sinalização, os dados do KEGG indicam que esses genes estão implicados em diversas vias relacionadas à inflamação e progressão tumoral, incluindo a via de sinalização do TNF, via do receptor Toll-like e via do MAPK, além de estarem associados a contextos tumorais, como carcinoma colorretal e câncer de próstata. Esse perfil molecular pode refletir um comportamento biológico particular do CEM. A subexpressão das MAPKs pode sugerir uma menor dependência da ativação canônica dessa cascata, enquanto a superexpressão de *FOS* e *JUN* indica a ativação de vias alternativas ou mecanismos compensatórios que mantêm a transcrição de genes envolvidos na proliferação, sobrevivência e inflamação (Xue *et al.*, 2025). Esses dados reforçam a complexidade da sinalização na tumorigênese, onde a regulação não é linear, e diferentes pontos da cascata podem apresentar comportamentos opostos, dependendo do tipo tumoral e do microambiente.

O gene *VEGFC* está associado a vias importantes como sinalização do TNF, MAPK, Ras e relaxina, além de processos relacionados à adesão celular e transdução de sinais (Liu *et al.*, 2023). Este achado pode sugerir que o CEM pode apresentar um perfil molecular menos dependente de mecanismos de neovascularização linfática e progressão associada à ativação dessas vias, o que pode impactar tanto no comportamento biológico quanto na resposta terapêutica desse subtipo tumoral. Já o gene *PIK3CB*, revelou sua participação em processos biológicos como transdução de sinal, quimiotaxia e resposta à isquemia. As funções moleculares associadas incluem atividade quinase de proteína serina/treonina, além de interações importantes como ligação a proteínas e ligação ao ATP, essenciais para a fosforilação de substratos na cascata de sinalização. Quanto aos componentes celulares, *PIK3CB* está localizado preferencialmente no nucleoplasma e em uma fina ponte citoplasmática formada entre células-filhas no final da citocinese, indicando envolvimento em processos de divisão celular. As vias KEGG associadas foram diversas e envolveram sinalização inflamatória e tumoral, como via do TNF, Ras, receptores Toll-like, checkpoint PD-1, apoptose e câncer de

mama, reforçando seu papel central na regulação da proliferação, sobrevivência e resposta imune (Xu *et al*, 2022).

Já a análise do gene *PLDI* está envolvido em processos cruciais, como quimiotaxia e sinalização da via Ras e fosfolipase D, além de participar da regulação de vias associadas ao câncer, cAMP, GnRH, esfingolipídeos e adesão focal, conforme mostrado pela análise KEGG. A subexpressão de *PLDI* pode impactar diretamente na regulação de processos de migração celular, dinâmica do citoesqueleto e crescimento tumoral, refletindo uma possível redução da capacidade proliferativa e invasiva do tumor (Addassi *et al*, 2025). O gene *RALB* está diretamente ligado à transdução de sinal pela via Ras, atuando em processos como crescimento celular, sobrevivência, transporte vesicular e migração celular. Além disso, o gene participa de múltiplas vias associadas ao câncer, incluindo sinalização do RAS, RAPI e fosfolipase D, além de estar relacionado a neoplasias como câncer pancreático e colorretal. A subexpressão de *RALB* pode indicar uma redução na ativação de processos biológicos fundamentais para a dinâmica tumoral, como adesão celular, remodelação do citoesqueleto e migração, o que pode refletir em um comportamento biológico menos agressivo, pelo menos do ponto de vista da ativação dessas vias específicas (Cameli *et al*, 2022).

Dessa forma, os achados deste estudo revelam um panorama de expressão gênica singular no CEM, caracterizado pela subexpressão de genes componentes das cascatas de sinalização das vias MAPK e PI3K (*MAPK6*, *MAP2K3*, *MAPK9* e *PIK3CB*), associada à superexpressão dos fatores de transcrição a jusante *FOS* e *JUN*. Esse perfil pode indicar uma menor dependência das rotas proliferativas e angiogênicas clássicas, com possível ativação de mecanismos compensatórios de sinalização próprios desse subtipo tumoral, o que está em consonância com sua histopatologia de baixo grau, crescimento lento e baixa taxa metastática. Esses achados ampliam a base de conhecimento sobre esse tumor, oferecendo subsídios para novas estratégias diagnósticas e potenciais abordagens terapêuticas direcionadas. Futuras investigações, com maior número de amostras e validação funcional, serão essenciais para consolidar esses dados e aprofundar a compreensão sobre o papel dessas vias na biologia do CEM.

A identificação de *FGF1* e *VEGFC*, ambos envolvidos em angiogênese e mitogênese, reforça o papel de fatores de crescimento na remodelação do microambiente tumoral e na promoção de neovascularização, processos essenciais para o crescimento e disseminação tumoral. A ativação dessas vias, mesmo diante da supressão parcial da via RAS-MAPK, pode ocorrer por mecanismos alternativos, como ativação de vias não canônicas (Nikolaev *et al.*, 2018). A modulação de genes *ARHGEF* (*ARHGEF2* e *ARHGEF11* up-regulados; *ARHGEF7*

down-regulado) indica desregulação da dinâmica do citoesqueleto via Rho GTPases, impactando migração remodelação do citoesqueleto, processos fundamentais para a progressão tumoral e metástase (Lei *et al.*, 2018, Nanda *et al.*, 2023). A ativação de fatores de troca de nucleotídeos de guanina (GEFs) pode promover rearranjos citosqueléticos e aumentar o potencial invasivo das células tumorais.

Estudos conduzidos por Grunewald *et al.* (2015) e Urano *et al.* (2019) demonstraram que mutações no gene *PIK3CA* podem estar presentes em aproximadamente 40% e 20,7% dos casos de CEM, respectivamente. Essas mutações localizam-se, em sua maioria, nos éxons 9 e 20, incluindo o códon 1047 (Urano *et al.*, 2019). No entanto, no presente estudo, nenhuma das 10 amostras de CEM apresentou mutação no códon 1047 (éxon 20) de *PIK3CA*, sendo todas classificadas como *wild-type*. Essa divergência em relação à literatura pode estar relacionada à heterogeneidade molecular intrínseca do CEM. Além disso, é possível que outras regiões do próprio gene *PIK3CA* ou genes de vias de sinalização associadas, como *HRAS* que apresenta mutações em até 85% dos casos de CEM, tenham maior relevância na população analisada neste estudo.

7. CONCLUSÃO

Neste estudo, foi possível identificar um perfil diferencial de expressão gênica da via Ras no CEM, com destaque para a superexpressão dos genes *FOS* e *JUN* e expressão reduzida de *PLD1*, *MAPK9*, *MAP2K3*, *RALB*, *MAPK6*, *PIK3CB* e *VEGFC*, em comparação com tecido normal de glândula salivar. A análise de enriquecimento funcional indicou que os genes diferencialmente expressos estão envolvidos principalmente com a via MAPK e processos biológicos relevantes para a tumorigênese, como proliferação celular, sobrevivência e diferenciação celular. Por fim, o sequenciamento do gene *PIK3CA* não revelou mutações no códon 1047 nas amostras analisadas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS E PERSPECTIVAS FUTURAS

Como perspectivas, destacam-se a ampliação do número de amostras, caracterização quanto a mutação em *HRAS* (p.Q61R, p.Q61K e p.G13R) e *AKT* (p.E17G e p.E17K) e a realização da avaliação da expressão imunohistoquímica de pERk, pAKT, FOS, JUN e JNK em CEM e em outros tumores de glândulas salivar ricos em células claras. Estes estudos

futuros poderão reforçar o papel da via Ras e suas vias a jusante canônicas e não-canônicas no desenvolvimento do CEM, e o potencial papel diagnóstico e terapêutico dessas moléculas.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADDASSI, Hala A. *et al.* Inhibition of phospholipase D1 reduces pancreatic carcinogenesis in mice partly through a FAK-dependent mechanism. **Carcinogenesis**, v. 46, n. 1, p. bgae071, jan. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1093/carcin/bgae071>. Acesso em: 23 mai. 2025.

BONIN, S. *et al.* PI3K/AKT signaling in breast cancer molecular subtyping and lymph node involvement. **Disease Markers**, v. 2019, n. 1, p. 7832376, nov. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1155/2019/7832376>. Acesso em: 20 mai. 2025.

CARGNELLO, Marie; ROUX, Philippe P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. **Microbiology and molecular biology reviews**, v. 75, n. 1, p. 50-83, mar. 2011. DOI: <https://doi.org/10.1128/mnbr.00031-10> Acesso em: 15 fev. 2025.

CERVANTES-VILLAGRANA, Rodolfo Daniel; GARCÍA-JIMÉNEZ, Irving; VÁZQUEZ-PRADO, José. Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases (RhoGEFs) as oncogenic effectors and strategic therapeutic targets in metastatic cancer. **Cellular Signalling**, v. 109, p. 110749, set. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2023.110749>. Acesso em: 20 mai. 2025

CHAKRABORTY, Joydeep . Entanglement of MAPK pathways with gene expression and its omnipresence in the etiology for cancer and neurodegenerative disorders. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1866, n. 4, p. 194988, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2023.194988>. Acesso em: 20 mar. 2025.

CHIOSEA, Simion I.; MILLER, Megan; SEETHALA, Raja R. HRAS mutations in epithelial–myoepithelial carcinoma. **Head and Neck Pathology**, v. 8, n. 2, p. 146-150, nov. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12105-013-0506-4>. Acesso em: 15 fev. 2025.

CSEH, Botond; DOMA, Eszter; BACCARINI, Manuela. “RAF” neighborhood: Protein–protein interaction in the Raf/Mek/Erk pathway. **FEBS Letters**, v. 588, n. 15, p. 2398-2406, ago. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2014.06.025>. Acesso em: 15 fev. 2025.

CUADRADO, Ana; NEBREDA, Angel R. Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. **Biochemical Journal**, v. 429, n. 3, p. 403-417, jul. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1042/BJ20100323>. Acesso em: 20 mar. 2025.

CUESTA, Cristina; ARÉVALO-ALAMEDA, Cristina; CASTELLANO, Esther. The importance of being PI3K in the RAS signaling network. **Genes**, v. 12, n. 7, p. 1094, jun. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/genes12071094>. Acesso em: 15 fev. 2025.

DE LUCA, Antonella *et al.* The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches. **Expert**

Opinion on Therapeutic Targets, v. 16, n. sup2, p. S17-S27, mar. 2012. DOI: <https://doi.org/10.1517/14728222.2011.639361>. Acesso em: 15 fev. 2025.

DHILLON, Amardeep Singh *et al.* MAP kinase signalling pathways in cancer. **Oncogene**, v. 26, n. 22, p. 3279-3290, mai. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210421>. Acesso em: 15 fev. 2025.

EMMERSON, Elaine *et al.* Salivary glands regenerate after radiation injury through SOX2-mediated secretory cell replacement. **EMBO Molecular Medicine**, v. 10, n. 3, p. e8051, jan. 2018. DOI: <https://doi.org/10.15252/emmm.201708051>. Acesso em: 18 fev. 2025.

FONSECA, Isabel *et al.* Global transcriptome and sequenome analysis of formalin-fixed salivary epithelial–myoepithelial carcinoma specimens. **Genes, Chromosomes and Cancer**, v. 54, n. 4, p. 249-259, dez. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1002/gcc.22238>. Acesso em: 27 fev. 2025.

FRANÇA, Monique Sedlmaier *et al.* Salivary Epithelial-Myoepithelial Carcinoma: Clinical, Histopathological and Molecular Study from A Latin American Case Series with a Novel MSH3 Driver. **Head and Neck Pathology**, v. 19, n. 1, p. 40, mar. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12105-025-01776-0>. Acesso em: 30 mai. 2025

FRUMAN, David A. *et al.* The PI3K pathway in human disease. **Cell**, v. 170, n. 4, p. 605-635, ago. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.029>. Acesso em: 23 mar. 2025

GAO, Zhi *et al.* PAK3 promotes the metastasis of hepatocellular carcinoma by regulating EMT process. **Journal of Cancer**, v. 13, n. 1, p. 153, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.7150/jca.61918>. Acesso em: 30 mai. 2025

GARCÍA-PÉREZ, Omar *et al.* VEGFC gene expression is associated with tumor progression and disease-free survival in cutaneous squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 1, p. 379, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms25010379>. Acesso em: 10 mai. 2025

GORE, Mitchell R. Epithelial-myoepithelial carcinoma: a population-based survival analysis. **BMC Ear, Nose and Throat Disorders**, v. 18, n. 1, p. 15, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12901-018-0063-2>. Acesso em: 15 mai. 2025.

GRUNEWALD, Inga *et al.* Targeted next generation sequencing of parotid gland cancer uncovers genetic heterogeneity. **Oncotarget**, v. 6, n. 20, p. 18224, mai. 2015. DOI: <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4015>. Acesso em: 23 fev. 2025.

GUTIERREZ-ERLANDSSON, Sylvia *et al.* R-RAS2 overexpression in tumors of the human central nervous system. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 1, p. 127, out. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-127>. Acesso em: 23 fev. 2025.

HAN, Hui; PAN, Li-Na. Clinical features and prognosis of primary epithelial-myoepithelial carcinoma of salivary gland: A Surveillance, Epidemiology, and End Results database-based study. **Cancer Control**, v. 31, p. 10732748241288419, nov. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1177/10732748241288419>. Acesso em: 23 fev. 2025.

HAUSER, Belinda R.; HOFFMAN, Matthew P. Regulatory mechanisms driving salivary gland organogenesis. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 115, p. 111-130, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2015.07.029>. Acesso em: 18 fev. 2025.

DUAN, Tinghui *et al.* The association of aberrant expression of FGF1 and mTOR-S6K1 in colorectal cancer. **Frontiers in Oncology**, v. 11, p. 706838, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fonc.2021.706838>. Acesso em: 25 mai. 2025.

HOLMBERG, Kyle V.; HOFFMAN, Matthew P. Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. **Monographs in Oral Science**, v. 24, p. 1, mai. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1159/000358776>. Acesso em: 18 fev. 2025.

HOXHAI, Gerta; MANNING, Brendan D. The PI3K–AKT network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 2, p. 74-88, nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41568-019-0216-7>. Acesso em: 18 mar. 2025.

HU, Jin-Wu *et al.* Identification of FOS as a candidate risk gene for liver cancer by integrated bioinformatic analysis. **BioMed Research International**, v. 2020, n. 1, p. 6784138, mar. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1155/2020/6784138>. Acesso em: 10 jun. 2025.

KALMEGH, Padmashri *et al.* Epithelial-myoepithelial carcinoma with multiple recurrences: An unusual presentation. **Oral Oncology**, v. 145, p. 106538, out. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2023.106538>. Acesso em: 23 fev. 2025.

KAZEROUNIAN, Shiva *et al.* RhoB differentially controls Akt function in tumor cells and stromal endothelial cells during breast tumorigenesis. **Cancer Research**, v. 73, n. 1, p. 50-61, jan. 2013. DOI: <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-11-3055>. Acesso em: 23 jun. 2025.

KUMAR, KG Dharma *et al.* Epithelial-myoepithelial carcinoma of the parotid: A needle in a haystack of carcinomas. **Surgery Case Reports**, v. 5, p. 100105, jul. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.sycrs.2025.100105>. Acesso em: 14 mai. 2025.

LAVOIE, Hugo; GAGNON, Jessica; THERRIEN, Marc. ERK signalling: a master regulator of cell behaviour, life and fate. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 21, n. 10, p. 607-632, jun. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41580-020-0255-7>. Acesso em: 20 mar. 2025.

LEI, Xiong *et al.* ARHGEF7 promotes metastasis of colorectal adenocarcinoma by regulating the motility of cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 53, n. 5, p. 1980-1996, ago. 2018. DOI: <https://doi.org/10.3892/ijo.2018.4535>. Acesso em: 20 mai. 2025.

LIANG, Haiqi *et al.* KRAS expression is a prognostic indicator and associated with immune infiltration in breast cancer. **Breast Cancer**, v. 28, n. 2, p. 379-386, out. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s12282-020-01170-4>. Acesso em: 25 mai. 2025.

LIU, Naiqing *et al.* Expression and clinical significance of fibroblast growth factor 1 in gastric adenocarcinoma. **OncoTargets and Therapy**, p. 615-621, mar. 2015. DOI: <https://doi.org/10.2147/OTT.S79204>. Acesso em: 25 mai. 2025.

LIU, Zhen-Ling *et al.* Angiogenic signaling pathways and anti-angiogenic therapy for cancer. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 8, n. 1, p. 198, mai. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41392-023-01460-1>. Acesso em: 25 mai. 2025.

MAGNE, Nathalie *et al.* PAK3 is a key signature gene of the glioma proneural subtype and affects its proliferation, differentiation and growth. **Cellular Oncology**, v. 44, n. 6, p. 1257-1271, set. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13402-021-00635-8>. Acesso em: 20 mai. 2025.

MARIANI, Odette *et al.* JUN oncogene amplification and overexpression block adipocytic differentiation in highly aggressive sarcomas. **Cancer Cell**, v. 11, n. 4, p. 361-374, abr.2007. Acesso em: 10 jun. 2025.

MORALES, E. Angelo; WANG, Shaohe. Salivary gland developmental mechanics. **Current Topics in Developmental Biology**, v. 160, p. 1-30, 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2024.05.002>. Acesso em: 18 fev. 2025.

NAKAGURO, Masato; NAGAO, Toshitaka. Epithelial–myoepithelial carcinoma. **Surgical Pathology Clinics**, v. 14, n. 1, p. 97–109, mar. 2021a. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.path.2020.10.002>. Acesso em: 14 fev. 2025.

NAKAGURO, Masato. *et al.* The diagnostic utility of RAS Q61R mutation specific immunohistochemistry in epithelial myoepithelial carcinoma. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 45, n. 7, p. 885–894, jul. 2021b. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001673>. Acesso em: 14 fev. 2025.

NANDA, Suchet *et al.* Rho GTPase activity crosstalk mediated by Arhgef11 and Arhgef12 coordinates cell protrusion-retraction cycles. **Nature Communications**, v. 14, n. 1, p. 8356, dez. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41467-023-43875-y>. Acesso em: 14 mai. 2025

NIKOLAEV, Sergey I. *et al.* Somatic activating KRAS mutations in arteriovenous malformations of the brain. **New England Journal of Medicine**, v. 378, n. 3, p. 250-261, jan. 2018. DOI: DOI: 10.1056/NEJMoa1709449. Acesso em: 14 mai. 2025

OKUYAMA, Kohei *et al.* Epithelial-myoepithelial carcinoma of the minor salivary glands: case series with comprehensive review. **Diagnostics**, v. 11, n. 11, p. 2124, nov. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/diagnostics11112124>. Acesso em: 18 fev. 2025.

PEDERSEN, Anne Marie Lynge *et al.* Salivary functions in mastication, taste and textural perception, swallowing and initial digestion. **Oral Diseases**, v. 24, n. 8, p. 1399-1416, abr. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1111/odi.12867>. Acesso em: 18 fev. 2025.

PIASTRA, Valentina; PRANTEDA, Angelina; BOSSI, Gianluca. Dissection of the MKK3 functions in human cancer: a double-edged sword?. **Cancers**, v. 14, n. 3, p. 483, jan. 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/cancers14030483>. Acesso em: 10 jun. 2025.

PILLAI, Sangeeth *et al.* Development of human salivary gland cell lines for modeling radiation-induced damage in three-dimensional spheroid cultures. **Journal of Tissue Engineering**, v. 16, p. 20417314251326667, abr. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1177/20417314251326667>. Acesso em: 18 fev. 2025.

PIRAINO, Lindsay R.; BENOIT, Danielle SW; DELOUISE, Lisa A. Salivary gland tissue engineering approaches: state of the art and future directions. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1723, jul. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3390/cells10071723>. Acesso em: 18 fev. 2025.

SEETHALA, Raja R.; BARNES, E. Leon; HUNT, Jennifer L. Epithelial-myoepithelial carcinoma: a review of the clinicopathologic spectrum and immunophenotypic characteristics in 61 tumors of the salivary glands and upper aerodigestive tract. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 31, n. 1, p. 44-57, jan. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1097/01.pas.0000213314.74423.d8>. Acesso em: 14 fev. 2025.

THORPE, Lauren M.; YUZUGULLU, Haluk; ZHAO, Jean J. PI3K in cancer: divergent roles of isoforms, modes of activation and therapeutic targeting. **Nature Reviews Cancer**, v. 15, n. 1, p. 7-24, dez. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrc3860>. Acesso em: 14 fev. 2025.

URANO, Makoto *et al.* Diagnostic significance of HRAS mutations in epithelial myoepithelial carcinomas exhibiting a broad histopathologic spectrum. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 43, n. 7, p. 984-994, jul. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1097/PAS.0000000000001258>. Acesso em: 14 fev. 2025.

VANLANDINGHAM, Nathan K. *et al.* The mutational profiles and corresponding therapeutic implications of PI3K mutations in cancer. **Advances in Biological Regulation**, v. 87, p. 100934, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jbior.2022.100934>. Acesso em: 14 mar. 2025

VASAN, N.; TOSKA, E.; SCALTRITI, M. Overview of the relevance of PI3K pathway in HR-positive breast cancer. **Annals of Oncology**, v. 30, p. x3-x11, dez. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1093/annonc/mdz281>. Acesso em: 14 mar. 2025

VÁZQUEZ, Alejandro *et al.* Epithelial-myoepithelial carcinoma of the salivary glands: an analysis of 246 cases. **Otolaryngology--Head and Neck Surgery**, v. 153, n. 4, p. 569-574, jul. 2015. DOI: <https://doi.org/10.1177/0194599815594788>. Acesso em: 23 fev. 2025.

WANG, Qing *et al.* Trem2/Syk/PI3K axis contributes to the host protection against *Toxoplasma gondii*-induced adverse pregnancy outcomes via modulating decidual macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 20, n. 9, p. e1012543, set. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1012543>. Acesso em: 23 mar. 2025

WANG, Feng *et al.* Clinical and pathological analysis of 10 cases of salivary gland epithelial-myoepithelial carcinoma. **Medicine**, v. 99, n. 41, p. e22671, out. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022671>. Acesso em: 23 fev. 2025.

WHO CLASSIFICATION OF TUMOURS EDITORIAL BOARD. Head and neck tumours. **Lyon: International Agency for Research on Cancer**, 5. ed., v. 9, 2022. (WHO Classification of Tumours Series).

WU, Jingli *et al.* MiR-144-3p: a novel tumor suppressor targeting MAPK6 in cervical cancer. **Journal of Physiology and Biochemistry**, v. 75, n. 2, p. 143-152, abr. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s13105-019-00681-9>. Acesso em: 23 jun. 2025.

WOCKNER, R. S. *et al.* Epithelial–myoepithelial carcinoma of the maxillofacial and sinonasal region: a systematic review of presenting characteristics, treatment modalities, and associated outcomes. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 52, n. 1, p. 1-12, jan. 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2022.05.005>. Acesso em: 27 fev. 2025.

XU, Wei *et al.* PIK3CB promotes oesophageal cancer proliferation through the PI3K/AKT/mTOR signalling axis. **Cell Biology International**, v. 46, n. 9, p. 1399-1408, jul. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1002/cbin.11847>. Acesso em: 20 mai. 2025.

YUE, Jicheng; LÓPEZ, José M. Understanding MAPK signaling pathways in apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 7, p. 2346, mar.2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ijms21072346>. Acesso em: 20 mar. 2025.

YOO, Jinyoung; ROBINSON, Robert A. Ras gene mutations in salivary gland tumors. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 124, n. 6, p. 836-839, jun. 2000. DOI: <https://doi.org/10.5858/2000-124-0836-RGMISG>. Acesso em: 15 fev. 2025.

ZHANG, Wei; LIU, Hui Tu. MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells. **Cell Research**, v. 12, n. 1, p. 9-18, mar. 2002. DOI: <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290105>. Acesso em: 15 fev. 2025.

ZHAO, Xinyuan *et al.* Saliva metabolomics: a non-invasive frontier for diagnosing and managing oral diseases. **Journal of Translational Medicine**, v. 23, n. 1, p. 582, mai. 2025. DOI: <https://doi.org/10.1186/s12967-025-06587-z>. Acesso em: 18 fev. 2025.

ZHOU, Ya-Qing *et al.* A positive feedback loop between PLD1 and NF- κ B signaling promotes tumorigenesis of nasopharyngeal carcinoma. **Journal of Genetics and Genomics**, v. 51, n. 10, p. 997-1006, out. 2024. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2024.06.004>. Acesso em: 18 mai. 2025.