

MARIANA SATURNINO DE NORONHA

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EZH2 EM
CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO E ADENOMA PLEOMÓRFICO**

**Faculdade de Odontologia
Universidade Federal de Minas Gerais
Belo Horizonte
2022**

Mariana Saturnino de Noronha

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EZH2 EM CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO E ADENOMA PLEOMÓRFICO

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Odontologia – área de concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa de Fátima Bernardes

Coorientadora: Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Belo Horizonte
2022

Ficha Catalográfica

N852a
2822
T Noronha, Mariana Saturnino de.
Avaliação da expressão da proteína EZH2 em carcinoma
adenoide cístico e adenoma pleomórfico / Mariana Saturnino
de Noronha. -- 2822.

53 f. : il.

Orientadora: Vanessa de Fátima Bernardes.

Coorientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Imuno-histoquímica. 2. Proteína potenciadora do
homólogo 2 de zeste. 3. Neoplasias das glândulas salivares.
4. Carcinoma adenoide cístico. 5. Adenoma pleomorfo. I.
Bernardes, Vanessa de Fátima. II. Aguiar, Maria Cássia
Ferreira de. III. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Odontologia. IV. Título.

BLACK - 0847

Elaborada por: Mateus Henrique Silva Trindade • CRB 6/3883.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

AVLIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA EZH2 EM CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO E ADENOMA PLEOMÓRFICO

MARIANA SATURNINO DE NORONHA

Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Doutor em ODONTOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA BUCAL.

Aprovada em 20 de julho de 2022, pela banca constituída pelos membros:

Profa. Vanessa de Fátima Bernardes - Orientador
UFMG

Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar
UFMG

Profa. Giovanna Ribeiro Souto
PUCMG

Prof. Bruno Augusto Benevenuto de Andrade
Universidade Federal do Rio de Janeiro

Profa. Sílvia Ferreira de Sousa
UFMG

Profa. Felipe Paiva Fonseca
UFMG

Belo Horizonte, 20 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Giovanna Ribeiro Souto**, Usuário Externo, em 20/07/2022, às 12:08, 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 20/07/2022, às 12:09, 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 **Bruno Augusto Benevenuto de Andrade**, Usuário Externo, em 20/07/2022, às 12:09, 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 **Maria Cassia Ferreira de Aguiar, Chefe**, em 20/07/2022, às 12:09, 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 **Felipe Paiva Fonseca, Coordenador(a)**, em 20/07/2022, às 12:10, 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 **Vanessa de Fatima Bernardes, Professora do Magistério Superior**, em 20/07/2022, às 12:11, 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?](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?aca0=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0)

[aca0=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0](https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?aca0=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1604344** e o código CRC **5A00282C**.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter iluminado meu caminho. Por ter me dado alegria nas conquistas e aprendizado nas dificuldades.

À minha mãe, pelo exemplo de honestidade, determinação, amor ao próximo e à profissão. Antes de tudo, uma mulher guerreira, que lutou ao meu lado pelos meus sonhos. Ao meu irmão pelo amor incondicional e cuidado com a caçula. Muitas vezes me apoiando e dando o suporte de pai. À memória do meu pai, que me ensinou a enxergar beleza e alegria em coisas simples da vida. Ao meu companheiro Rafa, pelo incentivo nos desafios e paciência nas dificuldades. À minha família, pela formação ética, suporte afetivo e exemplo diário.

À minha orientadora, professora Vanessa Bernardes, não tenho palavras para expressar minha gratidão. Quanta gentileza, paciência, dedicação e profissionalismo. Se fez presente em dificuldades além da academia, de forma muito generosa. À minha coorientadora, professora Maria Cássia, exemplo de patologista, professora, chefe e mulher. Exemplo de como exercer tantas funções com maestria e leveza. Muito obrigada, Vanessa e Cássia!

Aos meus amigos e colegas de laboratório, alguns de convivência diária e outros à distância, todos sempre presentes de uma maneira especial na minha vida. Em especial meu agradecimento à Karolina Viana que esteve presente e foi fundamental nos momentos finais e mais difíceis da tese.

Aos meus amigos e colegas de trabalho Domenico, Dani e Mara, pela amizade, paciência, disponibilidade e gentileza.

Aos professores da patologia, pela dedicação e excelência no trabalho. Aos professores Lucas, Mauro e Elismauro, pela contribuição indispensável no trabalho. Aos professores Cristiane Squarize e Rogério Castilho, pela disponibilidade em me receber e orientar no projeto de intercâmbio.

À Universidade Federal de Minas Gerais, por toda minha formação acadêmica.

À CAPES, pelo suporte financeiro.

RESUMO

As neoplasias de glândulas salivares apresentam comportamentos diferenciados, que não seguem os padrões clássicos das neoplasias benignas e malignas. A raridade de algumas destas lesões dificulta ainda mais o entendimento dos mecanismos envolvidos na etiopatogenia. Marcadores moleculares como a proteína EZH2 têm sido utilizados na investigação de alterações epigenéticas em diferentes neoplasias, auxiliando na definição do diagnóstico e prognóstico das lesões. O objetivo do presente trabalho é avaliar a expressão da proteína EZH2 e descrever as características clínicas e microscópicas de amostras de carcinoma adenoide cístico (CAC) e adenoma pleomórfico (AP) com ênfase na importância da definição da malignidade da lesão. A análise dos cortes microscópicos corados em Hematoxilina e Eosina dos casos de Adenoma pleomórfico mostraram células epiteliais e mioepiteliais glandulares dispostas em lençóis e estruturas ductiformes em meio a estroma variável. Os casos de Carcinoma adenoide cístico mostraram três padrões distintos de crescimento incluindo formações tubulares, cribriformes e sólidas. Todos os casos de AP e CAC foram positivos para reação imuno-histoquímica para EZH2. As amostras de CAC apresentaram expressão de EZH2 significativamente maior comparado ao AP. As covariáveis metástase em linfonodos, recorrência, padrão histológico, presença de áreas sólidas e invasão perineural foram descritas em relação à marcação de EZH2 em amostras de CAC. Dessa forma, os resultados do estudo melhoram o entendimento das características clínicas e histológicas do CAC, assim como sobre o comportamento das lesões. Além disso, a análise mostra que o EZH2 é um potencial marcador de malignidade e ressalta a importância da validação de marcadores moleculares de alterações epigenéticas.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Proteína potenciadora do homólogo 2 de zeste. Epigenômica. Neoplasias das glândulas salivares. Carcinoma adenoide cístico. Adenoma pleomórfico.

ABSTRACT

EZH2 immunoexpression in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma

Salivary gland neoplasms present different behaviors, which do not follow the classic patterns of benign and malignant neoplasms. The rarity of some of these lesions makes it even more difficult to understand the mechanisms involved in the etiopathogenesis. Molecular markers such as the EZH2 protein have been used to investigate epigenetic changes in different neoplasms, helping to define the diagnosis and prognosis of the lesions. The aim of the study was to evaluate the expression of the EZH2 protein and to describe the clinical and microscopic characteristics of adenoid cystic carcinoma (ACC) and pleomorphic adenoma (PA) which emphasizes the importance of defining the malignancy of the neoplasm. Histopathological analysis of PA cases showed myoepithelial and glandular epithelial cells arranged as duct-like structures and sheets intermingled in the variable stroma and ACC cases showed the three growth patterns, tubular, cribriform and solid forms. All ACC and PA cases were positive for EZH2, with diffuse nuclear staining in neoplastic cells. The ACC samples showed significantly higher EZH2 expression compared to the PA. The covariables nodal metastasis, recurrence, growth pattern, presence of solid areas and perineural invasion have been described in relation to EZH2 staining in ACC samples. The results of the study improve the understanding of the clinical and histological characteristics of ACC, as well as on the behavior of lesions. In addition, the analysis showed that EZH2 is a potential marker of malignancy and highlights the importance of validating molecular markers of epigenetic alterations.

Keywords: Immunohistochemistry. Enhancer of zeste homolog 2 protein. Salivary gland neoplasms. Adenoid cystic carcinoma. Pleomorphic adenoma.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	The PRC2 complex and its function in tri methylation of H3	29
Figura 2.	Microscopic findings of ACC and AP	30
Figura 3.	Immunohistochemical findings of EZH2 in ACC and AP	31
Gráfico 1.	Mann Whitney U results showing significant difference between ACC and AP	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Analysis and measures of central tendency and variability of EZH2 expression in Adenoid Cystic Carcinoma (ACC) samples.....	33
---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	11
2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA	13
2.1 Neoplasias de glândulas salivares	13
2.2 Carcinoma adenoide cístico	14
2.3 Adenoma pleomórfico	16
2.4 Epigenética	17
2.5 <i>Enhancer of Zeste homolog 2 Protein</i> (EZH2).....	18
2.6 EZH2 em neoplasias de glândulas salivares	19
3 OBJETIVOS	20
3.1 Objetivo geral.....	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 METODOLOGIA EXPANDIDA	21
4.1 Aspectos éticos.....	21
4.2 Delineamento do estudo e obtenção da amostra	21
4.3 Cálculo do Poder de Teste.....	21
4.4 Imuno-histoquímica.....	22
4.5 Análise estatística	23
5 ARTIGO – Short communication	24
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética	45
ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido	46

ANEXO C- Projeto de doutorado sanduíche – Michigan University	49
ANEXO D - Atividades desenvolvidas durante o doutorado.....	50

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as neoplasias de glândulas salivares representam 6% das neoplasias de cabeça e pescoço (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Essas lesões apresentam comportamentos distintos, ampla variedade de padrões morfológicos e características histológicas complexas. Dessa forma, o diagnóstico em biópsias incisionais e em fragmentos de tecido limitados, é bastante desafiador (SAGHRAVANI *et al.*, 2013). O carcinoma adenoide cístico (CAC) é neoplasia maligna de glândulas salivares mais comum e apresenta crescimento lento e infiltrativo, frequente invasão perineural e ocasional metástase à distância, principalmente em pulmão. Essas características do tumor e os tratamentos convencionais com cirurgia, radio e quimioterapia disponíveis conferem ao CAC em estágios avançados baixas taxas de sobrevida a longo prazo (DANTAS *et al.*, 2015) e demonstram a importância do desenvolvimento de terapias sistêmicas mais efetivas. O adenoma pleomórfico (AP) é uma neoplasia benigna de glândula salivar caracterizada por apresentar crescimento lento, ser assintomática e ter diversidade de aspectos histopatológicos. Apesar da diferença de comportamento, ambas neoplasias têm origem a partir do mesmo segmento da glândula salivar, o ducto intercalado (BRODETSKYI *et al.*, 2020).

O processo de carcinogênese envolve alterações epigenéticas como modificações em histonas. As alterações pós-translacionais em histonas como acetilação, metilação, fosforilação, desempenham papel fundamental na expressão gênica (KURDISTANI, 2007). A proteína EZH2 é responsável por catalisar a reação de bi e trimetilação na lisina 27 da histona 3 (H3K27me3), que está associada ao silenciamento de genes supressores de tumor. A desregulação da expressão gênica das proteínas do grupo *polycomb* é responsável por atuar na perda de diferenciação de células tumorais, comportamento metastatizante e piora do prognóstico em neoplasias (ANWAR *et al.*, 2021; GLINSKY, 2006). Dessa forma, o estudo de alterações epigenéticas e da expressão de proteínas relacionadas a essas alterações contribui para o entendimento do comportamento das neoplasias de glândulas salivares assim

como no desenvolvimento de terapias alvo mais eficientes. O Objetivo do trabalho foi avaliar a expressão da proteína EZH2 em amostras de carcinoma adenoide cístico e adenoma pleomórfico, enfatizando a importância de se definir a malignidade da lesão.

2 SÍNTESE BIBLIOGRÁFICA

2.1 Neoplasias de glândulas salivares

As neoplasias de glândulas salivares (NGS) apresentam variações fenotípicas, biológicas e clínicas consideráveis. A maioria das NGS são benignas e apenas 20% dos casos são malignas. O adenoma pleomórfico é a neoplasia benigna mais comum (82%), seguido por adenoma de células basais (6%). O Carcinoma mucoepidermoide é a neoplasia maligna mais comum (33%) seguido do carcinoma adenoide cístico (22%) e adenocarcinoma polimorfo (17%). De forma geral, as NGS apresentam crescimento lento, incluindo as neoplasias malignas (HAY *et al.*, 2019).

A distribuição por sexo é semelhante, com leve predileção pelo sexo feminino. No Brasil, cerca de 60% dos casos ocorrem em mulheres, com a razão de prevalência em mulheres: homens de 1,5:1 (SILVA *et al.*, 2018) e acomete principalmente a quinta e sexta década de vida, com idade média de 55 anos (CUNHA *et al.*, 2021; TO *et al.*, 2012). Os tumores podem ocorrer tanto em glândulas salivares menores quanto em glândulas salivares maiores. Em raros casos, tumores malignos podem ocorrer nos ossos gnáticos. Parótida é a localização mais comum (40% dos casos), seguida por palato (27% dos casos), onde ocorre o maior número de neoplasias malignas (51%). Considerando apenas glândulas salivares maiores, 80% dos casos acometem parótida (SILVA *et al.*, 2018).

Fatores etiológicos não são bem esclarecidos, mas, estudos mostram que fatores de risco como nutrição e baixa ingestão de vitaminas A e C, radioterapia em região de cabeça e pescoço, fatores ocupacionais, imunossupressão e infecção pelo vírus Epstein-Barr estão relacionados a esses tumores (DONG, 2001; GUZZO *et al.*, 2009; HORN-ROSS *et al.*, 1997; LICITRA *et al.*, 2003). Alterações epigenéticas também têm sido descritas como possíveis fatores etiológicos (SANTOS *et al.*, 2020).

2.2 Carcinoma adenoide cístico

O Carcinoma adenoide cístico (CAC) foi descrito pela primeira vez por Robin e Laboulbene em 1853 reportando dois casos com características microscópicas de células tumorais em arranjo cribriforme e presença de invasão perineural. Em 1859, Billroth sugeriu o termo “cilindroma”, que foi amplamente utilizado até 1930, quando Spies propôs a atual denominação de carcinoma adenoide cístico (BILLROTH, 1859; ROBIN; LALBOULBENE, 1853; SPIES, 1930). O CAC pode envolver glândulas salivares, lacrimais, mamária, região de seios nasais, paranasais, traqueia e laringe (ANDREASSEN *et al.*, 2018; COCA-PELAZ *et al.*, 2015).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), o CAC representa cerca de 10% de todas as neoplasias de glândulas salivares e 20% das neoplasias malignas de glândulas salivares (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). No Brasil, cerca de 4,4% de todas as neoplasias de glândulas salivares e 17,7% das neoplasias benignas e malignas são representados por CAC (FONSECA *et al.*, 2012). A maior parte das lesões ocorre em glândulas salivares maiores, mais frequentemente em parótida seguida de glândula submandibular (COCA-PELAZ *et al.*, 2015). O CAC é mais comum em adultos de meia idade, entre a quinta e sexta década de vida e mais raro em crianças e jovens (SILVA *et al.*, 2018; WANG *et al.*, 2007). Não tem predileção étnica e a taxa de incidência entre mulheres e homens é 1,5:1 (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Clinicamente o CAC apresenta comportamento indolente, mas com comportamento agressivo a longo prazo, sendo considerado um tumor de alto grau. A apresentação clínica geralmente é um aumento de volume, firme à palpação, de crescimento lento e invasivo, com frequente sintomatologia dolorosa devido à invasão perineural. O envolvimento de nervo facial, com sintomatologia dolorosa e invasão perineural já foram descritos em casos em parótida (VANDER *et al.*, 1999). No palato, pode apresentar superfície ulcerada, destruição óssea e comunicação buco-sinusal. Apresenta recorrência frequente e metástase à distância, principalmente em pulmão (BOBBIO *et al.*, 2008; GAO *et al.*, 2013).

Os aspectos histopatológicos do CAC demonstram a participação de dois tipos celulares principais: as células epiteliais ductais (luminais); e as células mioepiteliais (não luminais), com predominância destas últimas. As células são

dispostas em arranjos variados, variando de lobulado a bastante invasivo. Os tumores podem apresentar três padrões histológicos, são eles: cribriforme, tubular e sólido. Também pode ocorrer uma junção de mais de um padrão histológico. O padrão cribriforme se caracteriza pela presença de ilhas de células basaloides com múltiplos espaços cilíndricos assemelhando-se a espaços císticos. Observa-se a presença de material mucoide hialino dentro dos espaços cilíndricos ou entremeando-os, assim como cordões de células tumorais permeando o material hialino. O padrão tubular caracteriza-se pela presença de túbulos compostos por uma camada dupla composta internamente de células de citoplasma escasso e núcleo hipercorado, circundadas por células não-luminais geralmente de citoplasma claro. O padrão sólido é composto por lençóis de células tumorais epiteliais ou mioepiteliais, com ausência de formações císticas. A presença das células ductais e mioepiteliais corrobora a origem a partir do ducto intercalado (DILLON *et al.*, 2016; EL-NAGGAR *et al.*, 2017; HELLQUIST; SKALOVA, 2014; NEVILLE *et al.*, 2016).

O CAC não é encapsulado e apresenta tendência de recorrência local e metástase, mesmo após o tratamento. Dentre os pacientes diagnosticados com CAC, 40% desenvolvem metástase e cerca de 80%-90% morrem num período de 10-15 anos após esse diagnóstico, em função do alto índice de recidiva e metástase (DILLON *et al.*, 2016; MARCINOW *et al.*, 2014). A evolução do CAC tem sido relacionada às suas características histopatológicas e moleculares. O padrão tubular apresenta o melhor prognóstico, seguindo para o padrão cribriforme. O padrão sólido ou a presença de áreas sólidas, assim como a invasão perineural são indicadores de prognóstico desfavorável. Além do padrão histopatológico, outros fatores prognósticos incluem tamanho (T), localização anatômica, presença ou ausência de metástases (M) no momento do diagnóstico e condição da margem cirúrgica (ANDREASSEN *et al.*, 2018; DAI *et al.*, 2014; MARCINOW *et al.*, 2014). A invasão perineural e invasão linfovascular também são consideradas como determinantes de prognóstico, associadas a padrão sólido de alto grau, metástase nodal e morte (MARCINOW *et al.*, 2014; MARTINS-ANDRADE *et al.*, 2019).

Alterações moleculares estão relacionadas à patogênese do CAC. A translocação t(6;9)(MYB-NFIB) foi descrita na literatura com taxas de sensibilidade variando entre 28 a 100%, mas com alta especificidade para o

CAC. A proteína Myb mostrou alta expressão em tumores que não apresentavam a fusão MYB-NFIB e pode ser um potencial marcador para diagnóstico (ALMEIDA-PINTO *et al.*, 2019; OWOSHO *et al.*, 2021). O papel preditor de prognóstico da translocação e da proteína ainda não é bem estabelecido (FONSECA *et al.*, 2016). Recentemente a OMS descreveu alterações gênicas nos tumores de glândulas salivares. O trabalho ratifica as alterações do MYB em aproximadamente 80% dos casos, incluindo fusão, ativação e amplificação do gene na região 6q22-23. Observa-se também alterações no MYBL1 (fusão, ativação e amplificação) em 10% dos casos de CAC na região 8q13, assim como mutações do gene NOTCH em 14% dos casos na região 9q34.3 (SKALOVA *et al.*, 2022).

O tratamento de escolha para o CAC ainda é cirúrgico, frequentemente associada à radioterapia adjuvante, e a quimioterapia tem sido aplicada a casos não responsivos (COCA-PELAZ *et al.*, 2015; DILLON *et al.*, 2016). O estudo de marcadores moleculares contribui para o desenvolvimento de novas terapias mais eficientes e que melhores as taxas de sobrevida livre de doença.

2.3 Adenoma pleomórfico

Neoplasia de glândula salivar mais comum, o adenoma pleomórfico é uma neoplasia benigna, caracterizado por uma composição de elementos ductais e mioepiteliais. Clinicamente apresenta-se como um aumento de volume, firme à palpação, de crescimento lento e indolor. Geralmente acomete adultos de meia idade com uma discreta predileção pelo sexo feminino. A localização mais comum é o palato e o tumor apresenta-se como um aumento de volume arredondado e de superfície lisa (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; EVERSON; CAWSON, 1985).

Histologicamente o adenoma pleomórfico pode apresentar aspectos diversos, o que caracteriza a denominação “pleomórfico”. A maior parte dos casos apresenta-se bem circunscrito com presença de cápsula, por vezes incompleta e apresentando invasão tumoral. O adenoma pleomórfico apresenta, em proporções variadas, células epiteliais glandulares e mioepiteliais permeando um fundo semelhante ao mesênquima. O componente epitelial pode apresentar-se formando ductos e estruturas císticas, ilhas ou cordões. As células mioepiteliais apresentam morfologia variando desde formato fusiforme a

arredondada com núcleo excêntrico, assemelhando-se à plasmócitos. A lesão pode apresentar aspecto mixomatoso, devido ao acúmulo de material mucoide, ou aspecto condroide, devido à degeneração vacuolar das células. Por vezes pode apresentar áreas eosinofílicas hialinizadas, tecido gorduroso ou osteoide. Apesar das diferenças histológicas e de comportamento, o AP tem a mesma origem do CAC, o ducto intercalado (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; NEVILLE *et al.*, 2016; SPIRO, 1986).

A patogênese do AP ainda não está completamente descrita, assim como quais os fatores que estão relacionados ao risco de malignização. Apesar do comportamento clínico indolente do AP, alguns casos sofrem transformação maligna. A contraparte maligna do AP, conhecido como carcinoma ex adenoma pleomórfico, frequentemente está relacionado a PA extensos e com casos de recidiva (OLSEN; LEWIS, 2001).

Alguns estudos têm demonstrado alterações citogenéticas em cerca de 70% dos casos de AP. O protooncogene PLAG1, localizado no cromossomo 8q12, é o gene mais observado em alterações citogenéticas nos APs. A fusão do PLAG1 foi descrita apenas em casos de AP e carcinomas ex adenoma pleomórfico, altamente específica para esses tumores (KATABI *et al.*, 2018). Em mais de 50% dos casos de AP, têm sido descrito fusões e ampliações no PLAG, e em 25% dos casos observa-se alterações no CTNNB1 nas regiões t(3;8) (p21;q12) . Além disso, a proteína PLAG1 detectada por meio de imunohistoquímica é um marcador bastante sensível em amostras cirúrgicas e citológicas. Observa-se também, em cerca de 10 a 20% dos casos de AP, fusão e amplificação do gene HMGA2, localizado na região 12q13-15 (KATABI *et al.*, 2018; MATSUYAMA *et al.*, 2011; SKALOVA *et al.*, 2022; WASSERMAN *et al.*, 2019).

2.4 Epigenética

O conceito de epigenética foi introduzido pela primeira vez em 1939 por Conrad H. Waddington, o qual descrevia a interação causal entre genes e seus produtos e as manifestações fenotípicas (WADDINGTON, 1939). Posteriormente, epigenética foi definida como alterações estáveis e hereditárias da expressão gênica não relacionadas a alterações na sequência de DNA (BIRD, 2007). Acreditava-se que os genes eram os únicos responsáveis por transmitir

as características biológicas por gerações. Entretanto, esse conceito tem mudado e hoje a literatura mostra que variações não-genéticas (ou epigenéticas) adquiridas durante a vida de um organismo podem frequentemente serem passadas aos seus descendentes. As alterações epigenéticas incluem metilação de DNA, modificações em histonas, remodelação da cromatina e ação de RNA não codificante (CASTILHO *et al.*, 2017).

A estrutura básica da cromatina é denominada nucleossomo. Os nucleossomos são compostos por aproximadamente 147 bases de DNA arranjadas em torno de um octâmero de histonas (CASTILHO *et al.*, 2017). Alterações pós translacionais em histonas ocorrem geralmente na cauda N-terminal em aminoácidos como lisina, guanina e serina e compreendem acetilação, metilação, fosforilação e ubiquitinação. Essas alterações podem alterar o padrão de expressão gênica inibindo ou ativando genes (HATZIAPOSTOLOU; ILIOPOULOS, 2011; KURDISTANI, 2007).

A principal diferença entre as alterações epigenéticas (AE) e genéticas é a reversibilidade da AE. Enquanto as alterações no DNA causadas por mutações são difíceis de serem recuperadas, as enzimas modificadoras da cromatina podem ser bloqueadas por inibidores e a AE pode ser recuperada (SIMON; LANGE, 2008). Marcadores moleculares de alterações genéticas e epigenéticas têm sido alvo de pesquisas como metilação de diversos genes (RASSF1, RARb2, DAPK, AQP1, CECR1, C1QR1, CTAG2, P53AIP1, TDRD12, BEX1, DYNLT3, p53), alterações em histonas como H2AX e EZH2, estudo de miRNAs. Resultados preliminares da revisão de alterações epigenéticas relacionadas à progressão tumoral e prognóstico em tumores de glândulas salivares são demonstrados no Anexo D.

2.5 *Enhancer of Zeste homolog 2 Protein (EZH2)*

O gene *EZH2* codifica a proteína EZH2 que é um importante componente enzimático do grupo *Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)*, que também inclui as proteínas SUZ12, EED1-4 e EZH1. A EZH2 é responsável por catalisar a reação de bi e trimetilação na lisina 27 da histona H3 (H3K27me3), que está associada ao silenciamento de genes supressores de tumor. A desregulação da expressão gênica das proteínas do grupo PRC2 é responsável por atuar na perda de diferenciação de células tumorais, comportamento metastatizante e

pioira do prognóstico em neoplasias (GLINSKY, 2006). Mutações com ganho de função no gene *EZH2* têm mostrado que o aumento da expressão da proteína *EZH2* está associado à resistência ao tratamento quimioterápico em câncer de pulmão, carcinoma de células escamosas e glioblastoma (CHANG *et al.*, 2016; FAN *et al.* 2014; GARDNER *et al.*, 2017), assim como maior agressividade e pior prognóstico em câncer de próstata, mama, renal, melanoma, linfoma folicular e de grandes células B e também em carcinoma adenoide cístico (CAO *et al.*, 2018; KLEER *et al.*, 2003; MORIN *et al.*, 2010; TIFFEN *et al.*, 2015; VARAMBALLY *et al.*, 2002; VÉKONY *et al.*, 2008)

2.6 *EZH2* em neoplasias de glândulas salivares

A definição de diagnóstico e prognóstico de neoplasias de glândulas salivares ainda é um desafio (ARAÚJO *et al.*, 2013). Dessa forma, estudos que avaliem marcadores moleculares de alterações genéticas e epigenéticas são importantes para aprofundar o conhecimento acerca dessas lesões. A atuação da proteína *EZH2* no silenciamento de genes supressores de tumor tem sido alvo de estudos, assim como o papel de marcador molecular para diagnóstico e prognóstico dessa proteína.

Hajósi-Kalcakosz *et al.* (2015) avaliaram 54 amostras de neoplasias malignas de glândula salivar em que a maioria mostrou positividade na marcação para *EZH2*. Os autores também avaliaram 40 amostras de neoplasias benignas, todas negativas para a imunohistoquímica. A proteína *EZH2* mostrou ser um marcador importante da natureza maligna de neoplasias de glândula, todavia não apresentou especificidade para nenhum tumor.

Vékony e colaboradores (2008) avaliaram a expressão de proteínas do grupo PRC2, incluindo a *EZH2* e observaram que lesões malignas de glândula salivar apresentaram aumento significativo da marcação imuno-histoquímica comparado às neoplasias benignas. Em outro estudo, os autores avaliaram amostras de carcinoma adenoide cístico e observaram que lesões com altas taxas de proliferação celular mostraram positividade expressiva para a proteína *EZH2*. Além disso, altas taxas de *EZH2* foram correlacionadas com um prognóstico desfavorável.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão da proteína EZH2 em amostras de carcinoma adenoide cístico e adenoma pleomórfico

3.2 Objetivos específicos

- Descrever a expressão da proteína EZH2 nos diferentes padrões histológicos de CAC;
- Descrever a expressão da proteína EZH2 relacionando às covariáveis: presença de áreas sólidas, presença de invasão perineural, metástase em linfonodos e recorrência da lesão.

4 METODOLOGIA EXPANDIDA

4.1 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido inicialmente à apreciação do Colegiado de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), ao Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas e ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP/UFMG), obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Em seguida, foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais com protocolo número 12235719.9.0000.5149.

4.2 Delineamento do estudo e obtenção da amostra

Trata-se de um estudo transversal, do tipo retrospectivo, com população-alvo constituída por indivíduos com diagnósticos histopatológicos de adenoma pleomórfico e carcinoma adenoide cístico, com amostra de conveniência. Foram utilizadas amostras fixadas em solução de formol a 10% e incluídas em parafina, provenientes de dois serviços brasileiros: Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Araújo Jorge (Goiânia, GO) e Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG (Belo Horizonte, MG). Lâminas coradas por hematoxilina e eosina foram revisadas por duas patologistas oral, experientes, e o diagnóstico das lesões foi confirmado de acordo com a classificação da Organização Mundial de Saúde (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Os dados clínicos foram acessados a partir da ficha clínica dos pacientes incluindo idade, sexo, tamanho do tumor recorrência e metástase nodal.

4.3 Cálculo do Poder de Teste

Considerando que o estudo foi realizado utilizando 16 amostras de CAC e 12 amostras de AP, e que a diferença de EZH2 entre as amostras foi de 28,15, rejeitou-se a hipótese nula em que a diferença entre as respostas é igual a zero com a probabilidade (poder) de 100%. A probabilidade de erro tipo I associado

com o teste de hipótese nula é zero. O cálculo do poder *a posteriori* para as covariáveis padrão histológico, presença de áreas sólidas, invasão perineural, metástase nodal e recorrência mostrou um valor menor que 45%. Dessa forma, não se justifica a realização de análise estatística inferencial (GOMEZ *et al.*, 2017; WASSERSTEIN; LAZAR, 2016). A descrição das medidas de tendência central e variabilidade para EZH2 em relação às covariáveis foi realizada na Tabela I.

4.4 Imuno-histoquímica

Foram realizados cortes de 4µm nas amostras e montados em lâminas polarizadas (StarFrost®, Waldemar Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Braunschweig, Germany). Em seguida foi realizado o seguinte protocolo de acordo com o fabricante:

1. Desparafinização, recuperação de epítomos por calor e reidratação dos cortes em dois banhos de 20 minutos em solução Trilogy® (Cell Marque, Rocklin, CA, USA) utilizando *steamer* a 96°C;
2. Lavagem dos cortes em 5 passagens em água destilada;
3. Bloqueio de peroxidase endógena em banho de 20 minutos em solução de uma parte de peróxido de hidrogênio 3% e uma parte de metanol;
4. Lavagem dos cortes em 5 passagens em água destilada;
5. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4, em três banhos de 5 minutos;
6. Incubação com o anticorpo primário monoclonal EZH2 (D2C9, Cell Signaling, Danvers, MA, USA) em diluição 1:50, em ambiente úmido, por uma hora à temperatura ambiente seguido de 18 horas à 4°C;
7. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4, em três banhos de 5 minutos;
8. Incubação em anticorpo secundário EnVision+ Dual Link System-HRP (Dako, Carpinteria, CA, USA);
9. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4, em três banhos de 5 minutos;
10. Incubação com tetrahidrocloridrato de diaminobenzidina (DAB, Dako, Carpinteria, CA, USA)

11. Banho em água destilada e em seguida lavagem por 10 minutos em água corrente
12. Contracoloração com hematoxilina de Harris por 1 minuto;
13. Passagem rápida em solução aquosa de hidróxido de amônio a 10%;
14. Lavagem em água corrente por 5 minutos,
15. Desidratação dos cortes em banhos de álcool em concentrações crescentes (70%, 90% e etanol absoluto) por 10 minutos,
16. Diafanização dos cortes em dois banhos de xilol por 15 minutos;
17. Montagem das lâminas com lamínulas de vidro e *Permount* (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

Foram utilizadas amostras de tonsila como controle positivo e para controle negativo foi feita a omissão do anticorpo primário.

A análise da marcação foi realizada por uma examinadora, treinada, utilizando microscópio óptico de luz, da marca Zeiss. Foi realizada a contagem de células tumorais negativas e células positivas para marcação nuclear, considerando 10 campos em aumento de 40x. A porcentagem de células marcadas foi obtida pela seguinte fórmula:

$$\text{Células positivas} / (\text{Células positivas} + \text{Células negativas})$$

Em seguida, foi calculada a porcentagem média de marcação dos 10 campos analisados.

4.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando-se o programa SPSS (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY: IBM Corp.) A análise de normalidade dos dados foi feita por meio do teste Shapiro Wilk. O teste Mann Whitney U foi utilizado para comparar as médias da proteína EZH2 entre amostras de CAC e AP. Foi adotado o nível de significância de 0,05.

5 ARTIGO – Short communication

O artigo está em fase de submissão a periódicos internacionais.

EZH2 immunexpression in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: a preliminary study

Mariana Saturnino de Noronha ^a, Maria Cássia Ferreira de Aguiar ^a, Cristiane Helena Squarize ^b, Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu ^c, Elismauro Francisco Mendonça ^d, Vanessa de Fátima Bernardes ^e

^a Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

^b Department of Periodontics and Oral Medicine, University of Michigan School of Dentistry, Ann Arbor, MI, USA.

^c Department of Community and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

^d Department of Stomatologic Sciences, School of Dentistry, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Goiás, Brazil.

^e Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil.

*** Correspondence author:**

Prof. Vanessa F. Bernardes, Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Presidente Antônio Carlos, 6627, 3rd floor, block G, room 60, Belo Horizonte, MG, Brazil. 31.270-901. bernardesvf@icb.ufmg.br

Authors contributions:

Mariana Saturnino de Noronha: Conceptualization; Data curation; Writing - original draft. Maria Cássia Ferreira de Aguiar: Conceptualization; Writing - original draft. Cristiane Helena Squarize: Writing - review & editing. Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu: Formal Analysis. Elismauro Francisco Mendonça: Review & Editing. Vanessa de Fátima Bernardes: Conceptualization; Writing - original draft; Writing - review & editing.

Ethics approval

All samples were obtained after approval by Universidade Federal de Minas Gerais Ethics Committee (12235719.9.0000.5149).

Funding statement

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES - Finance Code 001 – M.S.N was scholarship recipient).

Declarations of interest: none

Word count: 954

Tables/Figures: 5

ABSTRACT

Salivary gland neoplasms present different behaviors, which do not follow the classic patterns of benign and malignant neoplasms. The rarity of some of these lesions makes it even more difficult to understand the mechanisms involved in the etiopathogenesis. Molecular markers such as the EZH2 protein have been used to investigate epigenetic changes in different neoplasms, helping to define the diagnosis and prognosis of the lesions. The aim of the study was to evaluate the expression of the EZH2 protein and to describe the clinical and microscopic characteristics of adenoid cystic carcinoma (ACC) and pleomorphic adenoma (PA) which emphasizes the importance of defining the malignancy of the neoplasm. Histopathological analysis of PA cases showed myoepithelial and glandular epithelial cells arranged as duct-like structures and sheets intermingled in the variable stroma and ACC cases showed the three growth patterns, tubular, cribriform and solid forms. All ACC and PA cases were positive for EZH2, with diffuse nuclear staining in neoplastic cells. The ACC samples showed significantly higher EZH2 expression compared to the PA. The covariables nodal metastasis, recurrence, growth pattern, presence of solid areas and perineural invasion have been described in relation to EZH2 staining in ACC samples. The results of the study improve the understanding of the clinical and histological characteristics of ACC, as well as on the behavior of lesions. In addition, the analysis showed that EZH2 is a potential marker of malignancy and highlights the importance of validating molecular markers of epigenetic alterations.

Keywords: Immunohistochemistry. Enhancer of Zeste homolog 2 Protein. Salivary Gland Neoplasms. Adenoid Cystic Carcinoma. Pleomorphic Adenoma.

1. Introduction

Although Adenoid cystic carcinoma (ACC) and Pleomorphic adenoma (PA) originate from the same segment of the salivary gland, the intercalated duct, these tumors present different natures and clinical behavior. ACC is an aggressive tumor that frequently presents with distant metastases in the lungs, and the overall survival rate after 15 years is approximately 25% [1-2]. PA is a benign salivary gland neoplasia characterized by slow growth and eventual recurrence. Both tumors can benefit from target therapy associated with genetic and epigenetic alterations [3].

The enhancer of zeste homolog 2 protein (EZH2) contributes to epigenetic alterations, specifically histone modifications. EZH2 is a core enzymatic component of polycomb repressive complex 2 (Figure 1), associated with rapid progression in various cancers such as prostate cancer, breast cancer, melanoma, head-and-neck squamous cell carcinoma, and bladder cancer [4-8]. Information is scarce regarding the association of the ACC histopathological patterns and clinical characteristics with the EZH2 protein expression in salivary gland neoplasms. Here, we presented the previous results showing the immunohistochemical expression of the EZH2 protein in ACC and PA, which emphasizes the importance of defining the malignancy of the neoplasm.

2. Materials and methods

This study was approved by the Institutional Research Ethics Committee (12235719.9.0000.5149). Histopathological diagnosis was revised and confirmed by two oral pathologists [1]. The calculation of power *a posteriori* was made, rejecting the null hypothesis with a probability of 100%. The measures of central tendency and variability for EZH2 were described in relation to the studied covariates. Immunohistochemistry was performed using a two-step method and the EnVision detection system (DAKO; Hamburg, Germany). Positive controls consisted of tonsils samples, and negative controls were carried out by omitting the primary antibody. Immunohistochemical positivity was evaluated in 10 high-power fields (400x magnification) by a trained examiner. EZH2 was expressed in the nucleus, and positive and negative tumor cells were counted. The average percentage of positive cells was calculated. Statistical analysis was performed

using SPSS software (IBM Corp. Released 2011. IBM SPSS Statistics for Windows, Version 20.0. Armonk, NY, USA).

3. Results and discussion

The study included 16 cases of ACC and 12 cases of PA. The mean age of ACC patients was 53.13 years, and the most common locations were the parotid gland (26.7%), and the submandibular gland (26.7%), followed by minor salivary glands (26.7%) and the sublingual gland (20.0%). The male to female ratio was 1.66. The histopathological analysis showed the three growth patterns, tubular, cribriform and solid forms (Figure 2C and 2D). The tumor characteristics and analyses are summarized in Table I. In PA cases, the mean age was 44.5 years, most common location was the palate (75.0%), followed by buccal mucosa (16.7%) and superior lip (8.3%). The male to female ratio was 0.5. PA showed myoepithelial and glandular epithelial cells arranged as duct-like structures and sheets intermingled in the variable stroma (Figure 2A and 2B).

All ACC and PA cases were positive for EZH2, with diffuse nuclear staining in neoplastic cells (Figure 3). Comparatively, ACC samples showed more positive neoplastic cells than PA samples (Graphic 1, $*p < 0.05$). After a stratified analysis by sex, age, and location (large and minor salivary gland), the difference remained significant. No strong positivity was observed in the adjacent normal salivary gland. Although the limited sample size, EZH2 emerged as a reliable biomarker for the malignant nature of salivary gland tumors.

The present study showed positive staining in PA and ACC samples, but with a remarkable quantitative difference. We found low expression of EZH2 in PA, which aligns with previous study showing negative expression of EZH2 in benign salivary gland tumors [9]. Thus, EZH2 seems to be relevant for differentiating malignant from benign salivary gland tumors. Similar results were found in other studies of glandular neoplasms, such as breast and prostate cancer [10-13].

EZH2 is an independent biomarker of breast cancer risk in normal breast samples, helping to determine the malignancy risk in benign biopsies [10]. The investigation of such possibility in benign salivary tumors deserves attention and can contribute to determinate the potential to malignant transformation, for example in carcinoma ex pleomorphic adenoma cases.

In ACC cases, we described EZH2 marker concerning clinical and histopathological aspects, like the predominant growth pattern and the presence or absence of solid areas, perineural invasion, nodal metastasis, and recurrence. The measures of central tendency and variability are shown in Table I. It is well known that the ACC solid variant and perineural invasion are associated with poor prognosis [13]. Notably, the highest mean values of EZH2 were observed in cases with nodal metastasis, recurrence, and a predominantly cribriform growth pattern without solid areas and perineural invasion. The findings suggest that the advanced clinical stage represented by recurrence and nodal metastasis is more associated with high levels of EZH2 than the histopathological pattern, giving a new prognostic value for EZH2.

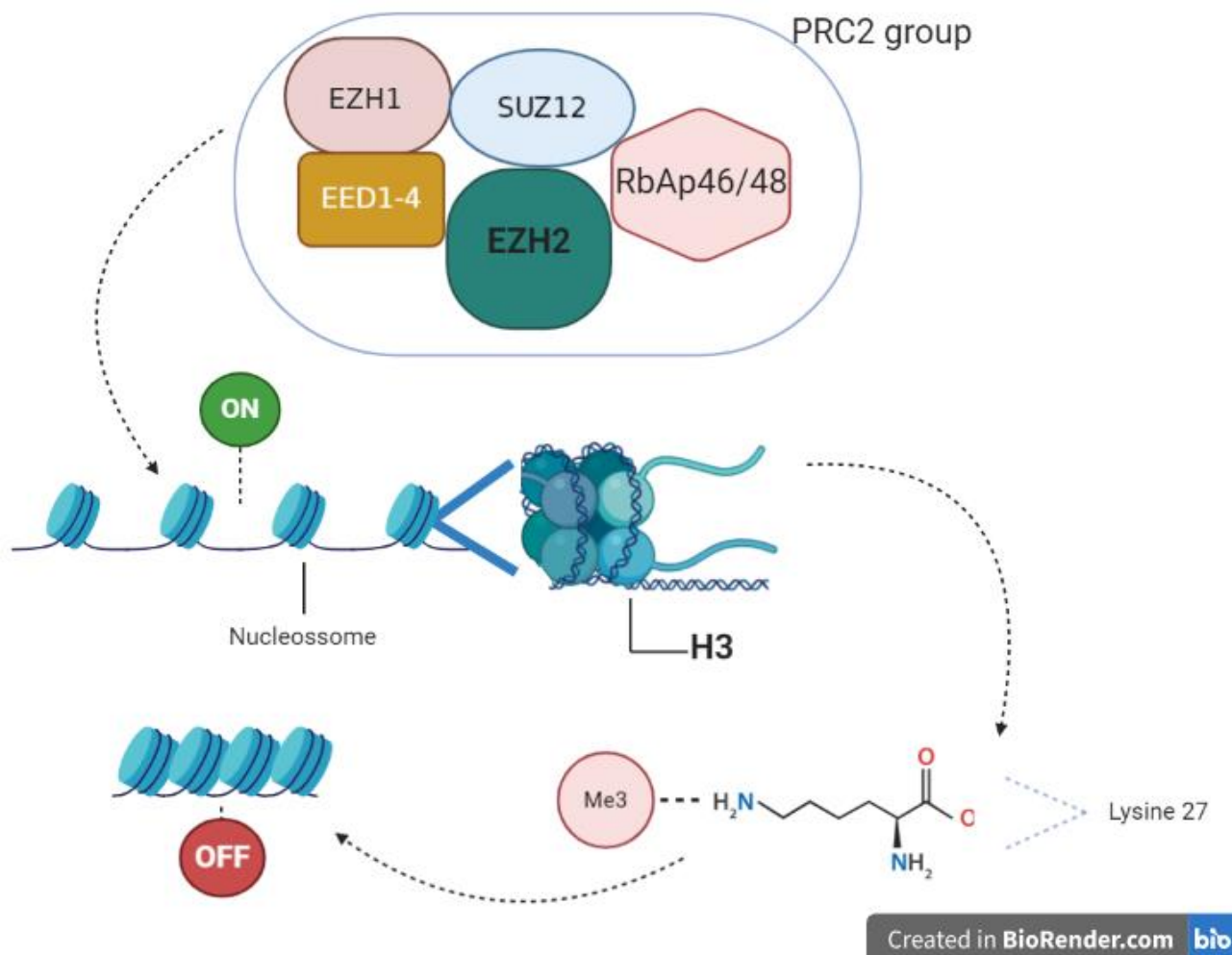
EZH2 is involved in epithelial to mesenchymal transition by interacting with Snail1 and downregulating the expression of E-cadherin [14]. As a result, EZH2 may mediate the epithelial to mesenchymal transition and invasion, increasing metastasis. Metastasis in the lungs is a significant characteristic of ACC. Therefore, further studies are essential to elucidate the role of EZH2 in the progression and distant metastasis of ACC.

Conclusions

EZH2 overexpression in ACC has a potential to be a biomarker of malignancy and advanced progression. In benign salivary gland tumors, the role of EZH2 deserves investigation as a tool to show malignant transformation. Since it is difficult to establish a diagnosis and prognosis of salivary gland tumors, and there are similarities between malignant and benign tumors, our goal was to validate the auxiliary parameters for this group of lesions. The detailed study of EZH2 protein expression according to clinical and histopathological aspects can improve our understanding of ACC behavior.

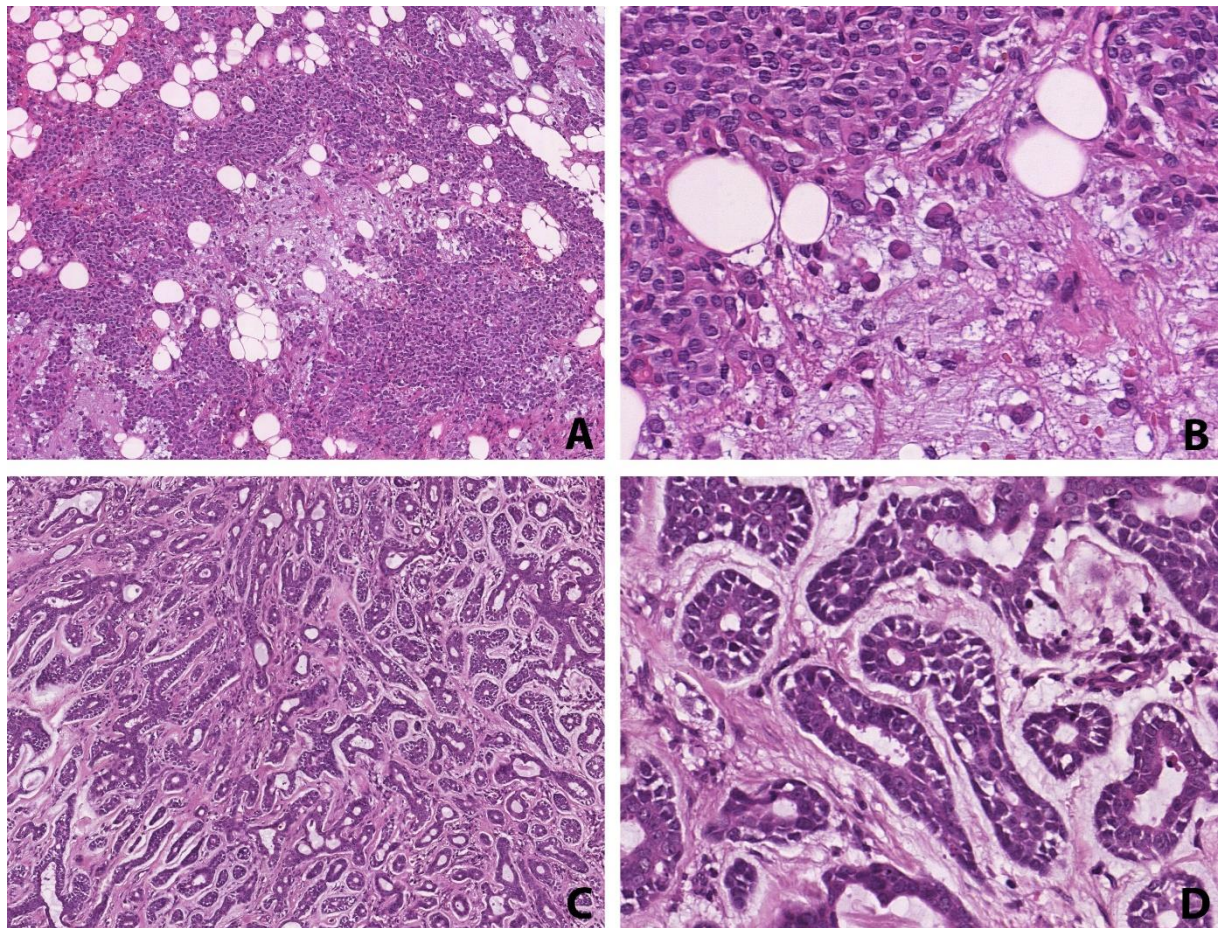
Declarations of interest: none

Figure 1: The PRC2 complex and its function in tri methylation of H3.



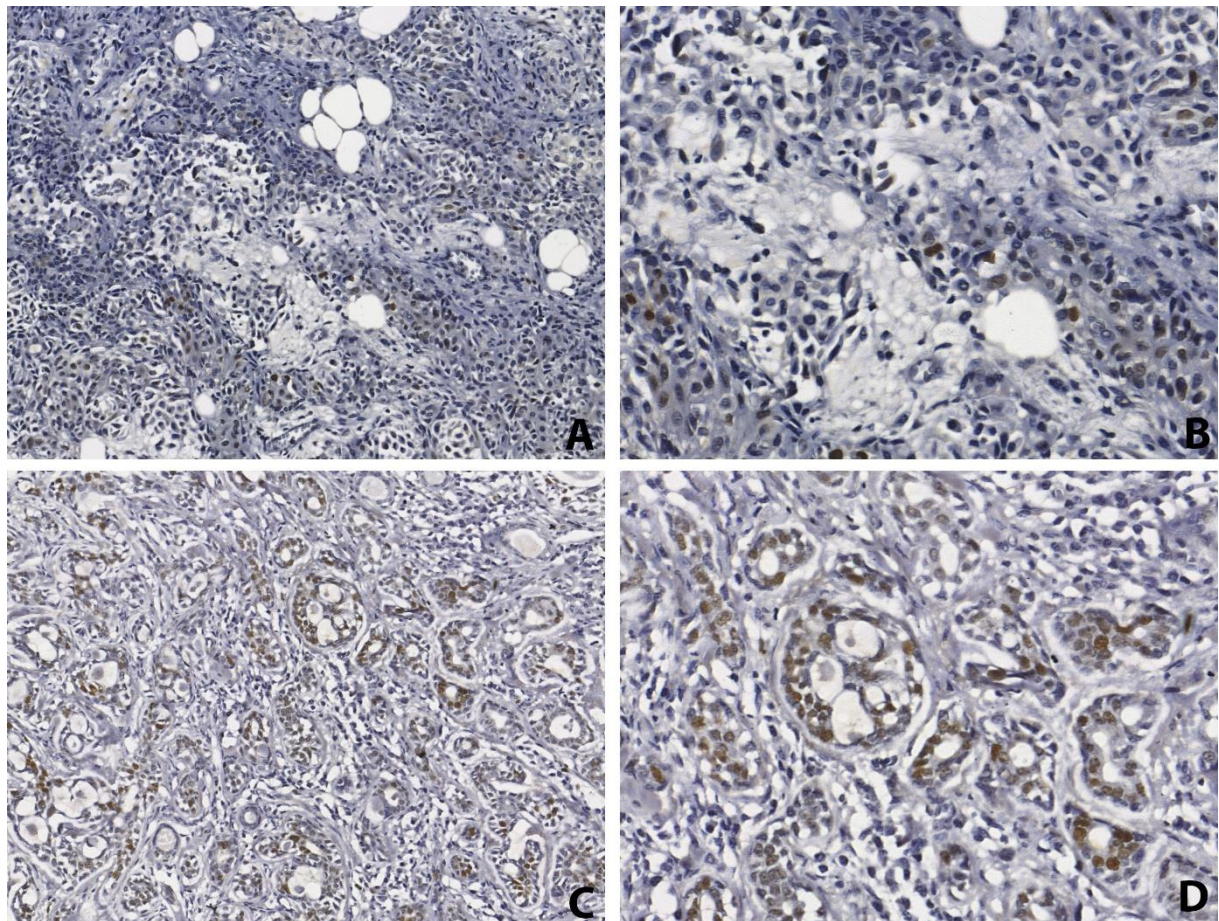
EZH2 is a core component of PRC2 and is co-responsible for trimethylation of lysine 27 of H3. This role is crucial to organization of chromatin around histones altering gene expression.

Figure 2: Microscopic findings of ACC and AP.



(A) Pleomorphic adenoma, stained with Hematoxylin and Eosin, shows glandular epithelial cells and myoepithelial cells in a plasmacytoid shape 10x; (B) Pleomorphic adenoma, Hematoxylin and Eosin 40x; (C) Adenoid Cystic Carcinoma, stained with Hematoxylin and Eosin, shows myoepithelial and glandular epithelial cells arranged as duct-like structures 10x; (D) Adenoid Cystic Carcinoma, Hematoxylin and Eosin 40x.

Figure 3: Immunohistochemical findings of EZH2 in ACC and AP.



(A) EZH2 immunohistochemistry of Pleomorphic adenoma shows scarce positive cells, 10x; (B) Pleomorphic adenoma, 40x; (C) EZH2 immunohistochemistry on the Adenoid Cystic Carcinoma showing diffuse nuclear staining in neoplastic cells. 10x; (D) Adenoid Cystic Carcinoma, 40x.

Graphic 1: Mann Whitney U results showing significant difference between ACC and AP.

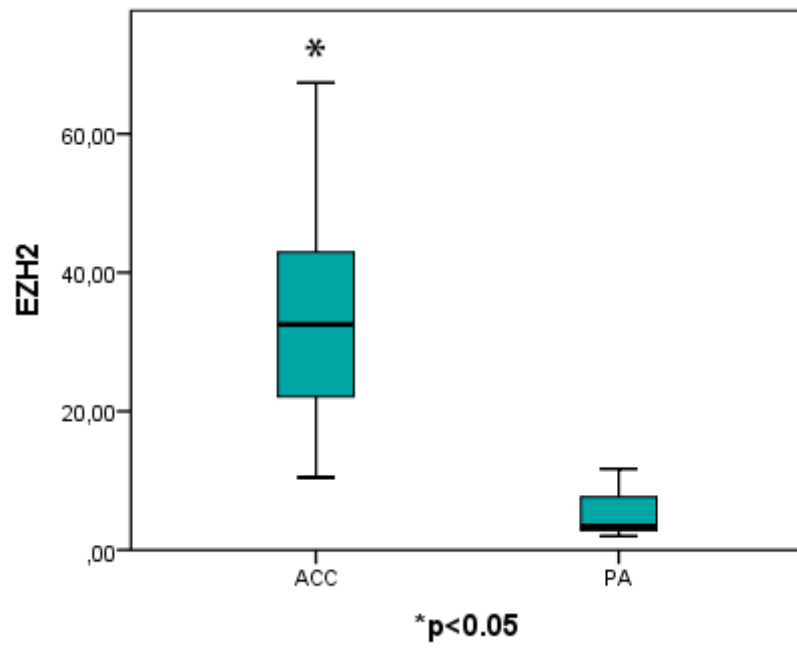


Table I – Analysis and measures of central tendency and variability of EZH2 expression in Adenoid Cystic Carcinoma (ACC) samples.

Covariates	ACC samples	Mean (SD) (%)	Minimum (%)	Median (%)	Maximum (%)
Growth pattern					
Cribriform	50.0%	37.87 (17.20)	19.12	36.67	67.38
Tubular	37.5%	27.78 (13.69)	10.45	32.78	43.20
Solid	12.5%	29.73 (5.68)	25.71	29.73	33.75
Solid areas					
Yes	25.0%	25.44 (6.16)	19.12	24.44	43.20
No	75.0%	35.61 (16.48)	10.45	35.27	67.38
Perineural invasion					
Yes	43.7%	33.79 (10.23)	21.00	31.26	50.98
No	56.3%	32.50 (18.64)	10.45	34.31	67.38
Nodal metastasis					
Yes	37.5%	30.97 (7.43)	25.71	30.97	36.23
No	62.5%	27.43 (13.03)	10.45	26.93	50.98
Recurrence					
Yes	15.0%	36.96 (8.05)	31.26	36.96	42.66
No	85.0%	28.21 (13.34)	10.45	25.71	50.98

Reference

1. A.K. El-naggar, J.K.C. Chan, J.R. Grandis, T. Takata, P.J. Slootweg, World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours, fourth ed. Lyon. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017.
2. M. Huang, D. Ma, K. Sun, G. Yu, C. Guo, F. Gao. Factors influencing survival rate in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 26 (1997) 435-439. doi: 10.1016/s0901-5027(97)80008-2.
3. R. Duan, W. Du, W. Guo. EZH2: a novel target for cancer treatment. *J Hematol Oncol.* 28 (2020) 104. doi: 10.1186/s13045-020-00937-8.
4. J. Cao, K.C. Pontes, R.C. Heijkants, N.J. Brouwer, A. Groenewoud, E.S. Jordanova, M. Marinkovic, S. van Duinen, A.F. Teunisse, R.M. Verdijk, E. Snaar-Jagalska, A.G. Jochemsen, M.J. Jager. Overexpression of EZH2 in conjunctival melanoma offers a new therapeutic target. *J Pathol.* 245 (2018) 433-444. doi: 10.1002/path.5094.
5. E.E. Gardner, B.H. Lok, V.E. Schneeberger, P. Desmeules, L.A. Miles, P.K. Arnold, A. Ni, I. Khodos, E. de Stanchina, T. Nguyen, J. Sage, J.E. Campbell, S. Ribich, N. Rekhtman, A. Dowlati, P.P. Massion, C.M. Rudin, J.T. Poirier, Chemosensitive Relapse in Small Cell Lung Cancer Proceeds through an EZH2-SLFN11 Axis. *Cancer Cell.* 31 (2017) 286-299. doi: 10.1016/j.ccell.2017.01.006.
6. J.W. Chang, S.Y. Gwak, G.A. Shim, L. Liu, Y.C. Lim, J.M. Kim, M.G. Jung, B.S. Koo, EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. *Oral Oncol.* 52 (2016) 66-74. doi: 10.1016/j.oraloncology.2015.11.002.
7. T.Y. Fan, H. Wang, P. Xiang, Y.W. Liu, H.Z. Li, B.X. Lei, M. Yu, S.T. Qi, Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 7 (2014) 6662-6670.
8. P. Sihavong, N. Kitkumthorn, N. Srimaneekarn, D. Bumalee, P. Laphthanasupkul, Differential Expression of EZH2 and H3K27me3 in Oral Verrucous Carcinoma and Oral Verrucous Hyperplasia. *Head Neck Pathol.* 15 (2021) 408-415. doi: 10.1007/s12105-020-01209-0.
9. S. Hajósi-Kalcakosz, E. Vincze, K. Dezső, S. Paku, A. Rókusz, Z. Sápi, E. Tóth, P. Nagy, EZH2 is a sensitive marker of malignancy in salivary gland tumors. *Diagn Pathol.* 10 (2015) 163. doi: 10.1186/s13000-015-0392-z.
10. F. Beca, K. Kensler, B. Glass, S.J. Schnitt, R.M. Tamimi, A.H. Beck, EZH2 protein expression in normal breast epithelium and risk of breast cancer: results from the Nurses' Health Studies. *Breast Cancer Res.* 19 (2017) 21. doi: 10.1186/s13058-017-0817-6.
11. C.G. Kleer, Q. Cao, S. Varambally, R. Shen, I. Ota, S.A. Tomlins, D. Ghosh, R.G. Sewalt, A.P. Otte, D.F. Hayes, M.S. Sabel, D. Livant, S.J. Weiss, M.A. Rubin, A.M. Chinnaiyan, EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial

- cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100 (2003) 11606-11611. doi: 10.1073/pnas.1933744100.
12. S. Varambally, S.M. Dhanasekaran, M. Zhou, T.R. Barrette, C. Kumar-Sinha, M.G. Sanda, D. Ghosh, K.J. Pienta, R.G. Sewalt, A.P. Otte, M.A. Rubin, A.M. Chinnaiyan, The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 419 (2002) 624-629. doi: 10.1038/nature01075.
 13. V.L. Vander Poorten, A.J. Balm, F.J. Hilgers, I.B. Tan, B.M. Loftus-Coll, R.B. Keus, F.E. van Leeuwen, A.A. Hart, The development of a prognostic score for patients with parotid carcinoma. *Cancer.* 85 (1999) 2057-2067.
 14. Q. Cao, J. Yu, S.M. Dhanasekaran, J.H. Kim, R.S. Mani, S.A. Tomlins, R. Mehra, B. Laxman, X. Cao, J. Yu, C.G. Klee, S. Varambally, A.M. Chinnaiyan, Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene.* 27 (2008) 7274-7284. doi: 10.1038/onc.2008.333.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo identificou o potencial como marcador de malignidade da proteína EZH2 ao comparar o AP com CAC. Além disso foi possível observar o aumento da expressão da proteína a partir de áreas de glândula salivar normal, que mostrou negatividade, passando pela marcação positiva do AP e chegando a uma marcação mais intensa no CAC, ressaltando as características de malignidade da lesão. Além disso, a análise das características clínicas e histológicas da lesão, mostrou que a expressão da EZH2 foi maior quando as amostras apresentavam recorrência e metástase em linfonodo. Esses resultados contribuem para estudos que aprofundem sobre o valor prognóstico da EZH2.

A análise de outras alterações epigenéticas dentro das neoplasias de glândulas salivares é importante para o entendimento da etiopatogenia, comportamento e prognóstico das lesões. Além disso, sabendo que alterações epigenéticas podem ser revertidas, novas terapias relacionadas a essas alterações, já têm sido desenvolvidas e testadas. O objetivo é promover tratamentos mais eficientes, que contribuíssem para aumentar a taxa de sobrevivência dos pacientes com CAC. Nesse contexto, fizemos uma revisão sistemática da literatura e destacamos no Anexo D os resultados preliminares da busca. O estudo busca mostrar o impacto de alterações epigenéticas na progressão e no prognóstico de tumores de glândulas salivares.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA-PINTO, Yasmin Dias de et al. t (6; 9)(MYB-NFIB) in head and neck adenoid cystic carcinoma: a systematic review with meta-analysis. **Oral diseases**, v. 25, n. 5, p. 1277-1282, 2019.

ANDREASEN, Simon et al. MicroRNA dysregulation in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland in relation to prognosis and gene fusion status: a cohort study. **Virchows Archiv**, v. 473, n. 3, p. 329-340, 2018.

ANDREASEN, Simon et al. Adenoid cystic carcinomas of the salivary gland, lacrimal gland, and breast are morphologically and genetically similar but have distinct microRNA expression profiles. **Modern Pathology**, v. 31, n. 8, p. 1211-1225, 2018.

ANWAR, Talha et al. Noncanonical Functions of the Polycomb Group Protein EZH2 in Breast Cancer. **The American journal of pathology**, v. 191, n.5, p. 774-783, 2021.

ARAUJO, Vera Cavalcanti de et al. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: an analysis of epidemiological studies and hints for pathologists. **Diagnostic Pathology**, v. 8, n. 1, p. 1-8, 2013.

ASAKA, Ryoichi et al. Sirtuin 1 promotes the growth and cisplatin resistance of endometrial carcinoma cells: a novel therapeutic target. **Laboratory investigation**, v. 95, n. 12, p. 1363-1373, 2015.

BILLROTH, Theodor. Beobachtungen über geschwülste der speicheldrüsen. **Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medicin**, v. 17, n. 5, p. 357-375, 1859.

BIRD, Adrian. Perceptions of epigenetics. **Nature**, v. 447, n. 7143, p. 396, 2007.

BJØRNDAL, Kristine et al. Salivary gland carcinoma in Denmark 1990–2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). **Oral oncology**, v. 47, n. 7, p. 677-682, 2011.

BOBBIO, Antonio et al. Lung metastasis resection of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. **European journal of cardio-thoracic surgery**, v. 33, n. 5, p. 790-793, 2008.

BRILL, Louis B. et al. Analysis of MYB expression and MYB-NFIB gene fusions in adenoid cystic carcinoma and other salivary neoplasms. **Modern pathology**, v. 24, n. 9, p. 1169-1176, 2011.

BRODETSKYI, Igor Sergeevich; MALANCHUK, Vladislav O.; DOSENKO, Victor E. Expressions of microRNA-29a and microRNA-34a in pleomorphic adenomas of salivary glands. **Gland Surgery**, v. 9, n. 6, p. 1914, 2020.

CAO, Jinfeng et al. Overexpression of EZH2 in conjunctival melanoma offers a new therapeutic target. **The Journal of pathology**, v. 245, n. 4, p. 433-444, 2018.

CASTILHO, Rogerio M.; SQUARIZE, Cristiane H.; ALMEIDA, Luciana O. Epigenetic modifications and head and neck cancer: implications for tumor progression and resistance to therapy. **International journal of molecular sciences**, v. 18, n. 7, p. 1506, 2017.

CHANG, Jae Won et al. EZH2 is associated with poor prognosis in head-and-neck squamous cell carcinoma via regulating the epithelial-to-mesenchymal transition and chemosensitivity. **Oral oncology**, v. 52, p. 66-74, 2016.

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

CUNHA, John Lennon Silva et al. Salivary gland tumors: a retrospective study of 164 cases from a single private practice service in Mexico and literature review. **Head and Neck Pathology**, v. 15, n. 2, p. 523-531, 2021.

CUNHA, John Lennon Silva et al. Epidemiologic analysis of salivary gland tumors over a 10-years period diagnosed in a northeast Brazilian population. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 25, n. 4, p. e516, 2020.

DAI, Wei et al. Ubiquitin-specific peptidase 22, a histone deubiquitinating enzyme, is a novel poor prognostic factor for salivary adenoid cystic carcinoma. **PloS one**, v. 9, n. 1, p. e87148, 2014.

DANTAS, Afonso Nóbrega et al. Clinicopathological characteristics and perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: a systematic review. **Brazilian journal of otorhinolaryngology**, v. 81, p. 329-335, 2015.

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

DONG, C.; HEMMINKI, K. Second primary neoplasms among 53 159 haematolymphoproliferative malignancy patients in Sweden, 1958–1996: a search for common mechanisms. **British journal of cancer**, v. 85, n. 7, p. 997-1005, 2001.

EL-NAGGAR, Adel K. et al. **World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours**. 4th. ed. Lyon. International Agency for Research on Cancer (IARC), 2017. 347p.

EVESON, J. W.; CAWSON, R. A. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. **The Journal of pathology**, v. 146, n. 1, p. 51-58, 1985.

FAN, Tian-Yu et al. Inhibition of EZH2 reverses chemotherapeutic drug TMZ chemosensitivity in glioblastoma. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 7, n. 10, p. 6662, 2014.

FONSECA, Felipe Paiva et al. Molecular signature of salivary gland tumors: potential use as diagnostic and prognostic marker. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 45, n. 2, p. 101-110, 2016.

FONSECA, Felipe Paiva et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 114, n. 2, p. 230-239, 2012.

GAO, M. et al. Clinicopathological study of distant metastases of salivary adenoid cystic carcinoma. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 42, n. 8, p. 923-928, 2013.

GARDNER, Eric E. et al. Chemosensitive relapse in small cell lung cancer proceeds through an EZH2-SLFN11 axis. **Cancer cell**, v. 31, n. 2, p. 286-299, 2017.

GERTZ, Melanie et al. Ex-527 inhibits Sirtuins by exploiting their unique NAD⁺-dependent deacetylation mechanism. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 110, n. 30, p. E2772-E2781, 2013.

GLINSKY, Gennadi V. Genomic models of metastatic cancer: functional analysis of death-from-cancer signature genes reveals aneuploid, anoikis-resistant, metastasis-enabling phenotype with altered cell cycle control and activated PcG protein chromatin silencing pathway. **Cell cycle**, v. 5, n. 11, p. 1208-1216, 2006.

GOMEZ, Ricardo Santiago et al. It is about time to stop misusing the P-value?. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 46, n. 2, p. 81, 2017.

GUZZO, Marco et al. Major and minor salivary gland tumors. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 74, n. 2, p. 134-148, 2010.

HAJÓSI-KALCAKOSZ, Szofia et al. EZH2 is a sensitive marker of malignancy in salivary gland tumors. **Diagnostic pathology**, v. 10, n. 1, p. 1-5, 2015.

HATZIAPOSTOULOU, Maria; ILIOPOULOS, Dimitrios. Epigenetic aberrations during oncogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 68, n. 10, p. 1681-1702, 2011.

HAY, Ashley J. et al. Minor salivary gland tumors of the head and neck—Memorial Sloan Kettering experience: incidence and outcomes by site and histological type. **Cancer**, v. 125, n. 19, p. 3354-3366, 2019.

HELLQUIST, H.; SKALOVA, A. **Histopathology of the Salivary Glands**. Berlin, Springer Berlin Heidelberg, 2014.

HORN-ROSS, Pamela L.; LJUNG, Britt-Marie; MORROW, Merrilee. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. **Epidemiology**, p. 414-419, 1997.

KATABI, Nora et al. PLAG1 immunohistochemistry is a sensitive marker for pleomorphic adenoma: a comparative study with PLAG1 genetic abnormalities. **Histopathology**, v. 72, n. 2, p. 285-293, 2018.

KLEER, Celina G. et al. EZH2 is a marker of aggressive breast cancer and promotes neoplastic transformation of breast epithelial cells. **Proceedings of the national academy of sciences**, v. 100, n. 20, p. 11606-11611, 2003.

KOBAYASHI, Junya. Molecular mechanism of the recruitment of NBS1/hMRE11/hRAD50 complex to DNA double-strand breaks: NBS1 binds to γ -H2AX through FHA/BRCT domain. **Journal of radiation research**, v. 45, n. 4, p. 473-478, 2004.

KUO, Linda J.; YANG, Li-Xi. γ -H2AX-a novel biomarker for DNA double-strand breaks. **In vivo**, v. 22, n. 3, p. 305-309, 2008.

KURDISTANI, S. K. Histone modifications as markers of cancer prognosis: a cellular view. **British journal of cancer**, v. 97, n. 1, p. 1-5, 2007.

LI, Jing et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. **science**, v. 275, n. 5308, p. 1943-1947, 1997.

LICITRA, Lisa et al. Major and minor salivary glands tumours. **Critical reviews in oncology/hematology**, v. 45, n. 2, p. 215-225, 2003.

LIU, Han et al. High frequency of loss of PTEN expression in human solid salivary adenoid cystic carcinoma and its implication for targeted therapy. **Oncotarget**, v. 6, n. 13, p. 11477, 2015.

LIEBER, Michael R. The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end joining pathway. **Annual review of biochemistry**, v. 79, p. 181, 2010.

MARCINOW, Anna et al. Clinicopathologic predictors of recurrence and overall survival in adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a single institutional experience at a tertiary care center. **Head & neck**, v. 36, n. 12, p. 1705-1711, 2014.

MARTINS-ANDRADE, Bárbara et al. Prognostic importance of the lymphovascular invasion in head and neck adenoid cystic carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 93, p. 52-58, 2019.

MATSUYAMA, Atsuji et al. Aberrant PLAG1 expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Archiv**, v. 458, n. 5, p. 583-592, 2011.

NEVILLE, B.W; DAMM, D.D. Patologia Oral & Maxilofacial. (4 ed) Rio de Janeiro, Editora Elsevier, 2016.

OLIVEIRA, Flávia Aparecida de et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. **Head and neck pathology**, v. 3, n. 4, p. 271-275, 2009.

OLSEN, Kerry D.; LEWIS, Jean E. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 23, n. 9, p. 705-712, 2001.

OWOSHO, Adepitan A. et al. MYB-NFIB translocation by FISH in adenoid cystic carcinoma of the head and neck in nigerian patients: a preliminary report. **Head and Neck Pathology**, v. 15, n. 2, p. 433-437, 2021.

ROBIN, C.; LALBOULBENE, A. Memoire sur trios productions morbides non decrites. **Compte Rend Soc Biol**. v.5, p.185–196, 1853.

SAGHRAVANIAN, Nasrollah; GHAZI, Narges; SABA, Mojdeh. Clinicopathologic evaluation of salivary gland neoplasms: a 38-year retrospective study in Iran. **Annals of diagnostic pathology**, v. 17, n. 6, p. 522-525, 2013.

SANTOS, Erison S. et al. Epigenetic alterations in salivary gland tumors. **Oral Diseases**, v. 26, n. 8, p. 1610-1618, 2020.

SKÁLOVÁ, Alena; HYRCZA, Martin D.; LEIVO, Ilmo. Update from the 5th edition of the World Health Organization classification of head and neck tumors: salivary glands. **Head and Neck Pathology**, v. 16, n. 1, p. 40-53, 2022.

SILVA, Leorik Pereira da et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: A 20-year retrospective and multicentric study of 2292 cases. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 12, p. 2227-2233, 2018.

SPIES, J. Adenoid cystic carcinoma. **Arch Surg**. v.21, p.365–404, 1930

SPIRO, Ronald H. Salivary neoplasms: overview of a 35-year experience with 2,807 patients. **Head & neck surgery**, v. 8, n. 3, p. 177-184, 1986.

STECK, Peter A. et al. Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. **Nature genetics**, v. 15, n. 4, p. 356-362, 1997.

SIMON, Jeffrey A.; LANGE, Carol A. Roles of the EZH2 histone methyltransferase in cancer epigenetics. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 647, n. 1-2, p. 21-29, 2008.

SQUARIZE, Cristiane H. et al. PTEN deficiency contributes to the development and progression of head and neck cancer. **Neoplasia**, v. 15, n. 5, p. 461-471, 2013.

TIFFEN, Jessamy; GALLAGHER, Stuart J.; HERSEY, Peter. EZH 2: an emerging role in melanoma biology and strategies for targeted therapy. **Pigment cell & melanoma research**, v. 28, n. 1, p. 21-30, 2015.

TO, Victor Shing Howe et al. Review of salivary gland neoplasms. **International Scholarly Research Notices**, v. 2012, 2012.

VANDER POORTEN, Vincent LM et al. The development of a prognostic score for patients with parotid carcinoma. **Cancer: Interdisciplinary International Journal of the American Cancer Society**, v. 85, n. 9, p. 2057-2067, 1999.

VARAMBALLY, S. *et al.* The Polycomb Group Protein EZH2 Is Involved in Progression of Prostate Cancer. **Nature (London)**, v. 419, n. 6907, p. 624-29, 2002.

VÉKONY, Hedy et al. High expression of Polycomb group protein EZH2 predicts poor survival in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Journal of clinical pathology**, v. 61, n. 6, p. 744-749, 2008.

VÉKONY, Hedy et al. Deregulated expression of p16INK4a and p53 pathway members in benign and malignant myoepithelial tumours of the salivary glands. **Histopathology**, v. 53, n. 6, p. 658-666, 2008.

WADDINGTON, C. H. Preliminary notes on the development of the wings in normal and mutant strains of *Drosophila*. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 25, n. 7, p. 299-307, 1939.

WANG, Dan et al. Intraoral minor salivary gland tumors in a Chinese population: a retrospective study on 737 cases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 104, n. 1, p. 94-100, 2007.

WASSERMAN, Jason K. et al. Metastasizing Pleomorphic Adenoma: Recurrent PLAG1/HMGA2 Rearrangements and Identification of a Novel HMGA2-TMTC2 Fusion. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 43, n. 8, p. 1145-1151, 2019.

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

WASSERSTEIN, Ronald L.; LAZAR, Nicole A. The ASA statement on p-values: context, process, and purpose. **The American Statistician**, v. 70, n. 2, p. 129-133, 2016.

WAGENER, Nina et al. The enhancer of zeste homolog 2 gene contributes to cell proliferation and apoptosis resistance in renal cell carcinoma cells. **International journal of cancer**, v. 123, n. 7, p. 1545-1550, 2008.

ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS

**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP****DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DE PLOIDIA E EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS H2AX E EZH2 EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Pesquisador: Vanessa de Fátima Bernardes

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12235719.9.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.386.659

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 12 de Junho de 2019

Assinado por:
Eliane Cristina de Freitas Rocha
(Coordenador(a))

ANEXO B - Termo de Consentimento Livre Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O Sr. (a) está sendo convidado (a) como voluntário (a) a participar da pesquisa “**Avaliação de ploidia e expressão das proteínas H2AX e EZH2 em neoplasias de glândulas salivares**”. Pedimos a sua autorização para a utilização do material biológico humano incluídos em blocos de parafina do Biorrepositório do Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG. Também solicitamos sua autorização para utilizar dados da sua ficha clínica. A utilização do seu material biológico e de seus dados está vinculada somente a este projeto de pesquisa ou se Sr. (a) concordar em outros futuros. Nesta pesquisa pretendemos avaliar ploidia e a expressão das proteínas H2AX e EZH2 em amostras de neoplasias de glândulas salivares e em amostras de glândulas salivares normais.

A sua participação na pesquisa consiste em permitir que utilizemos uma parte da lesão que foi retirada de sua boca, transportada e processada no Biorrepositório do Laboratório de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG onde ficará armazenada sob a guarda da pesquisadora responsável. Iremos examinar mais detalhadamente como a lesão se desenvolveu. Assim, pedimos sua autorização para utilizar essa amostra e também os dados de sua ficha clínica. Não será realizado nenhum procedimento direto com você voluntário(a), mas o uso do material e de seus dados apresenta o risco de constrangimento em caso de quebra de sigilo ou de identificação pessoal. Esse risco, porém, será minimizado por controle dos dados e anonimato dos participantes, ou seja, usaremos códigos que não identificarão seu nome. A pesquisa contribuirá para melhorar o entendimento das neoplasias de glândulas salivares.

Para participar deste estudo o Sr. (a) não terá nenhum custo, nem receberá qualquer vantagem financeira. Apesar disso, caso sejam identificados e comprovados danos provenientes desta pesquisa, o Sr.(a) tem assegurado o direito à indenização. O Sr. (a) terá o esclarecimento sobre o estudo em qualquer aspecto que desejar e estará livre para participar ou recusar-se a participar e a qualquer tempo e sem quaisquer prejuízos, pode retirar o consentimento de utilização do material biológico, valendo a desistência a partir da data de formalização desta. A sua participação é voluntária, e a recusa em participar não acarretará qualquer penalidade ou modificação na forma em que o Sr. (a) é atendido (a) pelo pesquisador, que tratará a sua identidade com padrões profissionais de sigilo.

Os resultados obtidos pela pesquisa, a partir de seu material biológico, estarão à sua disposição quando finalizada. Seu nome ou o material que indique sua participação não será liberado sem a sua permissão. O (A) Sr. (a) não será identificado (a) em nenhuma publicação que possa resultar.

Este termo de consentimento encontra-se impresso em duas vias originais, sendo que uma será arquivada pelo pesquisador responsável, no Serviço de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG, e a outra será fornecida ao Sr. (a).

Os dados utilizados na pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador responsável por um período de 5 (cinco) anos na sala 3201 da Faculdade de Odontologia da UFMG e após esse tempo serão destruídos. Os pesquisadores tratarão a sua identidade com padrões profissionais de sigilo, atendendo a legislação brasileira (Resoluções Nº 466/12; 441/11 e a Portaria 2.201 do Conselho Nacional de Saúde e suas complementares), utilizando as informações somente para fins acadêmicos e científicos.

Eu, _____, portador do documento de Identidade _____ fui informado (a) dos objetivos, métodos, riscos e benefícios da pesquisa “Avaliação de ploidia e expressão das proteínas H2AX e EZH2 em neoplasias de glândulas salivares”, de maneira clara e detalhada e esclareci minhas dúvidas. Sei que a qualquer momento poderei solicitar novas informações e modificar minha decisão de participar se assim o desejar.

Rubrica do pesquisador: _____ *Rubrica do participante:* _____

() Concordo que o meu material biológico seja utilizado somente para esta pesquisa.

() Concordo que o meu material biológico possa ser utilizado em outras pesquisa, mas serei comunicado pelo pesquisador novamente e assinarei outro termo de consentimento livre e esclarecido que explique para que será utilizado o material.

Declaro que concordo em participar desta pesquisa. Recebi uma via original deste termo de consentimento livre e esclarecido assinado por mim e pelo pesquisador, que me deu a oportunidade de ler e esclarecer todas as minhas dúvidas.

Nome completo do participante

Data

Assinatura do participante

Vanessa de Fátima Bernardes

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha
Instituto de Ciências Biológicas/ Departamento de Patologia Geral
CEP: 31270-901 / Belo Horizonte, MG
Telefones: (31) 3409-3046
E-mail: bernardesvf@icb.ufmg.br

Assinatura do pesquisador responsável

Data

Mariana Saturnino de Noronha

Endereço: Avenida Presidente Antônio Carlos, 6627 Pampulha
Faculdade de Odontologia/ Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia
CEP: 31270-901 / Belo Horizonte, MG
Telefones: (31) 988372239
E-mail: mariana.satnoronha@gmail.com

Assinatura do pesquisador (doutoranda)

Data

Em caso de dúvidas, com respeito aos aspectos éticos desta pesquisa, você poderá consultar:

COEP-UFMG - Comissão de Ética em Pesquisa da UFMG

Av. Antônio Carlos, 6627. Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005
Campus Pampulha. Belo Horizonte, MG – Brasil. CEP: 31270-901
E-mail: coep@prpq.ufmg.br. Tel: 3409-4592

ANEXO C - Projeto de doutorado sanduíche – Michigan University

O projeto intitulado “Investigação de histonas em neoplasias de glândulas salivares” recebeu aprovação para financiamento da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior para Doutorado Sanduíche por 12 meses na *University of Michigan*, sob orientação do professor Dr. Rogerio Castilho (Chamada Interna PRPG 06/2019 - Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior - PDSE). Devido à pandemia de COVID-19, a fronteira dos Estados Unidos da América ficou fechada, e o projeto não pôde ser desenvolvido.

O estudo da proteína EZH2 em amostras de neoplasias de glândulas salivares mostrou um aumento da expressão da proteína em CAC comparado a amostras de glândulas salivares normais e de adenoma pleomórfico. Porém, o impacto da fusão MYB-NFIB, presente em 60 a 80% dos casos de CAC, no gene *EZH2* e na expressão da proteína EZH2 ainda não foi elucidado. O trabalho tinha como objetivo caracterizar a expressão da proteína EZH2 e de outras proteínas envolvidas no processo de carcinogênese como PTEN, H2AX e H3K27me3 em linhagem de células com a fusão MYB-NFIB e em amostras de neoplasias de glândulas salivares e avaliar o Ex-527 como modalidade terapêutica.

ANEXO D - Atividades desenvolvidas durante o doutorado

1 Artigos publicados

- 1- De Arruda, José Alcides Almeida; Jácome'Santos, Humberto; Kato, Camila de Nazaré Alves de Oliveira; **de Noronha, Mariana Saturnino**; do Amaral, Márcio Bruno Figueiredo; Silva, Tarcília Aparecida ; Mesquita, Ricardo Alves . Micro-marsupialization technique with suture thread modification for improving the management of oral mucoceles and ranulas: A case series. ORAL SURGERY 2021 Aug 14(3): 241-245 <https://doi.org/10.1111/ors.12603>
- 2- Almeida, Tatiana F.A.; Oliveira, Sicília R.; **de Noronha, Mariana S.**; Moreno, Amália; Mesquita, Ricardo A.; Abreu, Lucas G.; da Silva, Tarcília A. Type IV hypersensitivity associated with restorative materials: Clinical report and systematic literature review. Journal of Prosthetic Dentistry 2021 Apr 2:S0022-3913(21)00108-6. doi: 10.1016/j.prosdent.2021.01.034. Epub ahead of print.
- 3- de Arruda, José Alcides Almeida; **Noronha, Mariana Saturnino**; Abreu, Lucas Guimarães; de Lacerda, Júlio César Tanos; Silva, Tarcília Aparecida; Mesquita, Ricardo Alves. Adenoid ameloblastoma in the posterior maxilla: a case report and review of the literature. Oral and Maxillofacial Surgery 2020 Jun;24(2):243-249. doi: 10.1007/s10006-020-00830-1.
- 4- de Aguiar, Maria Cássia Ferreira; **de Noronha, Mariana Saturnino**; Silveira, Roger Lanes; Araújo, José Augusto Dias; Werkema, Flavio Sirihal; Bell, Diana; Caldeira, Patrícia Carlos. Epithelioid rhabdomyosarcoma: report of the first case in the jaw. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology 2020 Mar 12;S2212-4403(20)30018-3. doi: 10.1016/j.oooo.2020.01.004. Online ahead of print.
- 5- Lehman LFC, **Noronha MS**, Ivana Márcia AD, Costa E Silva RMF, Andrade ÂL, Sousa Lima LF, Alcântara CEP, Domingues R, Ferreira AJ, Silva TA, Mesquita RA. Bioactive glass containing 90% SiO(2) in hard tissue engineering: an in vitro and in vivo characterization study. J Tissue Eng Regen Med. 2019 Jun 20. doi: 10.1002/term.2919. v. 13, p. 1651-1663, 2019.

2 Resumos publicados

- 1- DE ABREU P.T.R., KATO C.N.A.O., **NORONHA M.S.**, ABREU L.G., DA SILVA T.A., MESQUITA R.A. MUCOCELE DE GLÂNDULA DE BLANDIN-NUHN TRATADA COM LASER DE ALTA POTÊNCIA: UM RELATO DE CASO. Revista Intercâmbio - vol. XII - 2017/ISSN - 2176-669x - Página 102: XXVI Jornada Mineira de Estomatologia, 2018 – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais – Belo Horizonte/MG. Anais página 13

- 2- **NORONHA, M. S.**; SCHUCH, LAUREN FRENZEL; CALDEIRA, P. C.; FONSECA, F. P.; BERNARDES, V. F.; AGUIAR, M. C. F. SÍFILIS SECUNDÁRIA: RELATO DE CASO. In: XXVI Jornada Mineira de Estomatologia, 2019, Belo Horizonte. Anais de resumos: painel de caso clínico 2019, 2019. v. 1. p. 115-115.
- 3- **NORONHA, M. S.**; CALDEIRA, P. C. ; FONSECA, F. P. ; SOUSA, S. F. ; BERNARDES, V. F. ; AGUIAR, M. C. F. . ADENOMA PLEOMÓRFICO: RELATO DE CASO. In: XXVI Jornada Mineira de Estomatologia, 2019, Belo Horizonte. Anais de resumos: painel de caso clínico 2019, 2019. v. 1. p. 13-13.

3 Eventos científicos

- 1- 46º Congresso Brasileiro De Estomatologia E Patologia Oral - Julho de 2021
- 2- XIV Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas - Junho/2021
- 3- Comissão de Avaliação dos trabalhos apresentados no XV Encontro Científico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais - Junho/2021
- 4- I Congresso Nacional Multidisciplinar de Covid-19 – Maio/2021
- 5- XVI Reunión Academia Iberoamericana de Patología y Medicina bucal / IX Congreso Asociación Mexicana de Patología y Medicina bucal. 2021.
- 6- 1ª Reunião Online da Sociedade Brasileira de Estomatologia e Patologia Oral – Julho/2020
- 7- I Simpósio de Odontologia Hospitalar, Oncologia e Prótese BucoMaxiloFacial da FAO/UFGM Novembro/2020
- 8- VII Encontro de Patologia da UFGM/I Simpósio Online de Patologia - Agosto/2020
- 9- I Reunião Online de Odontologia e COVID-19 – Junho/2020
- 10-XXVI Jornada Mineira de Estomatologia. 2019

4 Orientação de Trabalho de conclusão de curso

- 1- Trabalho realizado em Grupo. A atuação do cirurgião-dentista no ambiente hospitalar e o impacto da saúde bucal nas infecções respiratórias. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário de Belo Horizonte. Orientador: Mariana Saturnino de Noronha.
- 2- Trabalho realizado em Grupo. Intervenção cirúrgica e terapias adjuvantes no tratamento da osteonecrose dos maxilares induzida por bisfosfonatos. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário de Belo Horizonte. Orientador: Mariana Saturnino de Noronha.
- 3- Trabalho realizado em Grupo. A relevância da odontologia na Síndrome de Sjögren. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em

Odontologia) - Centro Universitário de Belo Horizonte. Orientador: Mariana Saturnino de Noronha.

- 4- Bruna Cristina Ferreira Reis. CARCINOMA EPIDERMOIDE: Relato de Caso. 2020. Trabalho de Conclusão de Curso. (Graduação em Odontologia) - Faculdade Sete Lagoas. Orientador: Mariana Saturnino de Noronha.

5 Bancas de trabalho de conclusão de curso

NORONHA, M.S.; FERNANDES A.F. Participação em banca de Trabalho realizado em Grupo. Radiografia panorâmica: a importância do cirurgião-dentista, na prevenção do acidente vascular cerebral (AVC). 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário de Belo Horizonte.

NORONHA, M. S.; Campos, GPF. Participação em banca de Trabalho realizado em Grupo. Clareamento de consultório: discussões acerca do uso do laser. 2021. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Centro Universitário de Belo Horizonte.

6 Atividades didáticas

2022/1- Conhecimentos morfofuncionais de cabeça e pescoço – Teórica UNA Sete Lagoas

2022/1- Estomatopatologia e Imaginologia – Teórica UNA Sete Lagoas

2022/1- Conhecimentos morfofuncionais de cabeça e pescoço – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2022/1- Estágio em Saúde Coletiva – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2022/1- Estágio em Clínica Integrada IV – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2022/1- Projeto de Extensão em Ensino Clínico – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2022/1- Projeto de Extensão em Estomatologia – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2021/2 - Estágio em Clínica Integrada IV – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2021/2 - Estágio em Cirurgia– Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2021/2 - Estágio em Saúde Coletiva – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2021/2 – Ética e Deontologia - Teórica UNA Sete Lagoas

2021/1 - Estágio em Clínica Integrada IV – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte

2021/1 - Estágio em Clínica Integrada III – Prática Centro Universitário de Belo Horizonte