

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Faculdade de Odontologia
Colegiado de Pós-Graduação em Odontologia

Maria Sissa Pereira Sant'Ana

ANÁLISE DOS MARCADORES DE DINÂMICA MITOCONDRIAL NO
CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO

Belo Horizonte
2024

Maria Sissa Pereira Sant'Ana

ANÁLISE DOS MARCADORES DE DINÂMICA MITOCONDRIAL NO CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO

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

Orientador: Prof. Felipe Paiva Fonseca

Belo Horizonte
2024

Ficha Catalográfica

S237a Sant'Ana, Maria Sissa Pereira.
2024 Análise dos marcadores de dinâmica mitocondrial no
T carcinoma adenoide cístico / Maria Sissa Pereira Sant'Ana. -
- 2024.
56 f. : il.
Orientador: Felipe Paiva Fonseca.
Tese (Doutorado) -- Universidade Federal de Minas
Gerais, Faculdade de Odontologia.
1. Carcinoma adenoide cístico. 2. Metabolismo. 3.
Prognóstico. 4. Neoplasias das glândulas salivares. I.
Fonseca, Felipe Paiva. II. Universidade Federal de Minas
Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK - D047



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

COLEGIADO DO CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

FOLHA DE APROVAÇÃO

ANÁLISE DOS MARCADORES DE DINÂMICA MITOCONDRIAL NO CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO

MARIA SISSA PEREIRA SANT'ANA

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 22 de outubro de 2024, pela banca constituída pelos membros:

Prof. Felipe Paiva Fonseca - Orientador
Faculdade de Odontologia da UFMG

Profa. Vivian Petersen Wagner
Universidade de São Paulo

Profa. Carla Isabelly Rodrigues Fernandes
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Gleyson Kleber Do Amaral Silva
Universidade Federal do Mato grosso do Sul

Profa. Cinthia Veronica Bardalez Lopez de Caceres
Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte, 22 de outubro de 2024.



Documento assinado eletronicamente por **Carla Isabelly Rodrigues Fernandes, Usuário Externo**, em 22/10/2024, às 16:06, 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 **Gleyson Kleber do Amaral Silva, Usuário Externo**, em 22/10/2024, às 16:54, 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 **Cinthia Veronica Bardález López de Cáceres, Usuária Externa**, em 22/10/2024, às 16:58, 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, Professor do Magistério Superior**, em 23/10/2024, às 09:38, 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 **Vivian Petersen Wagner, Usuário Externo**, em 23/10/2024, às 09:48, 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 **3613616** e o código CRC **1C674D3E**.

À minha mãe Maria Amélia e à minha avó Beatriz (in memoriam), por sempre me ensinarem o valor da educação.

AGRADECIMENTOS

Deixo os meus sinceros agradecimentos

A Deus, por ser o meu guia em todos os momentos dessa jornada.

Aos meus pais, Maria Amélia e Simão, pelo amor incondicional, por serem meus maiores incentivadores, por me apoiarem em todas as minhas decisões e me permitirem viver os meus sonhos.

Ao Pablo, por todo amor, companheirismo e apoio ao longo destes anos.

A toda minha família, pela união, força e torcida a cada etapa vencida.

Ao meu orientador, Professor Felipe Paiva Fonseca, pela orientação neste trabalho e pelos valiosos ensinamentos ao longo destes seis anos em que trabalhamos em equipe. Obrigada pelas inúmeras oportunidades durante a trajetória acadêmica. Você é uma grande inspiração de dedicação e excelência profissional.

À Cínthia, por todo apoio, parceria e paciência durante a realização desse trabalho. Obrigada por dividir o seu conhecimento comigo.

Aos professores da Patologia Bucal da FAO-UFMG, Maria Cássia, Tarcília Silva, Patrícia Caldeira, Sílvia Ferreira, Ricardo Gomez e Ricardo Mesquita, agradeço por todo conhecimento compartilhado.

Aos técnicos e colegas do Laboratório de Patologia Bucal, Mara, Dani e Domênico, pelo suporte profissional, paciência e carinho.

À Adriana e Thalita pela amizade sincera, convivência diária e companheirismo desde o mestrado. Vocês são um grande presente da pós-graduação.

À Nathália pela cumplicidade e amizade construída nos últimos anos. Obrigada pela parceria.

A todos os colegas da pós-graduação pelos desafios e momentos compartilhados.

Ao professor Hélder, professora Flávia, e todos os alunos, por terem me recebido com tanto acolhimento no Hospital Universitário João de Barros Barreto, em Bélem.

Aos professores, Pablo, Alan e Márcio, e todos os alunos, pela receptividade e oportunidade de aprendizado na FOP-UNICAMP.

À professora Lynne Bingle, por ter possibilitado a oportunidade de trabalho durante o doutorado sanduíche na University of Sheffield.

À professora Vivian por todos os ensinamentos e momentos compartilhados durante o período que trabalhamos juntas em Sheffield.

À Fatima, que se tornou minha parceira de trabalho incansável em Sheffield.

Aos amigos que fiz durante o intercâmbio, Letícia, Henrique, Leo, Tamires, Mariza e Thaís, os dias por lá foram mais leves com vocês.

Ao Colegiado de Pós-Graduação, em nome do professor Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu, pelo apoio institucional.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) pela qualificação profissional.

Por fim, agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pelo apoio financeiro, por meio da concessão da bolsa de doutorado, e à Coordenação de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao programa CAPES PrInt por terem possibilitado e custeado o período de doutorado sanduíche na University of Sheffield, na Inglaterra.

“Os nossos conhecimentos são a reunião do raciocínio e experiência de numerosas mentes.”

Ralph Waldo Emerson

RESUMO

Os processos de fissão e fusão mitocondrial são conhecidos como dinâmica mitocondrial e a ocorrência de desequilíbrios na atividade mitocondrial está relacionada à patogênese de diversas neoplasias malignas em humanos. No entanto, a importância da dinâmica mitocondrial nos tumores malignos das glândulas salivares permanece desconhecida. Portanto, o objetivo deste estudo foi investigar o significado prognóstico deste processo no carcinoma adenoide cístico (CAC). Cinquenta e sete casos fixados em formol e embebidos em parafina foram selecionados e dispostos em uma matriz para microarranjo tecidual. Os cortes histológicos foram submetidos a reações imunoistoquímicas para as proteínas AMT, DRP1, FIS1, MFN1, MFN2 e OPA1. Os dados clínicos foram coletados dos prontuários dos pacientes, incluindo dados de sobrevida específicos e livres de doença. Observou-se que 50,9% dos casos foram fortemente positivos para AMT e DRP1, e 49,1%, 21,1%, 22,8% e 24,6% fortemente positivos para FIS1, MFN1, MFN2 e OPA1, respectivamente. As reações foram observadas nos componentes celulares epiteliais e mioepiteliais do tumor. A maior expressão de MFN2 foi associada ao padrão microscópico sólido ($p = 0,016$). A super expressão de DRP1 mostrou uma tendência a uma sobrevida reduzida ($p = 0,054$), enquanto OPA1 negativo/fraco mostrou uma tendência a um tempo livre de doença mais baixo ($p = 0,051$) na análise univariada. Nenhum marcador mitocondrial representou um determinante prognóstico independente na análise multivariada. Os marcadores de dinâmica mitocondrial não parecem ter significado prognóstico para pacientes com CAC, mas essas proteínas podem desempenhar um papel importante na sua patogênese.

Palavras-chave: carcinoma adenoide cístico; marcadores mitocondriais; metabolismo; prognóstico; tumores de glândula salivar.

ABSTRACT

Analysis of mitochondrial dynamics markers in adenoid cystic carcinoma

Mitochondrial fission and fusion processes are known as mitochondrial dynamics and the occurrence of imbalances in the mitochondrial activity is related to the pathogenesis of many human cancers. However, the importance of mitochondrial dynamics in malignant salivary gland tumours remains unknown. Therefore, we aimed to investigate its prognostic significance in adenoid cystic carcinoma (AdCC). Fifty-seven formalin-fixed paraffin-embedded cases were retrieved and disposed in tissue microarray. Histological sections were submitted to immunohistochemical reactions against AMT, DRP1, FIS1, MFN1, MFN2 and OPA1 proteins. Clinical data were retrieved from the patients' medical files, including specific and disease-free survival data. It was observed that 50.9% of the cases were strongly positive for AMT and DRP1, and 49.1%, 21.1%, 22.8% and 24.6% strongly positive for FIS1, MFN1, MFN2 and OPA1, respectively. Reactions were observed in both epithelial and myoepithelial components of the tumour. The higher expression of MFN2 was associated with solid microscopic pattern ($p = .016$). DRP1 overexpression showed a trend towards a shorter survival ($p = .054$), while negative/weak OPA1 showed a trend towards a lower disease free survival (DFS) ($p=.051$) in the univariate analysis, but no mitochondrial marker represented an independent prognostic determinant under multivariate analysis. In conclusion, mitochondrial dynamics markers do not seem to carry a prognostic significance for AdCC patients, but these proteins may play an important role in its pathogenesis.

Keywords: adenoid cystic carcinoma; mitochondrial markers; metabolism; prognosis; salivary gland neoplasms.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Padrões histológicos do CAC.....	13
Figura 2 – Imagem ilustrativa do processo de fissão.....	16
Figura 3 – Imagem ilustrativa do processo de fusão.....	16
Quadro 1 – Especificações dos anticorpos utilizados.....	21

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMT	Anti-mitochondrial
CAC	Carcinoma Adenoide Cístico
CK7	Citoqueratina 7
CK14	Citoqueratina 14
CD117	Cluster of Differentiation 117
DRP1	Dynamin 1 Protein
FIS1	Mitochondrial Fission 1 Protein
MFF	Mitochondria Fission Factor
MFN1	Mitofusin 1
MFN2	Mitofusin 2
Mid49/51	Mitochondrial Dynamics Proteins of 49 and 51 kDa
NFIB	Nuclear Factor I B
OPA1	Optic Atrophy 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Carcinoma Adenoide Cístico	14
1.2	Dinâmica mitocondrial	16
2	OBJETIVOS	20
2.1	Objetivo geral.....	20
2.2	Objetivos específicos.....	20
3	METODOLOGIA.....	21
3.1	Aspectos éticos.....	21
3.2	Seleção da amostra.....	21
3.3	Construção de microarranjo tecidual	22
3.4	Imunoistoquímica.....	22
3.5	Análise estatística.....	24
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	25
5	CONCLUSÃO.....	47
	REFERÊNCIAS.....	48
	APÊNDICE A – Atividades desenvolvidas durante o curso de doutorado.....	50
	ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP.....	54

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma Adenoide Cístico

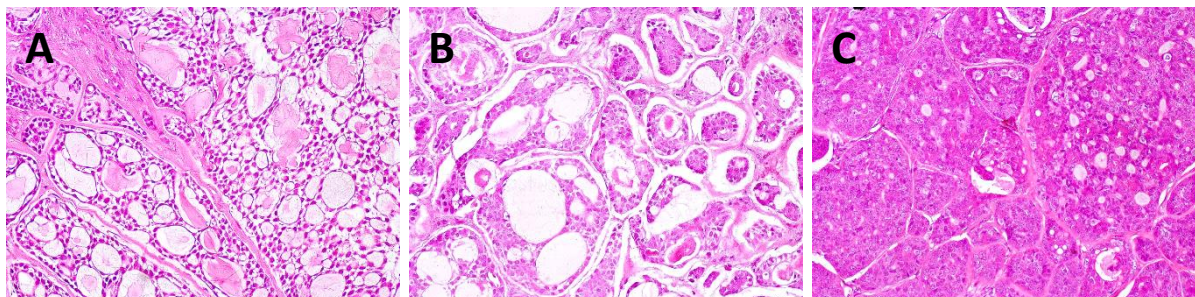
Tumores de glândula salivar são um grupo de neoplasias benignas e malignas com comportamento clínico variável que representam aproximadamente 5% dos tumores de cabeça e pescoço. As neoplasias malignas de glândula salivar tendem a ocorrer em pacientes mais velhos, sendo raramente observadas em crianças e adolescentes. A maioria dos tumores de glândulas salivares malignos é de origem epitelial (carcinomas), sendo os mais comuns o carcinoma mucoepidermoide e o carcinoma adenoide cístico (CAC) (FONSECA *et al.*, 2012).

O CAC representa menos de 1% de todos os cânceres de cabeça e pescoço, e aproximadamente 10% das neoplasias de glândula salivar. A grande maioria dos casos acomete adultos de meia idade, sendo 57 anos a idade média no momento do diagnóstico. Homens e mulheres são igualmente afetados (BELL *et al.*, 2017). Clinicamente, o CAC é caracterizado por um aumento de volume com crescimento lento, podendo ou não apresentar sintomatologia dolorosa ou parestesia, e que se desenvolve principalmente em glândulas salivares menores. Apesar do seu desenvolvimento clínico aparentemente indolente, o CAC é localmente invasivo e tende a desenvolver invasão perineural e linfovascular, mesmo em lesões diagnosticadas em estágios iniciais, tendo como consequência altas taxas de recorrência e metástases a distância tardias (COCA-PELAZ *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2012; JU *et al.*, 2016).

Microscopicamente, o tumor é constituído por células epiteliais e mioepiteliais. As células neoplásicas apresentam três padrões histológicos arquiteturais: 1) *cribiforme*: é o padrão mais comum, em que as células estão organizadas em ilhas neoplásicas com espaços em seu interior preenchidos por material basofílico amorfo ou pelo próprio estroma eosinofílico; 2) *tubular*: composto por dupla camada de células mioepiteliais e epiteliais formando estruturas ductais, e 3) *sólido*: caracterizado por lençóis de células tumorais, sem formação de espaços pseudocísticos ou ductos, e, usualmente, exibindo maior grau de pleomorfismo celular, comedonecrose e figuras

de mitose atípicas (**Figura 1**). Em um único tumor podem ser encontrados os três subtipos histológicos (BELL *et al.*, 2017).

Figura 1 – Padrões histológicos do CAC



A) Cribriforme; B) Tubular e C) Sólido. Fonte: Própria autora, 2024.

A imunohistoquímica é uma ferramenta auxiliar no diagnóstico de CAC, naqueles casos mais desafiadores, especialmente quando apenas pequenas amostras teciduais obtidas de biópsias incisionais estão disponíveis para análise. Células mioepiteliais são positivas para actina de músculo liso, p63, citoqueratinas de alto peso molecular como CK14 e 34 β 12, vimentina e calponina, enquanto as células epiteliais são positivas para citoqueratinas de baixo peso molecular como CK7, antígeno de membrana epitelial (EMA) e antígeno carcinoembriônico (CEA). A maioria dos casos de CAC expressam C-KIT (CD117). A correlação entre a expressão destes marcadores imunoistoquímicos com a gradação e padrão histológicos do tumor é discutível (COCA-PELAZ *et al.*, 2015; DILLON *et al.*, 2014).

O tratamento padrão do CAC é a ressecção cirúrgica com margens de segurança. A radioterapia pode ser utilizada como terapia adjuvante, no tratamento de recidiva local e em tumores não ressecáveis. O caráter altamente infiltrativo em direção aos tecidos adjacentes, aumenta os riscos de recidiva local. O envolvimento de linfonodos regionais não é comum, entretanto, metástases a distância, principalmente no pulmão, são relatadas em mais de 50% dos casos. Fatores associados a um pior prognóstico usualmente incluem o subtipo histológico predominantemente sólido, presença de invasão linfovascular, ocorrência de recidivas e metástase a distância. A taxa de sobrevida em 5 anos é de aproximadamente 90%, porém este percentual diminui consideravelmente para 50%-70% em 10 anos (AMIT *et al.*, 2017; BJORN DAL *et al.*, 2015; GARG *et al.*, 2019; MARTINS-ANDRADE *et al.*, 2019).

Atualmente, o estudo das bases moleculares de diversas doenças vem sendo desenvolvida com o objetivo de estabelecer as alterações a nível molecular que ajudem a determinar o comportamento biológico destas neoplasias, e possibilite o desenvolvimento de terapias sistêmicas eficazes. O sequenciamento completo do exoma do CAC demonstrou uma diversidade de mutações, envolvendo genes que atuam em diferentes vias moleculares. A translocação genética t(6;9) que resulta em fusões envolvendo os oncogenes MYB ou MYBL1, e o fator de transcrição NFIB, é descrita como um evento específico e recorrente no CAC no contexto de tumores de glândula salivar (BELL *et al.*, 2013; PERSSON *et al.*, 2009; WYSOCKI *et al.*, 2016). Entretanto, existe uma grande variabilidade (16%-100%) na presença dessas alterações em casos de CAC, parcialmente explicada pelas diferenças metodológicas utilizadas por grupos de pesquisa distintos, mas também como um reflexo da natureza biológica heterogênea da doença. Além disso, a ocorrência desta translocação cromossômica apresenta-se como potencial auxiliar para correlações clínicas e prognósticas, eventualmente podendo servir como alvo para terapia direcionada ao tumor. Entretanto, essas fusões genéticas não demonstraram em estudos recentes um significativo potencial prognóstico para os pacientes afetados (ALMEIDA-PINTO *et al.*, 2019; BRAYER *et al.*, 2015; FONSECA *et al.*, 2016).

1.2 Dinâmica mitocondrial

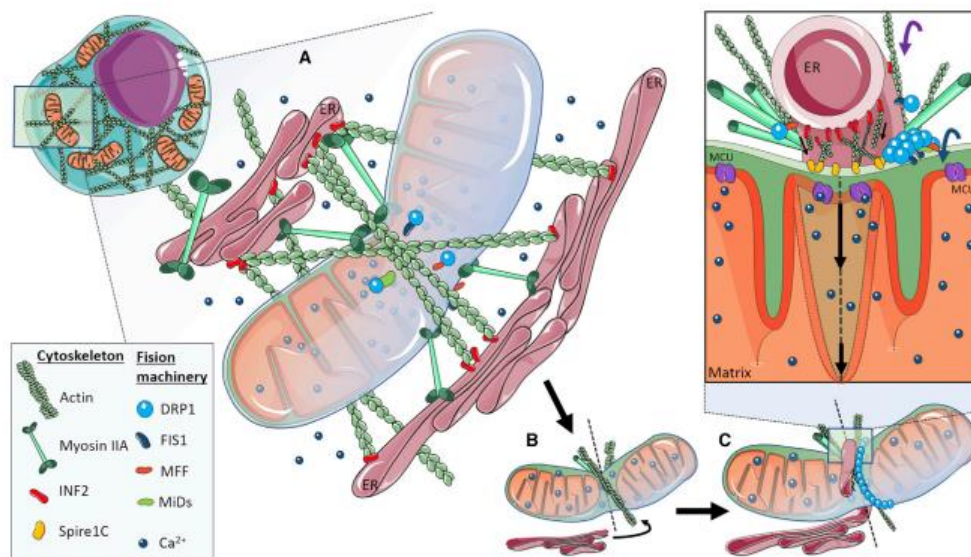
O termo mitocôndria foi proposto por Benda em 1898, e desde o século XIX, se acreditava que as mitocôndrias eram organelas independentes e responsáveis por funções metabólicas e genéticas dentro das células. Em 1914, Margaret Lewis and Warren Lewis, descreveram o comportamento das mitocôndrias ao observarem, em cultura de células, que essas organelas apresentavam alterações de posição e formato, formavam extensas redes e se fragmentavam, de maneira contínua, dentro do citoplasma. Uma revisão realizada por Cowdry em 1918, demonstrou a presença das mitocôndrias em diferentes tipos de células e organismos, sua morfologia e distribuição, que mais tarde caracterizariam os processos de fissão e fusão, além das diferentes funções das mitocôndrias nos tecidos (O'ROURKE, 2010). Com a evolução dos estudos sobre as funções mitocondriais, já em 1975, Henry Hoberman, questionou o papel dos genes mitocondriais na carcinogênese, indicando que estas

organelas se modificavam em abundância, tamanho e forma, comparando células normais e células tumorais (HOBBERMAN, 1975).

Nos dias de hoje, além dos estudos moleculares, a investigação da expressão de proteínas de dinâmica mitocondrial, através da imunoistoquímica, é apontada como um importante indicador de atividade tumoral, em diversas neoplasias do corpo humano, considerando que as mitocôndrias são organelas dinâmicas e estão sob constante processo de fusão e fissão, controlados por proteínas mitocondriais; e que esses processos desempenham papel importante em diversos mecanismos biológicos como a proliferação, diferenciação, migração e invasão celular (KASHATUS, 2018; EL-HATAB *et al.*, 2018). Além disso, a dinâmica mitocondrial permite a troca de material genético entre as organelas, o isolamento de organelas danificadas, replicação, transporte e a formação de extensas redes mitocondriais no citoplasma. Portanto, o equilíbrio entre esses processos é responsável por manter morfologia, distribuição e função adequadas da mitocôndria dentro de uma célula. (ARCHER, 2013; QUINTANA-CABRERA;SCORRANO, 2023).

As principais proteínas descritas no processo de fissão (**Figura 2**) são DRP1, FIS1, MFF e Mid49/59. Inicialmente, no processo de fissão, filamentos de actina e miosina atraem o retículo endoplasmático para realizar uma constrição na membrana mitocondrial, no local em que deverá ocorrer a fragmentação. Posteriormente as proteínas FIS1, MFF e Mid49/59 iniciam o recrutamento da proteína DRP1 para o local de fissão na membrana externa da mitocôndria. É formada uma estrutura em hélice de dímeros e oligômeros de DRP1, que sofre constrição e promove a separação da membrana e consequentemente a formação de dois fragmentos.

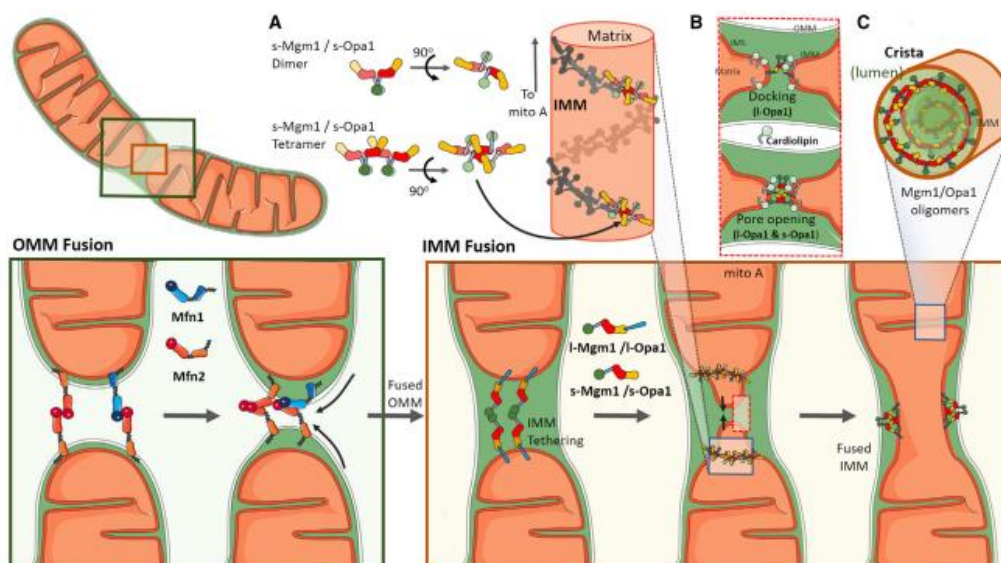
Figura 2 – Imagem ilustrativa do precesso de fissão



Fonte: QUINTANA-CABRERA;SCORRANO, 2023.

Já a fusão mitocondrial (**Figura 3**) é mediada pelas proteínas MFN1, MFN2 e OPA1. As mitofusinas 1 e 2 promovem a fusão da membrana mitocondrial externa, enquanto OPA1 é responsável pela fusão da membrana interna e manutenção da morfologia das cristas (EL-HATAB et al., 2018; KASHATUS, 2018).

Figura 2 – Imagem ilustrativa do precesso de fusão



Fonte: QUINTANA-CABRERA&SCORRANO, 2023.

O desequilíbrio dessa dinâmica entre fusão e fissão já foi descrito em diversos tipos de câncer em seres humanos, como o melanoma, câncer de mama, pulmão e tireoide, etc., e pode estar envolvido tanto em processos de proliferação e sobrevivência celular, quanto em resistência das células tumorais à quimioterapia. A dinâmica mitocondrial pode estar envolvida em processos fisiológicos da célula tumoral, como metabolismo, *stemness*, proliferação, morte celular, migração e invasão para outros tecidos (CHEN *et al.*, 2023; DARVIN;NAIR, 2023; RODRIGUES;FERRAZ, 2020; ROY *et al.*, 2024). O estudo das proteínas envolvidas na dinâmica mitocondrial está em evidência, considerando sua possível associação com a atividade tumoral, podendo ser consideradas potenciais biomarcadores prognóstico e alvos de protocolos de quimioterapia. Bonfitto *et al.*, 2010, demonstraram um aumento no número de mitocôndrias em casos de CAC, através da análise imunoistoquímica do antígeno mitocondrial, comparando o padrão de marcação do anticorpo em áreas convencionais de CAC, e áreas com transformação de alto grau. Os autores evidenciaram uma marcação forte em áreas de desdiferenciação, o que pode estar associado à agressividade tumoral. A busca de novos marcadores moleculares que possam auxiliar no diagnóstico diferencial, diagnóstico precoce da doença e melhor entendimento da patogênese do CAC ainda é necessária, considerando a sua biologia complexa e heterogênea. Justificando, assim, a investigação destes marcadores de dinâmica mitocondrial e sua correlação com parâmetros clinicopatológicos e de sobrevida.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão de marcadores de dinâmica mitocondrial no carcinoma adenoide cístico.

2.2 Objetivos específicos

- a) Identificar o padrão de expressão das proteínas de dinâmica mitocondrial no carcinoma adenoide cístico;
- b) Verificar se há diferença na expressão de proteínas de dinâmica mitocondrial comparando subtipos histológicos do carcinoma adenoide cístico;
- c) Correlacionar os resultados da expressão imunoistoquímica das proteínas de dinâmica mitocondrial com as características clinicopatológicas do tumor;
- d) Avaliar a expressão das proteínas de dinâmica mitocondrial como possível marcador prognóstico, através da correlação com dados de sobrevida.

3 METODOLOGIA

3.1 Aspectos éticos

Este estudo foi conduzido com a aprovação do Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil (processo nº 65798717.3.0000.5149) (ANEXO A). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com os padrões éticos do comitê responsável pela experimentação humana (institucional e nacional) e com a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008.

3.2 Seleção da amostra

Casos diagnosticados como carcinoma adenoide cístico (CAC) de glândulas salivares menores foram recuperados dos arquivos do serviço de patologia Getúlio Sales Diagnósticos (Natal/Brasil) entre 2010 e 2015. Foram obtidos os cortes histopatológicos, originais, corados em hematoxilina e eosina (H&E), quaisquer colorações especiais disponíveis, como PAS e/ou mucicarmina, bem como os tecidos fixados em formol e embebidos em parafina de todos os casos, para revisão histopatológica, por dois patologistas orais, utilizando as diretrizes atuais da Organização Mundial da Saúde (OMS) para a classificação de tumores das glândulas salivares. Parâmetros histológicos como invasão perineural e vascular, status das margens cirúrgicas e subtipo microscópico foram avaliados. Dados clínicos dos casos foram obtidos dos prontuários patológicos e/ou médicos dos pacientes e incluíram sexo, idade, localização do tumor, estadiamento clínico e status do paciente na última consulta de acompanhamento. A sobrevida específica foi calculada como o tempo entre o tratamento e a morte do paciente devido à neoplasia ou sua última consulta, enquanto a sobrevida livre de doença foi obtida pelo tempo entre o tratamento e a recidiva do tumor, a última consulta do paciente ou a morte do paciente devido ao tumor.

3.3 Construção de microarranjo tecidual

Lâminas microscópicas coradas com hematoxilina e eosina foram avaliadas e duas áreas diferentes dos tumores foram selecionadas para obter uma amostra representativa, em duplicata, para o bloco de microarranjo tecidual. As áreas selecionadas eram compostas em sua maior parte por células tumorais, evitando extensas áreas de estroma, necrose e infiltrado inflamatório. Círculos de 2,0 mm de diâmetro foram dispostos em dois blocos de parafina em matriz 6 x 10 prontos para uso (Sakura Co). Dois círculos de rim normal e glândula tireoide foram inseridos no canto superior esquerdo de cada bloco receptor para orientação (FONSECA *et al.*, 2014).

3.4 Imunoistoquímica

A imunoistoquímica foi realizada em cortes de 3 µm de blocos de microarranjo tecidual, em lâminas salinizadas. Os cortes foram desparafinizados e expostos a recuperação antigênica induzida por calor por 15 minutos com tampão Tris-EDTA (pH 9,0). A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com H₂O₂ a 20%, seguida pela incubação com os anticorpos primários *overnight*: Anti-mitocondrial antigen (AMT, clone 113-1, diluição 1:100, BioGenex, Ferment, CA, EUA); Proteína relacionada à dinamina 1 (DRP1, clone 6Z-82, diluição 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); Proteína de fissão mitocondrial 1 (FIS1, clone B-5, diluição 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA); Mitofusina-1 (MFN1, clone D-10, diluição 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA) e Mitofusina-2 (MFN2, policlonal, diluição 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA), e Proteína de atrofia óptica (OPA1, clone EPR11057(B), diluição 1:500, ABCAM, Cambridge, Reino Unido). As reações imunohistoquímicas foram reveladas com 3,3'-diaminobenzidina (DAB; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) e contra-coradas com hematoxilina Carazzi. Fígado (AMT e OPA1), oncocitoma (FIS1 e DRP1) e tumor de Warthin (MFN1 e MFN2) foram utilizados como controles positivos.

Quadro 1 - Especificações dos anticorpos utilizados

Anticorpo primário	Clone/Fabricante	Diluição
Anti-mitochondrial antigen	clone 113-1, BioGenex, Fermont, CA, EUA	1:100
Anti-DRP1	clone 6Z-82, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA	1:300
Anti-FIS1	clone B-5, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA	1:50
Anti-MFN1	clone D-10, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA	1:100
Anti-MFN2	Policlonal, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, EUA	1:50
Anti-OPA1	clone EPR11057(B), ABCAM, Cambridge, Reino Unido	1:500

Fonte: Própria autora, 2024.

Para cada caso foram analisadas as áreas totais dos dois cilindros, em um aumento de 400X, ao microscópio óptico. Uma análise descritiva detalhada do padrão de coloração de cada marcador foi realizada por dois patologistas previamente calibrados, de maneira individual, e, posteriormente, em conjunto, para análise dos casos divergentes. Cada caso foi classificado de acordo com a expressão de cada marcador como ausente (0%), fraca (positividade em 1-15% das células tumorais), moderada (positividade em 16-50% das células tumorais) e intensa (positividade em 51-100% das células tumorais) (MEYERHOLZ;BECKER, 2018). Posteriormente, as lâminas foram digitalizadas no scanner Aperio Scanscope CS.

3.5 Análise estatística

A análise descritiva foi inicialmente realizada para todos os dados clinicopatológicos e imunohistoquímicos, com variáveis categóricas apresentadas como número absoluto e percentual, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como média, desvio padrão e intervalo. Para fins estatísticos, os casos foram dicotomizados de acordo com os resultados imunoistoquímicos em negativo/fraco e moderado/intenso, e os padrões de marcação foram correlacionadas com os parâmetros clinicopatológicos usando o teste qui-quadrado ou o teste exato de Fisher.

As curvas de Sobrevida Específica e Livre de Doença foram construídas de acordo com o método de Kaplan-Meier, e o teste univariado de log-rank foi aplicado para investigar possíveis diferenças nas curvas de sobrevivência de cada variável. A análise de riscos proporcionais de Cox foi utilizada para investigar a presença de determinantes prognósticos independentes, e todas as variáveis que alcançaram significância estatística na análise univariada foram incluídas no modelo multivariado. Os testes estatísticos foram realizados usando o software SPSS, versão 26.0 (SPSS, Chicago, IL), com um nível de confiança de 95% ($p \leq 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Artigo publicado no periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine* – IF 2.7

EXPRESSION OF MITOCHONDRIAL DYNAMIC MARKERS IN ADENOID CYSTIC CARCINOMA

Running title: Mitochondrial markers in adenoid cystic carcinoma

Maria Sissa Pereira **Sant’Ana**¹, Cínthia Verónica Bardález López de **Cáceres**², Lucas Ambrosio **Lima**¹,
Ciro Dantas **Soares**², Raghu **Radhakrishnan**³, Ricardo Santiago **Gomez**¹, Pablo Agustin **Vargas**² and
Felipe Paiva **Fonseca**¹

1. Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil.
2. Department of Oral Diagnosis, Area of Pathology, Piracicaba Dental School, University of Campinas, Piracicaba, São Paulo, Brazil.
3. Manipal College of Dental Sciences, Manipal, India.

Corresponding author

Prof. Felipe Paiva Fonseca

Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry.

Universidade Federal de Minas Gerais

Av. Antônio Carlos, 6627. Belo Horizonte, Brazil.

e-mail: felipepfonseca@hotmail.com

Acknowledgments: This study was supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES) (Financial code 001) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq).

Conflict of interest: None.

Abstract

Background: Mitochondrial fission and fusion processes are known as mitochondrial dynamics and the occurrence of imbalances in the mitochondrial activity is related to the pathogenesis of many human cancers. However, the importance of mitochondrial dynamics in malignant salivary gland tumours remains unknown. Therefore, we aimed to investigate its prognostic significance in adenoid cystic carcinoma (AdCC). **Methods:** Fifty-seven formalin-fixed paraffin-embedded cases were retrieved and disposed in tissue microarray. Histological sections were submitted to immunohistochemical reactions against AMT, DRP1, FIS1, MFN1, MFN2 and OPA1 proteins. Clinical data were retrieved from the patients' medical files, including specific and disease-free survival data. **Results:** It was observed that 50.9% of the cases were strongly positive for AMT and DRP1, and 49.1%, 21.1%, 22.8% and 24.6% strongly positive for FIS1, MFN1, MFN2 and OPA1, respectively. Reactions were observed in both epithelial and myoepithelial components of the tumour. The higher expression of MFN2 was associated with solid microscopic pattern ($p = .016$). DRP1 overexpression showed a trend towards a shorter overall survival ($p = .054$), while negative/weak OPA1 showed a trend towards a lower DFS ($p=.051$) in the univariate analysis, but no mitochondrial marker represented an independent prognostic determinant under multivariate analysis. **Conclusion:** In conclusion, mitochondrial dynamics markers do not seem to carry a prognostic significance for AdCC patients, but these proteins may play an important role in its pathogenesis.

Keywords: adenoid cystic carcinoma, mitochondrial markers, metabolism, prognosis, salivary gland neoplasms.

Introduction

Adenoid cystic carcinoma (AdCC) corresponds to approximately 10% of all salivary gland malignancies. It arises mostly from minor salivary glands of the palate and the parotid glands, and mainly affects adults in their fifth to sixth decades of life^{1,2}. AdCC is locally invasive and tends to develop perineural and lymphovascular invasion, even in early-stage lesions^{1,3,4}. The presence of microscopic features and the solid histological subtype, as well as the occurrence of positive surgical margins lead to a significantly higher recurrence rate and late distant metastasis, usually to the lungs (50%). Overall survival rates are reported to be almost 90% after 5 years of follow-up, but it falls to approximately 50% to 70% after 10 years^{5,6}.

Molecular basis of AdCC has been proved to be highly complex and RNA sequencing assays demonstrated the presence of a diverse number of mutations, involving different molecular pathways and the translocation of chromosomes 6 and 9 that leads to the fusion of the proto-oncogenes MYB/MYBL1 with the transcription factor NF1B gene was shown to be of pathogenic importance for this tumour and highly specific for AdCC in the context of salivary gland neoplasms^{7,8}. However, there is a huge variability in the incidence of this molecular event (16%-100%), which limits its diagnostic use and its prognostic potential^{9,10,11}. Therefore, the search for new prognostic markers remains desirable and a better understanding of the molecular signature of this cancer needs to be further investigated.

Mitochondria are dynamic organelles under a constant process of fusion and fission that are controlled by a complex interaction of mitochondrial proteins. These processes play an important role in several biological events such as cell metabolism, proliferation, differentiation, migration and invasion^{12,13}. The expression of mitochondrial dynamic proteins has been considered an important indicator of tumour activity in several human neoplasms and seems to carry an important prognostic potential in melanoma, breast, prostate and lung cancers^{14,15,16,17,18}. The importance of these mitochondrial biomarkers for salivary gland

neoplasms remains to be explored and very few data are currently available in literature, but an increased number of mitochondria was shown in AdCC, which may be associated with tumour aggressiveness¹⁹. Therefore, the aim of the present study is to evaluate the expression pattern of mitochondrial dynamic markers and to determine their possible prognostic potential for patients affected by salivary gland AdCC.

Material and Methods

Ethical aspects

This study was conducted following approval by the Ethical Committee of the Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil (process no. 65798717.3.0000.5149). All procedures were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation (institutional and national) and with the Helsinki Declaration of 1975, as revised in 2008.

Sample selection

Cases diagnosed as salivary gland AdCC were retrieved from the pathology files of the Getúlio Sales Diagnósticos pathology service (Natal/Brazil) from 2010 and 2015. The original H&E, any available special staining like PAS and/or mucicarmin, as well as the formalin-fixed paraffin-embedded tissues of all cases were obtained for histopathological revision by two oral pathologists using the current World Health Organization (WHO) guidelines for classification of salivary gland tumors. Histologic parameters like perineural and vascular invasion, surgical margins status and microscopic subtype were assessed. Clinical data of the cases were obtained from the patients' pathology and/or medical charts and included sex, age, location of the tumor, clinical stage, and status of the patient at their last follow-up appointment. Specific survival was calculated as the time between the treatment and patient's death due to the neoplasm or his/her last appointment, while disease free survival was obtained by the time between the treatment and the tumor recurrence, patient's last appointment or patient's death due to the tumor.

Tissue Microarray construction

Microscopic slides stained with haematoxylin and eosin were assessed and two different areas of the tumours were selected in order to obtain a representative sample for tissue microarray block. Cores of 2.0mm of diameter were disposed in two 6 x 10 matrix ready-to-use paraffin block (Sakura Co). Two cores of normal kidney and thyroid gland were inserted in the left upper corner of each recipient block for orientation.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry was performed on 3- μ m-thick sections of TMA blocks on salinized slides. Sections were deparaffinized and exposed to heat-induced antigen retrieval for 15 minutes with Tris-EDTA buffer (pH 9.0). Endogenous peroxidase activity was blocked with 20% H₂O₂ followed by incubation with the primary antibodies overnight: Anti-mitochondrial (AMT, clone 113-1, dilution 1:100, BioGenex, Fremont, CA, USA); Dynamin-related protein 1 (DRP1, clone 6Z-82, dilution 1:300, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); mitochondrial fission protein 1 (FIS1, clone B-5, dilution 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA); mitofusin-1 (MFN1, clone D-10, dilution 1:100, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA) and mitofusin-2 (MFN2, polyclonal, dilution 1:50, Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA), and optical atrophy protein (OPA1, clone EPR11057(B), dilution 1:500, ABCAM, Cambridge, UK). Immunohistochemical reactions were revealed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB; Sigma-Aldrich, St Louis, MO), and counterstained with Carazzi haematoxylin. Liver (AMT and OPA1), oncocytoma (FIS1 and DRP1) and Warthin's tumour (MFN1 and MFN2) were used as positive controls.

Slides were scanned into high resolution images and a detailed descriptive analysis of the staining pattern of each marker was jointly done by two pathologists. Reactions were also assessed and each case was classified according to the expression of each marker as absent

(0%), weak (positivity in 1-15% of tumor cells), moderate (positivity in 16-50% of tumor cells) and strong (positivity in 51-100% of tumor cells) staining.

Statistical methods

A descriptive analysis was initially performed for all clinicopathological and immunohistochemical data, with categorical variables presented as absolute number and percentage, while continuous variables were presented as mean, standard deviation (SD) and range. For statistical purposes, cases were dichotomized according to the immunohistochemical results as negative/weak and moderate/strong, and the immunostaining scores were correlated with clinicopathologic parameters using chi-square or Fisher's exact test. Specific and Disease-free Survival curves were constructed according to the Kaplan-Meier method and the log-rank univariate test was applied to investigate possible differences in the survival curves of each variable. Cox proportional hazards analysis was used to investigate the presence of independent prognostic determinants and all variables that achieved statistical significance in the univariate analysis were included in the multivariate model. Statistical tests were carried out using the SPSS software, version 26.0 (SPSS, Chicago, IL) with a 95% confidence level ($p \leq .05$).

Results

Fifty-seven cases of AdCC were retrieved and the detailed clinicopathological data of this sample are reported in **Table 1**. Briefly, our sample showed a slight female predilection (56.1%), with a mean age of 54.9 years-old (ranging from 23 to 86 years-old), and most of the lesions (63.2%) affected the palate. Moreover, early TNM stage tumors (66.7%), cribriform/tubular patterns (70.2%), absence of neural (63.2%) and vascular (63.2%) invasion and negative surgical margins (77.2%), were observed in the majority of the cases. Surgical excision was the treatment of choice for 61.4% of the patients, and recurrence was registered for 28.9% of the patients after last follow-up.

The immunohistochemical results are detailed presented in **Table 1**. AMT, MFN2 and MFN1 expression was considered strong in 50.9%, 22.8% and 21.1% of the cases, respectively, in the cytoplasm of tumor cells, and both epithelial and myoepithelial cells were positive for these proteins. DRP and FIS1 showed a strong expression in 50.9% and 49.1% of the cases respectively, and staining predominated in the myoepithelial compartment. OPA1 exhibited a strong expression in 24.6% of the cases, mostly in luminal cells (**Figure 1**). Investigating the association between mitochondrial markers and clinicopathologic data it was observed that the negative/weak expression of MFN2 was associated with cribriform/tubular histological subtype ($p=.016$); the negative/weak expression of AMT was associated with neural invasion ($p=.049$), moderate/strong expression of DRP1 ($p<.01$) was associated with tumours located in the palate, and moderate/strong DRP1 expression was associated with neural invasion ($p\leq.05$) (**Table 2**).

Follow-up data was available for all patients, with a mean time of follow-up of 65.93 months (range from 5 to 174 months). The Kaplan-Meier survival curves showed a specific survival rate of 69.1% after 5 years of follow-up, and 47.7% after 10 years of follow-up. The DFS after 5 and 10 years of follow-up achieved 70.8% and 63.5%, respectively (**Figure 2**). Log-rank univariate analysis (**Table 3**) demonstrated that advanced TNM stage, solid subtype,

presence of vascular and neural invasion ($p < .01$) and positive surgical margins ($p \leq .05$) were significantly associated with a lower specific survival rate, and moderate/strong DRP1 expression showed a strong trend towards a lower specific survival ($p = .054$). Meanwhile, lesions affecting other locations than the palate, advanced T stage tumours, presence of vascular invasion, positive surgical margins were associated with a lower DFS ($p < .05$), and OPA1 negative/weak expression showed a clear trend towards a lower DFS ($p = .051$). In the multivariate model, only microscopic pattern exhibited an independent predictive value for AdCC specific survival ($p \leq .05$), while positive surgical margins achieved significance for DFS ($p < .01$) (**Table 4**).

Discussion

Mitochondria constantly modify their number, shape and function according to the cell requirements, and these alterations occur mainly through two processes, fission and fusion, which are known as mitochondrial dynamics. More recently, new evidences have led to a better understanding of mitochondrial dynamics, biogenesis and degradation, and their link to adverse pathological alterations, including human cancer^{12,13,20}. Several studies demonstrate that an imbalance in mitochondrial dynamics plays a key role in tumour initiation and progression, and mitochondrial biomarkers could be useful as a diagnostic, prognostic and therapeutic tool²¹. Moreover, the expression of mitochondrial dynamics proteins may indicate tumour aggressiveness, and may be used as predictive tool for oral squamous cell carcinoma and oral melanoma^{22,23}; however, the importance of mitochondrial dynamics for salivary gland tumours is largely unknown and our results demonstrated that despite the lack of a significant prognostic determination, the proteins investigated seemed to carry some clinicopathological and pathogenic importance for salivary gland AdCC.

AMT protein is used to determine the content of mitochondria within the cell. Elevated mitochondrial content is reported to be associated with cancer progression and treatment resistance^{14,24}. Considering the clinicopathological data of our sample, a higher expression of AMT was associated with a lower occurrence of neural invasion, a hallmark microscopic finding of AdCC. At the same time, the mitochondrial fusion protein MFN2 revealed a significant association with the solid variant of AdCC which characterizes a more aggressive microscopic subtype of the tumour. MFN2 is a mitofusin found in the mitochondrial outer membrane and its complex role in tumorigenesis has been studied in different types of cancer. Although some results suggest that MFN2 acts as a pro-apoptotic and anti-proliferative protein in tumour cells of a diverse group of human neoplasms, in lung adenocarcinomas, cervical and breast cancers, MFN2 seems to contribute with tumour progression. Therefore, it is believed

that MFN2 may impact oncogenes in different ways, depending on cancer type and environmental conditions^{16,17,18}.

Regarding MFN1, Zhao et al. (2013) found that metastatic breast cancer cells expressed less MFN1, which resulted in more fragmented mitochondria. More interesting, the authors demonstrated that overexpression of MFN1 suppressed metastatic abilities of breast cancer cells, and silencing this protein enhanced the metastatic abilities of cancer cells¹⁵. In the present study, MFN1 was not associated with clinicopathological features.

OPA1 is an inner membrane protein and in addition to the fusion process, one of its main functions is to maintain cristae structure during cell apoptosis; therefore, it is considered an anti-apoptotic protein²⁵. Ovarian cancer studies found higher levels of OPA1 in cancer cells associated with other mechanisms, which is reported to contribute to resistance to apoptosis²⁶. OPA1 is also overexpressed in oncocytic thyroid tumour cell lines; however, since no statistical significance was found comparing with other cell lines, it was speculated to be a responsive process to microenvironmental conditions²⁷. In the present study high expression of OPA1 almost achieved a statistical significance when its prognostic potential was investigated, showing a clear trend towards a lower DFS in the univariate analysis.

DRP1 is one of the main proteins that regulates the fission process in mitochondria dynamics. DRP1 upregulation is related to metabolic reprogramming which leads to disease progression, and increased migration, invasion and metastatic capacities in a variety of glandular cancers, including breast, prostate and thyroid^{12,14,15,27} and cell proliferation in oral squamous cell carcinoma²⁸. In our sample, its higher expression was strongly associated with the presence of neural invasion ($p=.028$), also revealing a trend toward significance when patients' death was evaluated, suggesting that this protein may play some role in the AdCC behaviour. Since FIS1 and DRP1 are fission proteins, it is expected that they may behave towards the same function (promoting tumorigenesis). Recently, high expression of FIS1 was

reported to be associated with aggressive features and poor prognosis in oral melanoma patients²² and metastasis in gastric adenocarcinoma and hepatocellular carcinoma^{29,30}. In our sample, there were no association between FIS1 with clinicopathological parameters,

In conclusion, the mitochondrial dynamics markers seem to carry a limited prognostic potential for the AdCC sample investigated, but their expression pattern suggests that these components may play some important biological and pathogenic role for the development of this aggressive neoplasm.

References

1. Fonseca FP, Carvalho MV, Almeida OP, et al. Clinicopathologic analysis of 493 cases of salivary gland tumors in a Southern Brazilian population. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2012; 114(2):230-239. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2012.04.008>
2. Bell D, Bullerdiek J, Gnepp DR, et al. Salivary gland tumours. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, editors. *World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours*. Lyon, France: IARC Press; 2017. p. 33.
3. Coca-Pelaz A, Rodrigo JP, Bradley PJ, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—An update. *Oral Oncol.* 2015; 51(7):652-661. <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2015.04.005>
4. Ju J, Li Y, Chai J, Ma C, Ni Q, Shen Z, et al. The role of perineural invasion on head and neck adenoid cystic carcinoma prognosis: a systematic review and metaanalysis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2016;122(6):691-701. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2016.08.008>
5. Amit M, Na'ara S, Trejor-Leider L, et al. Defining the surgical margins of adenoid cystic carcinoma and their impact on outcome: An international collaborative study. *Head & Neck.* 2017;39(5):1008-1014. DOI 10.1002/hed.24740.
6. Martins-Andrade B, Costa SFS, Sant'Ana MSP et al. Prognostic importance of the lymphovascular invasion in head and neck adenoid cystic carcinoma: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncol.* 2019;93:52-58. <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.04.014>
7. Bell D, Hanna EY. Head and neck adenoid cystic carcinoma: what is new in biological markers and treatment?. *Curr Opin in Otolaryngol Head Neck Surg.* 2013;21(2):124-129. DOI:10.1097/MOO.0b013e32835c05fd

8. Wysocki PT, Izumchenko E, Meir J, Ha PK, Sidransky D, Brait M. Adenoid cystic carcinoma: emerging role of translocations and gene fusions. *Oncotarget*. 2016;7(40):66239-66245. doi: [10.18632/oncotarget.11288](https://doi.org/10.18632/oncotarget.11288)

9. Brayer KJ, Frerich CA, Kang H, Ness SA. Recurrent fusions in MYB and MYBL1 define a common, transcription factor–driven oncogenic pathway in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Cancer Discov*. 2016;6(2):176-187. DOI: 10.1158/2159-8290.CD-15-0859

10. Fonseca FP, Filho MS, Altemani A, Speight PM, Vargas PA. Molecular signature of salivary gland tumors: potential use as diagnostic and prognostic marker. *J Oral Pathol Med*. 2016;45(2):101-110. doi: 10.1111/jop.12329

11. De Almeida-Pinto YD, Costa SFS, Andrade BAB, et al. t (6; 9)(MYB-NFIB) in head and neck adenoid cystic carcinoma: A systematic review with meta-analysis. *Oral Dis*. 2019;25(5):1277-1282. <https://doi.org/10.1111/odi.12984>

12. Kashatus DF. The regulation of tumor cell physiology by mitochondrial dynamics. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018; 500(1):9-16. doi:10.1016/j.bbrc.2017.06.192.

13. El-Hattab AW, Suleiman J, Almannai M, Scaglia F. Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. *Molec Genet Metab*. 2018;125(4):315-321. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2018.10.003>

14. Grupp K, Jedrzejewska K, Tsoularkis MC, et al. High mitochondria content is associated with prostate cancer disease progression. *Mol cancer*. 2013; 12(1):1-11. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-12-145>

15. Zhao J, Zhang J, Yu M, et al. Mitochondrial dynamics regulates migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*. 2013;32(40): 4814-4824. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.494>

16. Lou Y, Li R, Liu J, et al. Mitofusin-2 over-expresses and leads to dysregulation of cell cycle and cell invasion in lung adenocarcinoma. *Med Oncol.* 2015;32(4): 132. DOI: [10.1007/s12032-015-0515-0](https://doi.org/10.1007/s12032-015-0515-0)

17. Kannan A, Wells RB, Sivakumar S, et al. Mitochondrial reprogramming regulates breast cancer progression. *Clin Cancer Res.* 2016;22(13): 3348-3360. DOI: [10.1158/1078-0432.CCR-15-2456](https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-2456)

18. Ahn SY, Li C, Zhang X, Hyun YM. Mitofusin-2 expression is implicated in cervical cancer pathogenesis. *Anticancer Res.* 2018; 38(6): 3419-3426. DOI: [10.21873/anticancer.12610](https://doi.org/10.21873/anticancer.12610)

19. Bonfitto VL, Demasi AP, Cost AF, Bonfitto JF, Araujo VC, Altemani A. High-grade transformation of adenoid cystic carcinomas: a study of the expression of GLUT1 glucose transporter and of mitochondrial antigen. *J Clin Pathol.* 2010;63(7):615-619. DOI: [10.1136/jcp.2010.075390](https://doi.org/10.1136/jcp.2010.075390)

20. Srinivasan S, Guha M, Kashina A, Avadhani NG. Mitochondrial dysfunction and mitochondrial dynamics-The cancer connection. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* 2017;1858(8):602-614. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.01.004>

21. Rodrigues T, Ferraz LS. Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer. *Biochem. Pharmacol.* 2020;182:114282. <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2020.114282>

22. Soares CD, Morais TML, Mariano FV, et al. Expression of mitochondrial dynamics markers during melanoma progression: comparative study of head and neck cutaneous and mucosal melanomas. *J Oral Pathol Med.* 2019; 48(5): 373-381. DOI: [10.1111/jop.12855](https://doi.org/10.1111/jop.12855)

23. Soares CD, Morais TML, Carlos R, et al. Prognostic importance of mitochondrial markers in mucosal and cutaneous head and neck melanomas. *Hum Pathol.* 2019;85: 279-289. <https://doi.org/10.1016/j.humpath.2018.11.009>

24. Farnie G, Sotgia F, Lisanti MP. High mitochondrial mass identifies a sub-population of stem-like cancer cells that are chemo-resistant. *Oncotarget*. 2013;6(31):30472-86. DOI: [10.18632/oncotarget.5401](https://doi.org/10.18632/oncotarget.5401)

25. Frezza C, Cipolat S, Brito OM, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 2006;126(1): 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.025>

26. Signorile A, De Rasmio D, Cormio A, et al. Human ovarian cancer tissue exhibits increase of mitochondrial biogenesis and cristae remodelling. *Cancers*. 2019; 11(9):1350. doi: [10.3390/cancers11091350](https://doi.org/10.3390/cancers11091350)

27. Ferreira-da-Silva A, Valacca C, Rios E, et al. Mitochondrial dynamics protein Drp1 is overexpressed in oncocytic thyroid tumors and regulates cancer cell migration. *PloS ONE*. 2015;10(3): e0122308. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0122308>

28. Ghosha A , Chatterjeeb A , Chowdhuryc AR, Barua A. Clinico-pathological significance of Drp1 dysregulation and its correlation to apoptosis in oral cancer patients. *Mitochondrion*. 2020;52:115-124.<https://doi.org/10.1016/j.mito.2020.03.003>

29. Karimi D, Pedram N, Kakaie F, Asadi M, Poursaei E, Kermani TA. FIS1 Overexpression Is Correlated with Tumor Metastasis in Gastric Adenocarcinoma. *J Gastrointest Cancer*. 2021. doi: [10.1007/s12029-021-00639-5](https://doi.org/10.1007/s12029-021-00639-5).

30. Yu Y, Peng XD , Qian XJ , et al. Fis1 phosphorylation by Met promotes mitochondrial fission and hepatocellular carcinoma metastasis. *Sig Transduct Target Ther*. 2021;6:401. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00790-2>

Figures

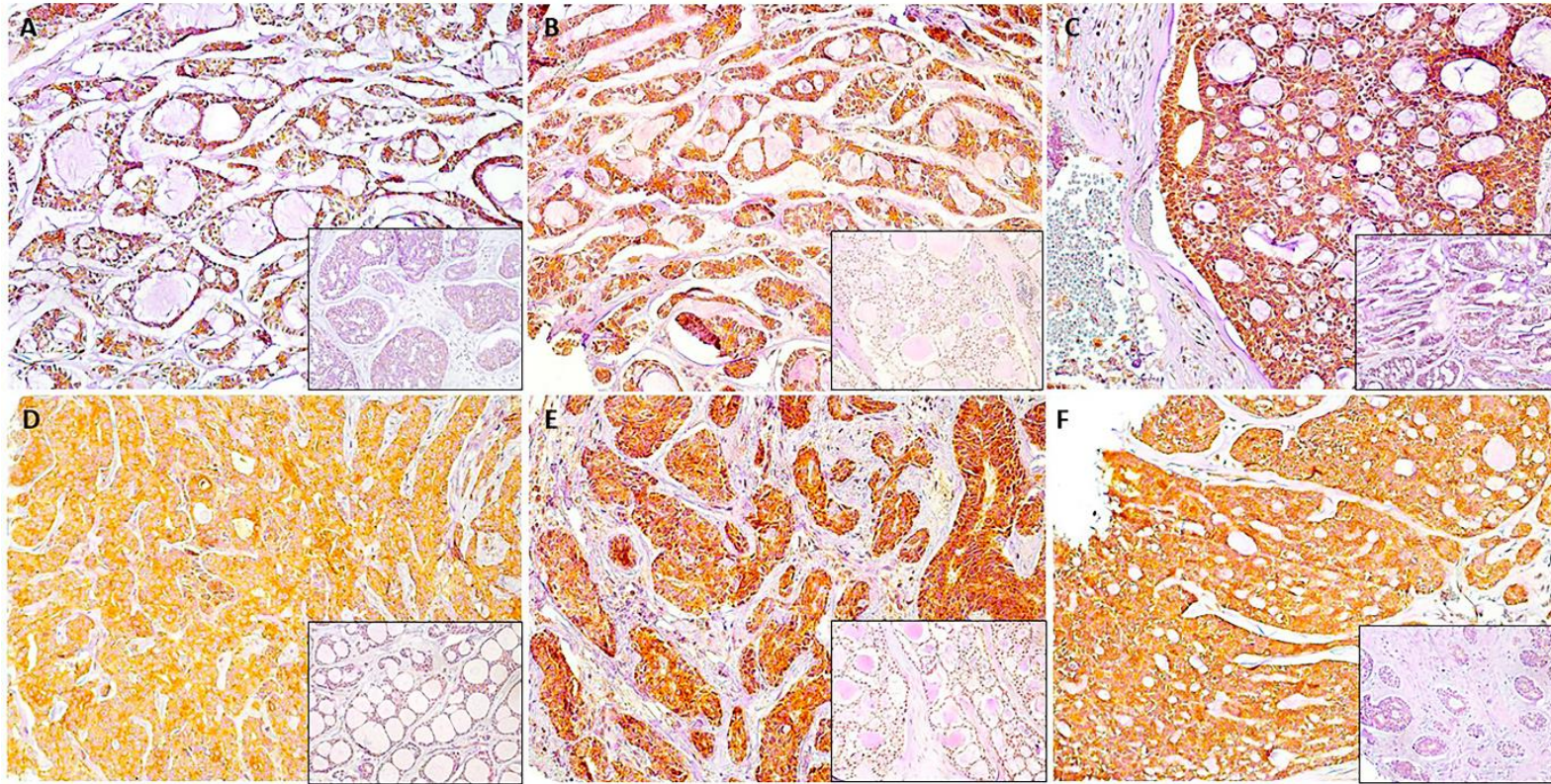


Figure 1. **A, B & C** Expression of AMT, MFN1 and MFN2 in both epithelial and myoepithelial cells of AdCC, showing strong positivity (insert: weak positivity for AMT, MFN1 and MFN1). **D, E & F** Strong expression of DRP1, FIS1 and OPA1 in AdCC (insert: weak positivity for DRP1, FIS1 and OPA1). DRP1 (**D**) and FIS1 (**E**) exhibit predominant positivity in myoepithelial cells. **F** shows positivity of OPA1, mostly in luminal cells.

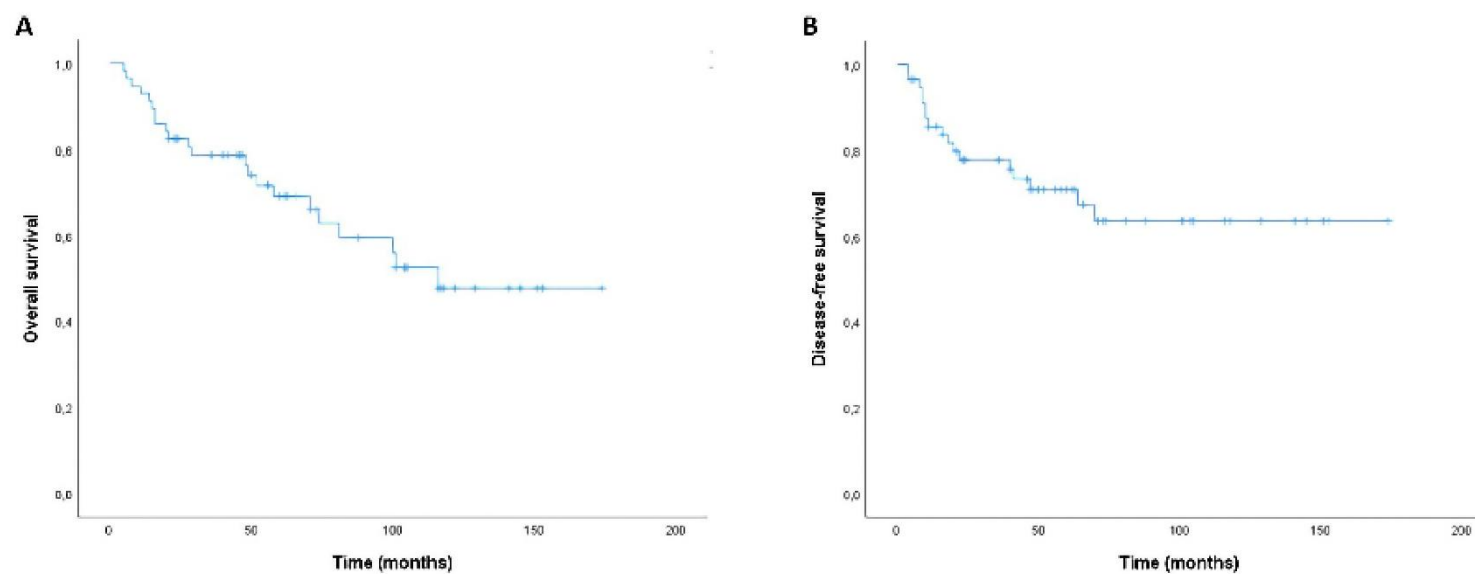


Figure 2. Kaplan-Meier survival curves. **A:** Overall survival was 69.1% after 5 years of follow-up, and 47.7% after 10 years of follow-up. **B:** Disease-free survival after 5 and 10 years of follow-up were 70.8% and 63.5%, respectively.

Tables

Table 1. Clinicopathologic characteristics of 57 cases of adenoid cystic carcinoma

Clinicopathological variables	n (%)
Sex	
Female	32 (56.1)
Male	25 (43.9)
Age (23-86)	
< 54.9	29 (50.9)
> 54.9	28 (49.1)
Site	
Palate	36 (63.2)
Others	21 (36.8)
T stage	
Early stage (I,II)	48 (84.2)
Advanced stage (III, IV)	9 (15.8)
N stage	
Negative	42 (73.7)
Positive	15 (26.3)
M stage	
Yes	13 (22.8)
No	44 (77.2)
TNM	
Early stage (I, II)	38 (66.7)
Advanced stage (III, IV)	19 (33.3)
Histological pattern	
Cribiform and Tubular	40 (70.2)
Solid	17 (29.8)
Vascular invasion	
Yes	21 (36.8)
No	36 (63.2)
Neural invasion	
Yes	21 (36.8)
No	36 (63.2)
Surgical margins	
Positive	13 (22.8)
Negative	44 (77.2)
Treatment	
Surgery	35 (61.4)
Surgery + Chemo/Radio	22 (38.6)
Recurrence	
Yes	17 (29.8)
No	40 (70.2)
Status	
Alive	35 (61.4)
Dead	22 (38.6)
AMT	
Negative/Weak	24 (42.1)
Moderate/Strong	29 (50.9)
MFN1	
Negative/Weak	31 (54.4)
Moderate/Strong	12 (21.1)
MFN2	
Negative/Weak	37 (64.9)
Moderate/Strong	13 (22.8)
DRP1	
Negative/Weak	16 (28.1)
Moderate/Strong	29 (50.9)
OPA1	
Negative/Weak	27 (47.4)
Moderate/Strong	14 (24.6)
FIS1	
Negative/Weak	23 (40.4)
Moderate/Strong	28 (49.1)

Table 2. Correlation between AMT, MFN1, MFN2, OPA1, FIS1 and DRP1 expression and clinicopathologic features

Clinicopathological variables	AMT			MFN1			MFN2			OPA1			FIS1			DRP1		
	N+W (n)	M+S (n)	p-value	N+W (n)	M+S (n)	p-value	N+W (n)	M+S (n)	p-value	N+W (n)	M+S (n)	p-value	N+W (n)	M+S (n)	p-value	N+W (n)	M+S (n)	p-value
Sex																		
Female	9	20	0.022	16	7	0.692	23	5	0.139	17	5	0.097	12	18	0.382	9	18	0.703
Male	15	9		15	5		14	8		10	9		11	10		7	11	
Age																		
< 54.9	10	15	0.465	14	7	0.438	16	8	0.256	12	9	0.228	12	13	0.683	6	16	0.256
> 54.9	14	14		17	5		215			15	5		11	15		10	13	
Site																		
Palate	15	18	0.974	17	10	0.158	21	9	0.522	13	10	0.196	12	19	0.254	5	21	<0.01
Others*	9	11		14	2		16	4		14	4		11	9		11	8	
T stage																		
Early stage (I,II)	22	22	0.160	26	5	1.000	30	11	1.000	22	13	0.645	19	23	1.000	15	24	0.399
Advanced stage (III, IV)	2	7		10	2		7	2		5	1		4	5		1	5	
N stage																		
Negative	18	21	0.832	23	11	0.405	28	9	0.719	20	11	1.000	16	20	0.884	14	19	0.164
Positive	6	8		8	1		9	4		7	3		7	8		2	10	
M stage																		
Yes	5	7	0.775	8	0	0.082	7	4	0.445	5	3	1.000	6	7	0.929	2	9	0.279
No	19	22		23	12		30	9		22	11		17	21		14	20	
TNM																		
Early stage (I, II)	18	17	0.210	20	10	0.290	25	8	0.693	18	10	1.000	14	18	0.802	13	17	0.189
Advanced stage (III, IV)	6	12		11	2		12	5		9	4		9	10		3	12	
Histological pattern																		
Cribiform and Tubular	17	19	0.680	19	10	0.279	30	6	0.016	19	10	1.000	17	19	0.637	13	17	0.189
Solid	7	10		12	2		7	7		8	4		6	9		3	12	
Vascular invasion																		
Yes	11	8	0.168	13	3	0.484	15	4	0.742	11	5	0.754	10	8	0.268	5	12	0.502
No	13	21		18	9		22	9		16	9		13	20		11	17	
Neural invasion																		
Yes	13	8	0.049	10	4	1.000	12	7	0.171	7	4	1.000	10	9	0.405	2	13	0.028
No	11	21		21	8		25	6		20	10		13	19		14	16	
Recurrence																		
Yes	9	7	0.292	9	3	1.000	12	4	1.000	11	2	0.156	9	7	0.279	6	9	0.660
No	15	22		22	9		25	9		16	12		14	21		10	20	
Status																		
Dead	10	11	0.782	12	3	0.492	13	7	0.236	9	5	0.879	10	10		3	15	0.055
Alive	14	18		19	9		24	6		18	9		13	18	0.572	13	14	

Table 3. Impact of clinicopathologic features and mitochondrial dynamics proteins in the 5 and 10-year overall survival and disease-free survival rates using the log-rank univariate analysis

Clinicopathological variables	Overall survival		Chi-square	p-value	Disease-free survival			
	5-years survival (%)	10-years survival (%)			5-years DFS (%)	10-years DFS (%)	Chi-square	p-value
Sex								
Female	67.1	54.3	0.037	0.847	64.5	64.5	0.238	0.626
Male	72.5	43.1			78.5	61.0		
Age								
< 54.9	75.4	51.5	0.796	0.372	74.4	65.1	0.183	0.669
> 54.9	60.5	45.4			67.1	67.1		
Site								
Palate	73.2	53.9	0.546	0.460	80.1	74.4	4.986	0.026
Others*	61.9	34.4			56.7	45.4		
T stage								
Early T stage (I,II)	79.2	56.7	14.867	< 0.01	76.2	68.0	7.591	< 0.01
Advanced T stage (III, IV)	22.2	11.1			37.5	37.5		
N stage								
Negative	80.7	68.8	14.094	< 0.01	71.9	67.1	0.217	0.641
Positive	40.7	8.1			67.5	50.6		
M stage								
Yes	48.1	9.6	8.604	< 0.01	64.5	48.4	0.491	0.484
No	76.2	65.0			72.7	67.8		
TNM								
Early stage (I, II)	84.0	76.4	17.310	< 0.01	76.9	71.4	2.706	0.100
Advanced stage (III, IV)	43.0	12.3			58.4	46.7		
Histological pattern								
Cribiform and Tubular	85.6	75.1	25.907	< 0.01	72.7	67.9	1.151	0.283
Solid	32.7	0.00			69.3	55.5		
Vascular invasion								
Yes	51.6	22.3	8.115	< 0.01	38.0	25.3	22.138	< 0.01
No	80.2	66.8			90.7	90.7		
Neural invasion								
Yes	35.4	0.00	31.172	< 0.01	62.3	46.7	2.628	0.105
No	90.5	79.8			76.2	71.4		
Surgical margins								
Positive	53.8	21.5	5.228	0.022	15.4	0.00	48.897	< 0.01
Negative	74.0	59.7			90.0	90.0		
Treatment								
Surgery	73.3	61.5	2.508	0.113	65.1	59.2	0.761	0.383
Surgery + Chemo/Radio	62.3	27.3			80.4	70.4		
AMT								
Negative/Weak	64.8	37.0	0.031	0.886	62.0	51.7	0.585	0.444
Moderate/Strong	67.4	53.1			74.7	74.7		
MFN1								
Negative/Weak	72.9	43.2	0.698	0.403	72.9	66.2	0.031	0.861
Moderate/Strong	75.0	.			68.6	68.6		
MFN2								
Negative/Weak	72.7	45.2	0.758	0.384	69.1	55.9	0.001	0.972
Moderate/Strong	59.8	29.9			64.5	64.5		
DRP1								
Negative/Weak	77.8	.	3.719	0.054	62.5	62.5	0.107	0.743
Moderate/Strong	67.2	28.2			71.7	57.3		
OPA1								
Negative/Weak	66.2	56.7	0.023	0.879	58.5	50.2	3.811	0.051
Moderate/Strong	92.9	43.5			92.3	80.8		
FIS1								
Negative/Weak	73.4	22.6	0.230	0.631	66.3	49.8	0.396	0.529
Moderate/Strong	66.0	59.4			73.0	73.0		

Table 4. Multivariate Cox regression model for overall survival and disease-free survival

Variables	Overall survival				Disease-free survival			
	Hazard ratio	95% CI		<i>p</i> -value	Hazard ratio	95% CI		<i>p</i> -value
		Lower	Upper			Lower	Upper	
T stage	2.268	0.775	6.640	0.135	0.208	0.040	1.084	0.062
N stage	6.604	0.723	60.292	0.094	NA	NA	NA	NA
M stage	0.407	0.053	3.149	0.389	NA	NA	NA	NA
Microscopic pattern	3.931	1.367	11.301	0.011	NA	NA	NA	NA
Vascular invasion	1.547	0.452	5.288	0.487	0.580	0.129	2.601	0.477
Neural invasion	2.739	0.799	9.393	0.109	NA	NA	NA	NA
Surgical margins	1.953	0.531	7.185	0.314	0.072	0.015	0.343	<0.01
Site	NA	NA	NA	NA	1.325	0.414	4.242	0.635
OPA1	NA	NA	NA	NA	2.530	0.526	12.172	0.247

NA: not applicable.

5 CONCLUSÃO

Os marcadores da dinâmica mitocondrial parecem ter um potencial prognóstico limitado para a amostra de CAC investigada, mas seu padrão de expressão sugere que esses componentes podem desempenhar algum papel biológico importante para o desenvolvimento dessa neoplasia agressiva.

Considerando o atual conhecimento da base molecular do CAC, diversos biomarcadores, mesmo não apresentando associação com o prognóstico de pacientes, apresentam potencial para o desenvolvimento de terapias sistêmicas alvo, demonstrado através de resultados de estudos *in vitro*.

Assim, outros estudos que avaliem os marcadores de dinâmica mitocondrial, através de experimentos que possibilitem o uso de metodologias mais elaboradas, tecnologia avançada e ensaios laboratoriais mecanísticos, são necessários para melhor compreender a ação da dinâmica mitocondrial no processo de tumorigênese do CAC.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA-PINTO, Y. D. *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.
- AMIT, M. *et al.* Defining the surgical margins of adenoid cystic carcinoma and their impact on outcome: An international collaborative study. **Head & neck**, v. 39, n. 5, p. 1008-1014, 2017.
- ARCHER, S. L. Mitochondrial Dynamics – Mitochondrial Fission and Fusion in Human Diseases. **The New England Journal of Medicine**, v 369, p. 2236-3251, 2013.
- BELL, D.; HANNA, E. Y. Head and neck adenoid cystic carcinoma: what is new in biological markers and treatment?. **Current opinion in otolaryngology & head and neck surgery**, v. 21, n. 2, p. 124-129, 2013.
- BELL D. *et al.* International Agency for Research on Cancer (IARC). Salivary gland tumours. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, eds. **World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours**, Lyon, France: IARC Press; 2017. p. 33.
- BJØRNDAL, K. *et al.* Salivary adenoid cystic carcinoma in Denmark 1990–2005: Outcome and independent prognostic factors including the benefit of radiotherapy. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). **Oral oncology**, v. 51, n. 12, p. 1138-1142, 2015.
- BONFITTO, V. L. *et al.* High-grade transformation of adenoid cystic carcinomas: a study of the expression of GLUT1 glucose transporter and of mitochondrial antigen. **Journal of clinical pathology**, v. 63, n. 7, p. 615-619, 2010.
- BRAYER, K.J. *et al.* Recurrent fusions in MYB and MYBL1 define a common, transcription factor–driven oncogenic pathway in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Cancer discovery**, v. 6, n. 2, p. 176-187, 2016.
- CHEN, W.; ZHAO, H.; & LI, Y. Mitochondrial dynamics in health and disease: mechanisms and potential targets. **Signal transduction and targeted therapy**, v. 8(1), p. 333, 2023.
- COCA-PELAZ, A. *et al.* Adenoid cystic carcinoma of the head and neck—An update. **Oral oncology**, v. 51, n. 7, p. 652-661, 2015.
- DARVIN, P.; SASIDHARAN NAIR, V. Understanding mitochondrial dynamics and metabolic plasticity in cancer stem cells: Recent advances in cancer treatment and potential therapeutic approaches. **Frontiers in Oncology**, v. 13, p.1155774, 2023.
- DILLON, P. M. *et al.* Adenoid cystic carcinoma: a review of recent advances, molecular targets, and clinical trials. **Head & neck**, v. 38, n. 4, p. 620-627, 2016.
- EL-HATTAB, A. W. *et al.* Mitochondrial dynamics: Biological roles, molecular machinery, and related diseases. **Molecular Genetics and Metabolism**, v. 125, n. 4, p. 315-321, 2018.

FONSECA, F. P. *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.

FONSECA, F. P. *et al.* Tissue microarray is a reliable method for immunohistochemical analysis of pleomorphic adenoma. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 117, n. 1, p. 81-88.

FONSECA, F. P. *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.

GARG, M.; TUDOR-GREEN, B.; BISASE, B. Current thinking in the management of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 57, n. 8, p. 716-721, 2019.

HOBERMAN, H. D. Is there a role for mitochondrial genes in carcinogenesis?. **Cancer Research**, v. 35, p. 3332-3335, 1975.

JU, J. *et al.* The role of perineural invasion on head and neck adenoid cystic carcinoma prognosis: a systematic review and meta-analysis. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v.122, n. 6, p.691-701, 2016.

KASHATUS, D. F. The regulation of tumor cell physiology by mitochondrial dynamics. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 500, n. 1, p. 9-16, 2018.

MARTINS-ANDRADE, B. *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.

MEYERHOLZ, D. K.; BECK, A. P. Principles and approaches for reproducible scoring of tissue stains in research. **Laboratory Investigation**, v. 98, p. 844-855, 2018.

O'ROURKE, B. From bioblasts to mitochondria: ever expanding roles of mitochondria in cell physiology. **Frontiers in physiology**, v. 1, 2010.

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

QUINTANA-CABRERA, R.; SCORRANO, L. Determinants and outcomes of mitochondrial dynamics. **Molecular Cell**, v. 83(6), p.857-876, 2023.

RODRIGUES, Ti.; FERRAZ, L. S. Therapeutic potential of targeting mitochondrial dynamics in cancer. **Biochemical Pharmacology**, v. 182, p. 114282, 2020.

ROY, S., *et al.* Mitochondria act as a key regulatory factor in cancer progression: current concepts on mutations, mitochondrial dynamics, and therapeutic approach. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, p. 108490, 2024.

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

APÊNDICE A – Atividades desenvolvidas durante o curso de doutorado

Artigos publicados

RODRIGUES, C. I.; LOPEZ, C. B. V. ; **SANTANA, M. S. P.** ; SOARES, C. D. ; CARVALHO, M. G. F. ; van HEERDEN, W. F. P. ; ROBINSON, L. ; RADHAKRISHNAN, RAGHU ; HUNTER, K. D. ; GOMEZ, R.S. ; ALMEIDA, O. P. ; VARGAS, P. A. ; GUNHAN, O. ; TOMASI, R. A. ; ALAWI, F. ; PONTES, H. A. R. ; FONSECA, F. P. . **Oral lesions containing amyloid-like material. Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**, v. 132, p. 190-201, 2021.

SANTANA, M. S. P.; LOPEZ, C. B. V. ; LIMA, L. A. ; SOARES, C. D. ; RADHAKRISHNAN, R. ; GOMEZ, R.S. ; VARGAS, P. A. ; FONSECA, F. P. . **Expression of mitochondrial dynamic markers in adenoid cystic carcinoma. Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 51, p. 702-709, 2022

COSTA, R. F.; LEÃO, M.L.B.; **SANTANA, M. S. P.**; MESQUITA, R.A. ; GOMEZ, R.S. ; SANTOS-SILVA, A. R. ; KHURRAM, S. A. ; TAILOR, A. ; SCHOUWSTRA, C. ; ROBINSON, L. ; VAN HEERDEN, W. F. P. ; TOMASI, R. A. ; GORRINO, R. ; DE PRATO, R. S. F. ; TAYLOR, A. M. ; URIZAR, J. M. A. ; DE MENDOZA, I. L. I. ; RADHAKRISHNAN, R. ; CHANDRASHEKAR, C. ; CHOI, S. ; THOMSON, P. ; PONTES, H. A. R. ; FONSECA, F. P. . **Oral Squamous Cell Carcinoma Frequency in Young Patients from Referral Centers Around the World. Head and Neck Pathology**, v. 16, p. 755-762, 2022.

GOMES, N. R. ; LIMA, L. A. ; PERDIGAO, A. L. M. ; LOPEZ, C. B. V. ; **SANTANA, M. S. P.** ; PONTES, H. A. R. ; PONTES, F. S. C. ; SMIT, C. ; ROBINSON, L. ; VAN HEERDEN, W. F. P. ; BRASILEIRO, C. B. ; BRENNAN, PETER A. ; FONSECA, F. P. . **Radiological aspects of lymphomas and leukaemias affecting the jaws: a systematic review. Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 52, p. 315-323, 2023.

ARAÚJO, ANNA LUÍZA DAMACENO ; SILVA, VIVIANE MARIANO DA ; MORAES, MATHEUS CARDOSO ; DE AMORIM, HENRIQUE ALVES ; FONSECA, FELIPE PAIVA ; **SANT'ANA, MARIA SISSA PEREIRA** ; MESQUITA, RICARDO ALVES ; MARIZ, BRUNO AUGUSTO LINHARES ALMEIDA ; PONTES, HÉLDER ANTÔNIO REBELO ; DE SOUZA, LUCAS LACERDA ; SALDIVIA'SIRACUSA, CRISTINA ; KHURRAM, SYED ALI ; PEARSON, ALEXANDER T. ; MARTINS, MANOELA DOMINGUES ; LOPES, MARCIO AJUDARTE ; VARGAS, PABLO AGUSTIN ; KOWALSKI, LUIZ PAULO ; SANTOS'SILVA, ALAN ROGER . **The use of deep learning state-of-the-art architectures for oral epithelial dysplasia grading: A comparative appraisal. Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 52, p. 980-987, 2023.

SOUZA, LUCAS LACERDA DE ; CÁCERES, CINTHIA VERONICA BARDÁLEZ LÓPEZ DE ; **SANT'ANA, MARIA SISSA PEREIRA** ; PENAFORT, PAULO VICTOR MENDES ; ANDRADE, BRUNO AUGUSTO BENEVENUTO DE ; PONTES, HÉLDER ANTÔNIO REBELO ; CASTRO, WAGNER HENRIQUES DE ; MESQUITA, RICARDO ALVES ; XAVIER-JÚNIOR, JOSÉ CÂNDIDO CALDEIRA ; SANTOS-SILVA, ALAN ROGER ; LOPES, MÁRCIO AJUDARTE ; SOARES, CIRO DANTAS ; ROBINSON, LIAM ; VAN HEERDEN, WILLIE F. P. ; BURBANO, ROMMEL MARIO RODRÍGUEZ ; ASSIS-MENDONÇA, GUILHERME ROSSI ; VASSALLO, JOSÉ ; SOUSA, SILVIA FERREIRA DE ; VARGAS, PABLO AGUSTIN ; FONSECA, FELIPE PAIVA . **Oral follicular lymphoma: a clinicopathologic and molecular study.** *Journal of Hematopathology*, v. 16, p. 199-208, 2023.

LÓPEZ DE CÁCERES, CINTHIA V. B.; **SANT'ANA, MARIA S. P.** ; ROMAN TAGER, ELENA M. J. ; BURBANO, ROMMEL M. R. ; DE ALMEIDA, OSLEI P. ; VARGAS, PABLO A. ; FONSECA, FELIPE P. . **Extracavitary Primary Effusion Lymphoma Affecting the Oral Cavity: A Rare Case Report.** *International Journal of Surgical Pathology*, v. 32, p. 119-132, 2024.

Artigo aceito para publicação

GRANULOMA DE CÉLULAS GIGANTES DOS MAXILARES E TUMOR RICO EM CÉLULAS GIGANTES DOS OSSOS E TECIDOS MOLES POSITIVOS PARA QUERATINA

Bruna Pizziolo Coura, **Maria Sissa Pereira Sant'Ana**, Felipe Paiva Fonseca, Silvia Ferreira de Sousa, Carolina Cavalieri Gomes and Ricardo Santiago Gomez

Journal of Oral Pathology & Medicine

Artigo submetido

EVALUATION OF THE IMPACT OF MYB PROTEIN EXPRESSION ON THE PROGNOSIS OF PATIENTS WITH ADENOID CYSTIC CARCINOMA

Maria Sissa Pereira Sant'Ana, Lorryani Cavassani, Cinthia Verónica Bardález López de Cáceres, Sara Ferreira dos Santos Costa, Pablo Agustin Vargas, Ciro Dantas Soares, Lynne Bingle, Nathalia Rodrigues Gomes, Juan Manoel Arteaga Legarrea and Felipe Paiva Fonseca

Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal

Participação em Congressos e eventos similares

- 1ª Reunião Online SOBEP/ 2020
- El VIII Simposio Internacional Avances en Cáncer Oral/ 2020
- International Congress on Oral Pathology and Oral Medicine (IAOP)/ 2021
- 46º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral/ 2021
- 47º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral/ 2022
- XVII Reunión de la Academia Iberoamericana de Patología y Medicina Bucal y I Congreso de la Sociedad Paraguaya de Patología y Medicina Bucal/ 2022
- 50º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral/ 2024

Outras atividades

- Mobilidade acadêmica com duração de 06 meses para a University of Sheffield, sob supervisão da Prof. Lynne Bingle, financiada pelo programa CAPES PrInt/2023:
 - Atividades laboratoriais desenvolvidas: cultura celular, transfecção de células utilizando a tecnologia TurboID, western blot e imunofluorescência.
- Implementação de reações de citogenética no Laboratório de Microbiologia e Biomateriais da FAO-UFGO:
 - padronização e realização das reações de hibridização *in situ* por cromógeno (CISH) para as sondas EBV; HPV high-risk; HPV 6-11; kappa e lambda
 - padronização das reações de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) para as sondas: CCND1, MYC, BCL-2. (em andamento);
- Membro da Comissão Organizadora do Curso de Atualização em Patologia de Glândula Salivar (2022), Coordenado pelo Prof. Felipe Paiva Fonseca, ofertado pelo CENEX;
- Membro da Comissão Organizadora do 47º Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral/ 2022;

- Banca de Avaliação das Apresentações Orais de Pôsteres durante o 47º Congresso da Sociedade Brasileira de Estomatologia e Patologia Oral/ 2022;
- Mobilidade acadêmica: Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) – Outubro/2022;
- Mobilidade acadêmica: Hospital Universitário João de Barros Barreto – Belém/PA Março/2022;
- Participação em banca de Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Odontologia) - Universidade Federal de Minas Gerais/ 2022;
- Membro da Comissão Organizadora do Curso de Atualização em Doenças da Boca (2021), Coordenado pelo Prof. Felipe Paiva Fonseca, ofertado pelo CENEX;
- Comissão online de Pré-Avaliação dos Trabalhos Inscritos no XV Encontro Científico da FO/UFGM (2021);

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do perfil proteômico dos tumores de glândulas salivares

Pesquisador: Felipe Paiva Fonseca

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 65798717.3.0000.5149

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.315.994

Apresentação do Projeto:

Neste projeto de pesquisa serão recuperados de forma retrospectiva dos arquivos de patologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) os tecidos de 130 tumores de glândulas salivares e 10 glândulas salivares normais ambos fixados em formol e emblocados em parafina na seguinte distribuição: 10 casos de carcinoma adenoide cístico, 10 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, 10 casos de carcinoma mucoepidermoide, 10 casos de carcinoma secretório, 10 casos de carcinoma de células acinares, 10 casos de carcinoma exadenoma pleomórfico, 10 casos de carcinoma epitelial-mioepitelial, 10 casos de carcinoma mioepitelial, 10 casos de adenocarcinoma sem outra especificação, 10 casos de adenoma pleomórfico, 10 casos de tumor de Whartin, 10 casos de adenoma canalicular, 10 casos de adenoma de células basais e 10 casos de glândulas salivares menores presentes em biópsias de mucocoele. Novos cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina (H&E) serão revisados de acordo com os critérios atuais da Organização Mundial da Saúde por dois patologistas orais de forma independente para confirmação diagnóstica e descrição das características microscópicas de cada caso.

Os dados clínico-patológicos referentes à idade, sexo, localização da lesão, presença de dor e parestesia, presença de recidivas e/ou metástases à distância, tratamento realizado, e acompanhamento (paciente vivo ou morto), serão recuperados também retrospectivamente dos

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.315.994

prontuários médicos e odontológicos dos pacientes. Para avaliação do potencial de determinação prognóstica dos biomarcadores, a expressão destas proteínas será correlacionada com a sobrevida livre de doença (definida como sendo o tempo entre a data do tratamento realizado e a ocorrência da recidiva do tumor ou ultimo acompanhamento livre de doença) e a sobrevida total (definida como sendo o tempo entre a data do tratamento realizado e a data do óbito do paciente ou do último acompanhamento) dos pacientes estudados. Para análise do perfil proteômico das neoplasias investigadas, serão confeccionados no laboratório de patologia da Faculdade de Odontologia da UFMG (Belo Horizonte – MG) novos cortes histológicos de 10m de espessura de cada um dos blocos de parafina recuperados. As células neoplásicas serão selecionadas por meio de microdissecção a laser utilizando-se o equipamento disponível no Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG (Belo Horizonte – MG) e então submetidas a análise proteômica pela técnica de espectrometria de massas que será realizada no Laboratório Nacional de Biociências (Campinas - SP). Após a identificação dos potenciais marcadores diagnósticos e prognósticos por meio da espectrometria de massas, estes marcadores serão então validados quanto aos seus potenciais preditivos utilizando 40 casos adicionais de cada neoplasia. Estes casos serão então organizados em microarranjo tecidual em matriz (tissue microarray - TMA) utilizando-se o equipamento de TMA disponível na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) (Piracicaba - SP) para otimizar o uso dos tecidos parafinados e diminuir os custos da pesquisa, e serão então submetidos a reações de imunistoquímica para detecção das proteínas de interesse na Faculdade de Odontologia da UFMG (Belo Horizonte – MG). O perfil de expressão dos marcadores será determinado por meio de análises digitais utilizando-se um escaneador de lâminas e algoritmos digitais disponíveis na Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP) (Piracicaba - SP). Testes estatísticos serão utilizados para determinar o potencial prognóstico e diagnóstico de cada marcador investigado.

Objetivo da Pesquisa:

Hipótese:

A determinação do perfil proteômico das neoplasias de glândulas salivares será útil para a aquisição de novos biomarcadores com potenciais diagnóstico e prognóstico.

Objetivo Primário:

Identificar novos biomarcadores diagnósticos e prognósticos para neoplasias de glândulas salivares por meio da determinação do perfil proteômico destes tumores.

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coop@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.315.994

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o pesquisador:

Riscos:

Uma vez que as biópsias e cirurgias foram realizadas independentemente e previamente ao planejamento desta pesquisa, sendo os blocos de parafina coletados de forma retrospectiva de arquivos a partir da autorização dos participantes, espera-se que apenas a identificação do sujeito represente um potencial risco ou desconforto ao mesmo. Para minimizar este possível desconforto, destacamos que os dados de identificação dos

participantes ficarão sob a guarda restrita dos pesquisadores durante a realização da pesquisa, na Faculdade de Odontologia da UFMG (Belo Horizonte – MG), sendo de cunho confidencial e seu nome não será divulgado.

Benefícios:

Não haverá benefício direto ao sujeito, uma vez que as biópsias e cirurgias foram realizadas independentemente da pesquisa e anterior a ela. Com relação aos benefícios científicos, essa pesquisa gerará um maior conhecimento a cerca do comportamento biológico de um grupo de neoplasias que compromete a qualidade de vida dos indivíduos afetados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa relevante para as áreas de Medicina e Odontologia, especialmente para as sub áreas de Patologia Oral, Estomatologia, Cirurgia de cabeça e pescoço, Cirurgia bucomaxilofacial e Oncologia. O projeto será desenvolvido pelo Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca, com término previsto para 01/06/2021.

As solicitações do COEP foram atendidas:

- foram realizadas adequações no TCLE;
- as informações sobre os riscos da pesquisa foram acrescentadas no corpo do projeto (de acordo com o que estava descrito no TCLE);
- em relação à anuência do ICB da UFMG e do Laboratório Nacional de Biociências (Campinas - SP, o autor esclareceu que o acesso a estas instalações se dá por meio de solicitações e agendamentos a serem realizados no momento mais oportuno. O pedido de uso destes laboratórios se dá por meio de fluxo contínuo durante o ano. Este esclarecimento foi incluído também no texto do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram incluídos os seguintes documentos:

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005
Bairro: Unidade Administrativa II **CEP:** 31.270-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3409-4592 **E-mail:** coep@prpq.ufmg.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS



Continuação do Parecer: 2.315.994

- Informações Básicas do Projeto;
- Projeto de pesquisa Detalhado;
- TCLE;
- Justificativa de atraso na resposta às considerações propostas pelo COEP;
- Carta resposta às recomendações do COEP;
- Currículo vitae do pesquisador responsável;
- Parecer com aprovação do projeto de pesquisa pelo departamento;
- Declaração de Instituição e Infraestrutura (carta de anuência da Faculdade de Odontologia da UFMG);
- Folha de rosto.

Recomendações:

Recomenda-se a aprovação do projeto de pesquisa.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Somos favoráveis à aprovação do projeto "Estudo do perfil proteômico dos tumores de glândulas salivares" do pesquisador responsável Prof. Dr. Felipe Paiva Fonseca.

Considerações Finais a critério do CEP:

Tendo em vista a legislação vigente (Resolução CNS 466/12), o COEP-UFMG recomenda aos Pesquisadores: comunicar toda e qualquer alteração do projeto e do termo de consentimento via emenda na Plataforma Brasil, informar imediatamente qualquer evento adverso ocorrido durante o desenvolvimento da pesquisa (via documental encaminhada em papel), apresentar na forma de notificação relatórios parciais do andamento do mesmo a cada 06 (seis) meses e ao término da pesquisa encaminhar a este Comitê um sumário dos resultados do projeto (relatório final).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_877835.pdf	22/09/2017 14:57:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_de_pesquisa.doc	22/09/2017 14:56:55	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	Justificativa_de_atraso.docx	22/09/2017 14:56:03	Felipe Paiva Fonseca	Aceito

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
MINAS GERAIS**



Continuação do Parecer: 2.315.994

Ausência	Justificativa_de_atraso.docx	22/09/2017 14:56:03	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_revisado.doc	22/09/2017 14:55:34	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Resposta_aos_comentarios.docx	22/09/2017 14:55:21	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
Outros	Curriculo_vitae_Lattes.pdf	15/03/2017 09:15:21	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
Outros	Aprovacao_do_Departamento.pdf	15/03/2017 09:05:03	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_de_instituicao_e_infraestrutura.pdf	15/03/2017 09:03:57	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	15/03/2017 09:02:14	Felipe Paiva Fonseca	Aceito
Outros	657987173aprovacaoassinada.pdf	05/10/2017 10:53:13	Vivian Resende	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

BELO HORIZONTE, 05 de Outubro de 2017

**Assinado por:
Vivian Resende
(Coordenador)**

Endereço: Av. Presidente Antônio Carlos, 6627 2º Ad SI 2005

Bairro: Unidade Administrativa II

CEP: 31.270-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3409-4592

E-mail: coep@prpq.ufmg.br