



ARTIGO ORIGINAL

Carcinoma ex-pleomorphic adenoma derived from recurrent pleomorphic adenoma shows important difference by array CGH compared to recurrent pleomorphic adenoma without malignant transformation[☆]

Fernanda Viviane Mariano^{a,*}, Karina Giovanetti^a, Luis Fernando Vidal Saccomani^a, André Del Negro^b, Luiz Paulo Kowalski^c, Ana Cristina Victorino Krepischi^d, Albina Altemani^a

^a Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Patologia, Campinas, SP, Brasil

^b Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Faculdade de Ciências Médicas, Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, Campinas, SP, Brasil

^c AC Camargo Câncer Center, Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, São Paulo, SP, Brasil

^d Universidade de São Paulo (USP), Instituto de Biociências, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, São Paulo, SP, Brasil

Recebido em 11 de outubro de 2015; aceito em 8 de dezembro de 2015

KEYWORDS

Carcinoma ex-pleomorphic adenoma;
Recurrent pleomorphic adenoma;
Somatic copy number alterations;
aCHG

Abstract

Introduction: A key step of cancer development is the progressive accumulation of genomic changes resulting in disruption of several biological mechanisms. Carcinoma ex-pleomorphic adenoma (CXPA) is an aggressive neoplasm that arises from a pleomorphic adenoma. CXPA derived from a recurrent PA (RPA) has been rarely reported, and the genomic changes associated with these tumors have not yet been studied.

Objective: We analyzed CXPA from RPAs and RPAs without malignant transformation using array-comparative genomic hybridization (array-CGH) to identify somatic copy number alterations and affected genes.

Methods: DNA samples extracted from FFPE tumors were submitted to array-CGH investigation, and data was analyzed by Nexus Copy Number Discovery Edition v.7.

DOI se refere ao artigo: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjorl.2015.12.004>

Como citar este artigo: Mariano FV, Giovanetti K, Saccomani LF, Del Negro A, Kowalski LP, Krepischi AC, et al. Carcinoma ex-pleomorphic adenoma derived from recurrent pleomorphic adenoma shows important difference by array CGH compared to recurrent pleomorphic adenoma without malignant transformation. Braz J Otorhinolaryngol. 2016;82:687-94.

* Autor para correspondência.

E-mail: fevimariano@gmail.com (F.V. Mariano).

PALAVRAS-CHAVE

Carcinoma
ex-adenoma
pleomórfico;
Adenoma pleomórfico
recorrente;
Alterações no número
de cópias somáticas;
aCGH

Results: No somatic copy number alterations were found in RPAs without malignant transformation. As for CXPA from RPA, although genomic profiles were unique for each case, we detected some chromosomal regions that appear to be preferentially affected by copy number alterations. The first case of CXPA-RPA (frankly invasive myoepithelial carcinoma) showed copy number alterations affecting 1p36.33p13, 5p and chromosomes 3 and 8. The second case of CXPA-RPA (frankly invasive epithelial-myoepithelial carcinoma) showed several alterations at chromosomes 3, 8, and 16, with two amplifications at 8p12p11.21 and 12q14.3q21.2. The third case of CXPA-RPA (minimally invasive epithelial-myoepithelial carcinoma) exhibited amplifications at 12q13.3q14.1, 12q14.3, and 12q15.

Conclusion: The occurrence of gains at chromosomes 3 and 8 and genomic amplifications at 8p and 12q, mainly those encompassing the HMG2, MDM2, WIF1, WHSC1L1, LIRG3, CDK4 in CXAP from RPA can be a significant promotional factor in malignant transformation.

© 2016 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Published by Elsevier Editora Ltda. This is an open access article under the CC BY-license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Carcinoma ex-adenoma pleomórfico derivado de adenoma pleomórfico recorrente mostra diferença importante por *array* CGH em comparação com adenoma pleomórfico recorrente sem transformação maligna

Resumo

Introdução: Uma etapa fundamental do desenvolvimento do câncer é o acúmulo progressivo de alterações genômicas, resultando na ruptura de vários mecanismos biológicos. Carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) é uma neoplasia agressiva que surge a partir de um adenoma pleomórfico. O CXAP derivado de um AP recorrente (APR) foi raramente relatado e, até o momento, as alterações genômicas associadas a esses tumores não foram estudadas.

Objetivo: Avaliar as diferenças entre os CXAPs decorrentes de APRs e os APRs sem transformações malignas usando hibridização genômica comparativa em *microarrays* (array Comparative Genomic Hybridization - aCGH) a fim de identificar alterações no número de cópias somáticas e os genes afetados.

Método: Amostras de DNA extraídas de tumores provenientes de tecido embocado em parafina foram submetidos à investigação com a técnica aCGH, e os dados foram analisados com o Nexus Copy Number Discovery Edition v.7.

Resultados: Não observamos alterações no número de cópias somáticas nos APRs sem transformação maligna. Quanto ao CXAP de APR, embora os perfis genômicos sejam exclusivos para cada caso, detectamos algumas regiões cromossômicas que pareciam ser preferencialmente afetadas por alterações no número de cópias. O primeiro caso de CXAP-APR (carcinoma mioepitelial francamente invasivo) apresentou alterações no número de cópias afetando 1p36.33p13, 5p e cromossomos 3 e 8. O segundo caso de CXAP-APR (carcinoma epitelialmioepitelial francamente invasivo) apresentou várias alterações nos cromossomos 3, 8 e 16, com duas amplificações em 8p12p11.21 e 12q14.3q21.2. O terceiro caso de CXAP-APR (carcinoma epitelial-mioepitelial minimamente invasivo) apresentou amplificações em 12q13.3q14.1, 12q14.3, e 12q15.

Conclusão: A ocorrência de ganhos de cromossomos 3 e 8, e as amplificações genômicas em 8p e 12q, principalmente aquelas que englobam os HMG2, MDM2, WIF1, WHSC1L1, RG3, CDK4 no CXAP decorrente de APR podem ser fatores promocionais significativos para a transformação maligna.

© 2016 Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença CC BY (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Introdução

O adenoma pleomórfico (AP) é o tumor mais comum das glândulas salivares e representa cerca de 60% a 70% dessas neoplasias. É um tumor benigno com alto risco de recorrência e transformação maligna.¹ O risco de recorrência varia de 0,4% a 45%, dependendo da técnica cirúrgica²: 20% a 45% após enucleação, 2% a 5% após lobectomia da parótida e até 0,4% após parotidectomia radical.³ O adenoma pleomórfico recorrente (APR) presumidamente decorre da

ruptura de cápsula, ressecção incompleta de extensões microscópicas além da pseudocápsula, ou por origem multifocal.⁴

Risco de lesão permanente do nervo facial, característica multinodular e aumento da frequência de nova recidiva são fatores que dificultam o tratamento do APR.⁵ Além disso, o risco de transformação maligna aumenta com o tempo de doença.^{6,7} Até a presente data, o CXAP decorrente de APR foi raramente relatado e os estudos concentraram-se nas características histopatológicas e clínicas das lesões.⁸

A recorrência do tumor pode ser causada por aumento no número ou na complexidade das alterações genéticas ou por aquisição de mutações que promovem alterações malignas. O câncer é impulsionado por mutações adquiridas somaticamente, e acredita-se que os rearranjos cromossômicos se acumulam gradualmente ao longo do tempo.⁹ A triagem de todo o genoma, como a realizada por Hibridação Genômica Comparativa em *microarrays* (array Comparative Genomic Hybridization - aCGH), pode ser aplicada para revelar alterações no número de cópias que podem identificar a base molecular para a carcinogênese.

Neste estudo, o objetivo foi investigar por meio de aCGH o perfil genômico das alterações no número de cópias associadas a três casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) decorrentes de APR, identificar os genes envolvidos e comparar os resultados aos de quatro casos de APR sem transformação maligna.

Método

O presente estudo foi conduzido de acordo com as normas éticas da nossa instituição (Processo nº CEP/FOP 002/2011). As amostras de DNA foram extraídas de um cilindro com 1,5 mm de diâmetro de tecidos tumorais embebidos em parafina usando o kit de extração Qiagen (Qiagen GmbH, Hilden, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. O protocolo incluiu desparafinização com xileno, seguida por lavagens com metanol e 24 horas de incubação em 1 mol/L de tiocianato de sódio. Subsequentemente, o sedimento dos tecidos foi seco e digerido por 1,5 dias em tampão de lise com nível alto de proteinase K (60 µL). As amostras foram purificadas em coluna antes da eluição com tampão.

Amostras de DNA do tumor e de referência (reunidas a partir de sangue de diferentes doadores saudáveis; Promega, Madison, WI, EUA) foram diferentemente marcadas usando o kit de etiquetagem de DNA genômico (Enzo Genomic DNA Labeling), de acordo com as instruções do fabricante. Quinhentos ng de DNA do tumor e de referência foram co-hibridados em um *microarray* de oligonucleotídeo 180K (SurePrint G3 Humano CGH Microarray Kit 4× 180K, modelo 22060. Agilent Technologies, Palo Alto, CA, EUA), de acordo com as instruções do fabricante. Esse modelo contém 24.011 sondas exônicas. Imagens dos *microarrays* foram obtidas pelo Agilent Microarray Scanner Bundle, e os dados foram extraídos usando o programa Feature Extraction v.9.1 (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, EUA).

De dados do aCGH foram analisados com o programa Nexus Copy Number Discovery 7.0. As alterações genômicas no número de cópias foram identificadas com base no algoritmo de segmentação FASST2 (limiar de significância estabelecido em 5×10^{-8}), com limiares da razão de \log_2 de 0,2 ou 0,8 para ganhos ou alto ganho de cópias, respectivamente, e -0,2 ou -1,0 para perdas ou perdas homocigóticas, respectivamente.

Resultados

Dados clinicopatológicos do CXAP derivado de APR

O primeiro paciente (caso 1) era um homem de 72 anos de idade, encaminhado ao nosso hospital para avaliação de um

nódulo na glândula parótida medindo $9,0 \times 8,0$ centímetros, com um tempo relatado de evolução de dois anos. O paciente havia sido submetido à ressecção de um AP cinco anos antes. Durante o exame clínico, linfonodos palpáveis e invasão da pele subjacente foram observados. Havia ausência de lesões orais. Punção aspirativa por agulha fina revelou um AP. O tumor foi retirado com margens cirúrgicas positivas. O exame histológico mostrou a presença de AP e regiões de CXAP. A neoplasia foi classificada como um carcinoma mioepitelial francamente invasivo (fig. 1A e 1B). O paciente foi submetido à radioterapia e recorrência não foi observada em 58 meses de acompanhamento.

A segunda paciente (caso 2) era uma mulher de 66 anos de idade, encaminhada ao nosso hospital com queixa de um tumor na região da parótida por tempo indeterminado. A paciente havia sido submetida à ressecção de um AP 11 anos antes. O exame clínico descartou a presença de linfonodos palpáveis e lesões orais. Punção aspirativa por agulha fina confirmou a presença de um AP. A excisão do tumor foi realizada, mas as margens eram cirurgicamente positivas. O exame histológico revelou a presença de AP e CXAP, que foram classificados como carcinoma epitelial-mioepitelial francamente invasivo (fig. 1C e 1D). Não houve acompanhamento dessa paciente.

A terceira paciente (caso 3) era uma mulher de 30 anos de idade, encaminhada ao nosso hospital com queixa de um tumor na glândula parótida com dois anos de duração. A paciente havia sido submetida à ressecção de um AP 16 anos antes. Durante o exame clínico, linfonodos palpáveis e lesões orais não foram observados. Punção aspirativa por agulha fina mostrou a presença de AP. O tumor foi excisado com margens cirúrgicas negativas. A análise histopatológica mostrou regiões de AP e CXAP. O último era um carcinoma epitelial-mioepitelial minimamente invasivo (fig. 1E e 1F). Não houve acompanhamento dessa paciente.

Análise aCGH

Os casos de APR não apresentaram alterações no número de cópias somáticas. Todas as alterações cromossômicas somáticas detectadas nos CXAP dos casos 1, 2 e 3 estão detalhadas na tabela 1, bem como os genes conhecidos do câncer afetados, de acordo com o *Cancer Gene Census Sanger* (<https://www.sanger.ac.uk/research/projects/cancer-genome/census.html>). A figura 2 apresenta o perfil genômico global das alterações no número de cópias identificadas nos casos 1, 2 e 3 de CXAP. O primeiro CXAP derivado de APR exibiu perda em 1p36.33p13, ganhos nos cromossomos 8 e 3 e dois rearranjos cromossômicos adjacentes afetando 5p15.33p13.1 (perda) e 5p13.1q13.1 (ganho), respectivamente.

O segundo caso de CXAP derivado de APR apresentou um padrão genômico mais complexo, com várias alterações no número de cópias (ganhos e perdas), afetando os cromossomos 3, 8 e 16. Além disso, essa amostra incluiu perdas em 5q14.3q33.1, 5q35.3, 10p15.3p13, 14q11.2q32.2, 20q13.12 e ganhos em 6p22.2, 22q11.1q13. Regiões de alto ganho no número de cópias (amplificações) foram encontrados em 8p12p11.21 e 12q14.3q21.2 (fig. 3A). Os genes amplificados incluíram, entre outros, WHSC1L1 e FGFR1 em 8p e HMGA2 e MDM2 em 12q.

O terceiro caso exibiu perdas em 12q14.1q14.2 e 12q14.3q15 e amplificações em 12q13.3q14.1, 12q.14.3 e 12q15, abrangendo CDK4, LRRIG3, WIF1, HMGA2 e MDM2 (fig. 3B).

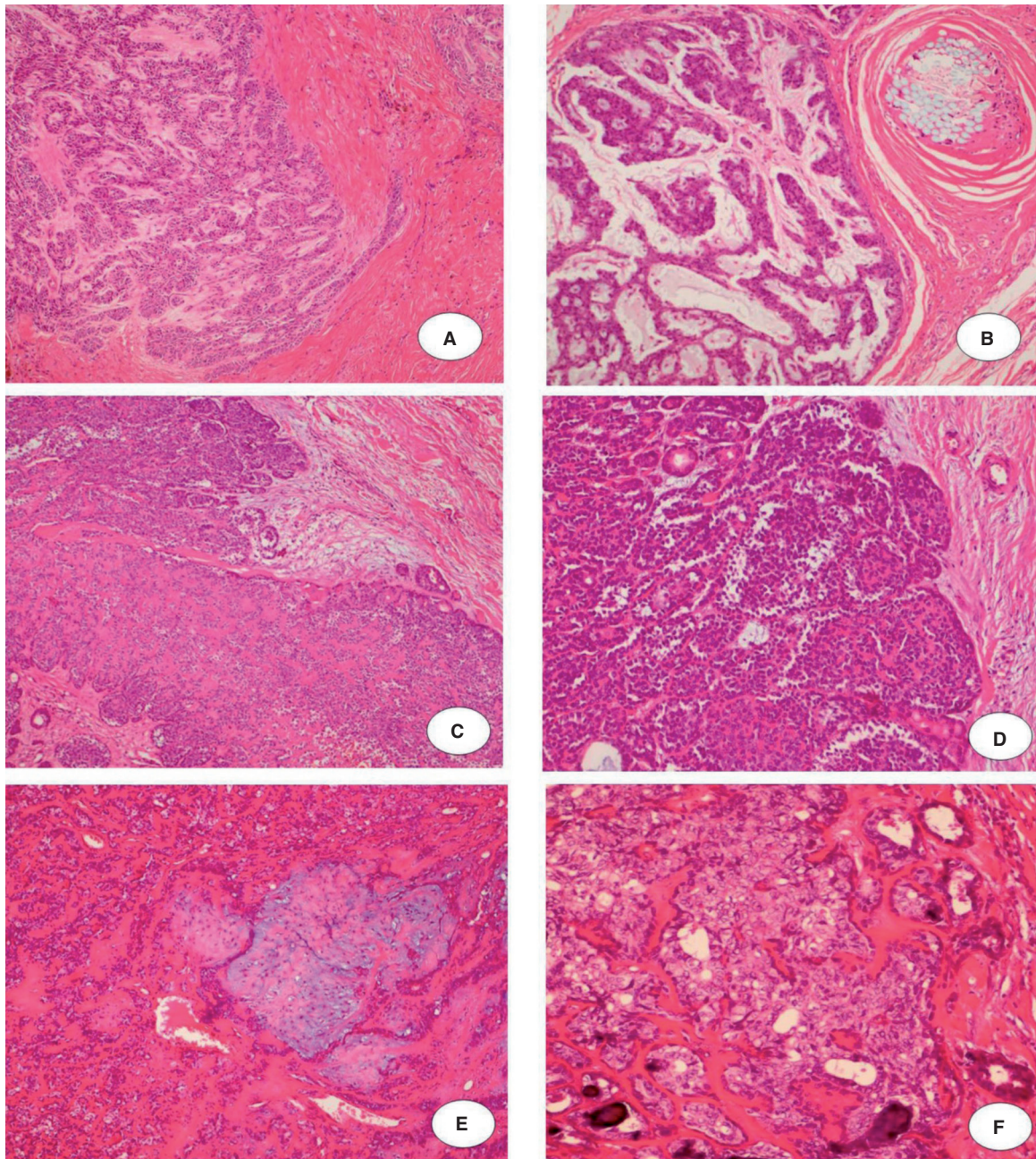


Figura 1 Carcinoma mioepitelial francamente invasivo: A, Ilha de células mioepiteliais infiltrando o tecido (H & E \times 10); B, Cordões de células mioepiteliais pleomórficas cercado por estroma mixoide. Observe a reação contra a sutura de uma cirurgia anterior no lado superior direito da imagem (H & E \times 20). Carcinoma epitelial-mioepitelial francamente invasivo: C, proliferação de células epiteliais e mioepiteliais em um crescimento nodular (H & E \times 10); D, Pequeno lume delimitado por células eosinofílicas, cubóides, intercaladas, semelhantes aos do ducto. Essas células estão cercadas por pequenas células citoplasmáticas não coradas. Observe a manutenção de células basais na periferia de células ninho cercada por septos fibrosos (H & E \times 20). Carcinoma epitelial-mioepitelial minimamente invasivo: E, Proliferação epitelial-mioepitelial provenientes de adenoma pleomórfico residual (H & E \times 10); F, Material eosinofílico, hialinizado de lâmina basal circunda ninhos de células tumorais e estruturas ductais compostas de células epiteliais e mioepiteliais (H & E \times 20).

Discussão

A carcinogênese ocorre em várias etapas através de alterações genômicas que resultam em perda das funções supressoras do tumor, ativação de oncogenes e/ou geração de genes de fusão com potencial oncogênico.¹⁰ Essas alterações geram expansão clonal resultando no fenótipo de células cancerosas malignas.¹¹

Embora tais alterações possam ocorrer por mutações ou rearranjos genômicos, números e estruturas anormais de cromossomos também foram documentados em células neoplásicas, indicando que a instabilidade cromossômica é um aspecto importante da biologia de células cancerosas.¹⁰ Portanto, as alterações no número de cópias podem ser uma ferramenta auxiliar na compreensão da carcinogênese.

Tabela 1 Alterações no número de cópias somáticas detectados por aCGH em três casos de CXAP derivados de APR

Coordenadas cromossômicas (Hg19)	Tipo de evento	Tamanho (Mb)	Citobanda	Genes (n)	Genes conhecidos do câncer (CGCS)
<i>Caso 1</i>					
chr1:0-12,034,621-109,356,617	Perda	109	1p36.33-p13.3	1204	TNFRSF14, PRDM16, RPL22, CAMTA1, SDHB, PAX7, MDS2, ARID1A, LCK, SFPQ, THRAP3, MYCL1, MPL, MUTYH, TAL1, CDKN2C, EPS15, JUN, JAK1, FUBP1, BCL10
chr3:0-91,000,000	Ganho	91.0	3p26.3-q11.1	646	SRGAP3, FANCD2, VHL, PPARG, RAF1, XPC, MLH1, MYD88, CTNNB1, SETD2, BAP1, PBRM1, FHIT, MTF, FOXP1
chr3:95,011,793-163,987,310	Ganho	69.0	3q11.2-q26.1	490	TFG, CBLB, GATA2, RPN1, FOXL2, WWTR1, GMPS, MLF1
chr3:164,108,626-198,022,430	Ganho	34.0	3q26.1-q29	261	EVI1, PIK3CA, SOX2, ETV5, EIF4A2, BCL6, LPP, TFRC
chr5:0-40,851,406	Perda	40.8	5p15.33-p13.1	187	IL7R, LIFR
chr5:40,935,588-46,150,843	Ganho	27	5p13.1-q13.1	125	IL6ST, PIK3R1
chr8:0-43,647,122	Ganho	146	8p23.3-q24.3	926	PCM1, WRN, WHSC1L1, FGFR1, HOOK3, TCEA1, PLAG1, CHCHD7, NCOA2, HEY1, COX6C, EXT1, MYC, NDRG1, RECQL4
<i>Caso 2</i>					
chr3:24,527,963-90,336,853	Perda	6.5	3p24.2-p11.1	451	MLH1, MYD88, CTNNB1, SETD2, BAP1, PBRM1, FHIT, MTF, FOXP1
chr3:93,529,103-101,960,258	Ganho	0.8	3q11.1-q12.3	54	TFG
chr3:101,960,258-102,594,287	Perda	0.06	3q12.3	1	
chr3:102,610,999-197,939,679	Ganho	9.5	3q12.3-q29	628	CBLB, GATA2, RPN1, FOXL2, WWTR1, GMPS, MLF1, EVI1, PIK3CA, SOX2, ETV5, EIF4A2, BCL6, LPP, TFRC
chr5:85,168,149-152,581,242	Perda	6.7	5q14.3-q33.1	438	APC, PDGFRB, CD74
chr5:180,417,510-180,915,260	Perda	0.05	5q35.3	17	
chr6:26,120,677-26,291,646	Ganho	0.01	6p22.2	21	
chr8:0-33,163,303	Perda	3.3	8p23.3-p12	255	PCM1, WRN
chr8:35,142,906-39,877,924	Amplificação	0.5	8p12-p11.21	36	WHSC1L1, FGFR1
chr8:39,877,924-43,527,965	Ganho	0.3	8p11.21-p11.1	28	HOOK3
chr8:47,553,667-146,364,022	Ganho	9.8	8q11.1-q24.3	506	TCEA1, PLAG1, CHCHD7, NCOA2, HEY1, COX6C, EXT1, MYC, NDRG1, RECQL4
chr10:0-13,151,933	Perda	1.3	10p15.3-p13	75	GATA3
chr12:66,133,957-76,156,328	Amplificação	1.0	12q14.3-q21.2	55	HMGA2, MDM2
chr14:20,595,449-98,566,915	Perda	7.8	14q11.2-q32.2	579	CCNB1IP1, TRA@, NKX2-1, NIN, KTN1, GPHN, TSHR, TRIP11, GOLGA5, DICER1, TCL6, TCL1A
chr16:0-35,147,508	Ganho	3.5	16p13.3-p11.1	532	TSC2, CREBBP, CIITA, SOCS1, TNFRSF17, ERCC4, MYH11, PALB2, IL21R, FUS
chr16:46,367,235-90,237,661	Perda	4.3	16q11.2-q24.3	418	CYLD, HERPUD1, CDH11, CBFB, CDH1, MAF, CBFA2T3, FANCA
chr20:45,505,668-46,151,351	Perda	0.6	20q13.12	5	
chr22:17,296,232-51,274,523	Ganho	3.3	22q11.1-q13.33	540	CLTCL1, BCR, SMARCB1, MN1, CHEK2, EWSR1, NF2, MYH9, PDGFB, MKL1, EP300

Tabela 1 Alterações no número de cópias somáticas detectados por aCGH em três casos de CXAP derivados de APR (cont.)

Coordenadas cromossômicas (Hg19)	Tipo de evento	Tamanho (Mb)	Citobanda	Genes (n)	Genes conhecidos do câncer (CGCS)
Caso 3					
chr12:57,993,000-60,129,343	Amplificação	0.2	12q13.3-q14.1	25	CDK4, LRIG3
chr12:60,129,343-64,578,600	Perda	4.4	12q14.1-q14.2	12	
chr12:65,484,807-66,489,652	Amplificação	0.1	12q14.3	8	WIF1, HMGA2
chr12:66,489,652-68,720,923	Perda	2.2	12q14.3-q15	17	
chr12:68,720,923-71,009,093	Amplificação	0.2	12q15	26	MDM2

Amplification, high copy number gains are presented as genomic amplifications.

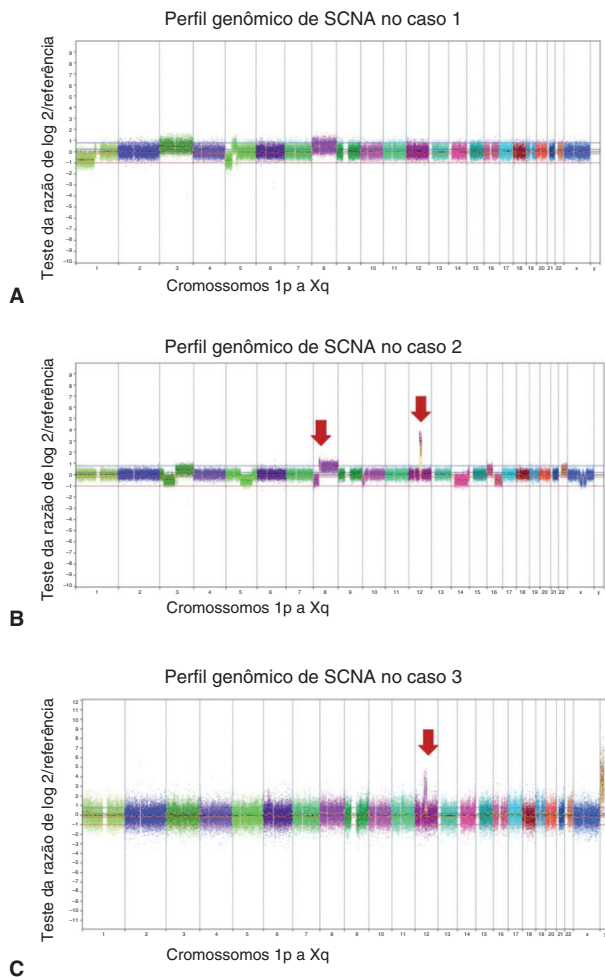


Figura 2 Alterações no número de cópias detectadas por aCGH em CXAPs derivados de APs. Perfil genômico por aCGH exibindo as alterações no número de cópias identificadas no caso de 1 (A), caso 2 (B) e caso 3 (C). O eixo x representa sondas ordenadas de acordo com suas posições genômicas a partir dos cromossomos 1p a Xq (cada cromossomo é marcado com uma cor diferente). O eixo y indica os valores de de referência/teste log2 (ganhos e perdas genômicas agrupados acima ou abaixo da linha de base 0, respectivamente; imagens adaptadas do programa Nexus Copy Number 7.0, Biodiscovery). As setas indicam o ganho elevado de cópias (amplificações).

A transformação maligna do AP recorrente foi relatada em 1,5% a 23%, e o risco parece aumentar com o tempo e o número de recidivas.¹² A ocorrência de alteração maligna proveniente da recorrência do adenoma pleomórfico deve envolver a aquisição de mutações ao longo do tempo.

Os casos apresentados mostraram diferentes padrões de alterações no número de cópias, sendo importante ressaltar que as classificações histopatológicas e a característica invasiva também eram distintas. No entanto, a análise dos dados conseguiu identificar algumas alterações recorrentes no número de cópias, como ganhos em 3q e 8q (casos 1 e 2) e, principalmente, uma amplificação com uma região comum mínima em 12q14.3 (casos 2 e 3). Os casos 1 e 2 eram carcinomas francamente invasivos, e os ganhos em 3q e 8q podem estar implicados no grau de invasão. Os casos 2 e 3 eram carcinomas epiteliais-mioepiteliais, e a amplificação em 12q14.3 talvez esteja envolvida no subtipo histopatológico ou até na recorrência. O caso 2 exibiu um padrão mais complexo de rearranjos consistente com o subtipo histopatológico e o grau de invasão.

Perdas em 1p21.3-p21.1, 5q23.2-q31.2, 8p, 10q21.3 e 15q11.2 foram encontrados por Persson et al. (2009), em um estudo de um grupo de 10 CXAPs; no entanto, nenhuma classificação histopatológica foi realizada. Encontramos perdas em 1p36.33-p13, 5p15.33-P13.1, 5q14.3-q33.1, 5q35.3, 8p e 10p15.3-p13. Ganho em 8q12.1 (PLAG1), detectado em dois casos, foi relatado por vários autores.¹³⁻¹⁵

Amplificações de HMGA2, MDM2 e exclusões de 5q23.2q31.2 e 8q22.1q24.1 foram descritos como importante na transição do PA para CXAP.¹³ Observou-se alto ganho de cópias do HMGA2, MDM2, CDK4, WHSC1L1, LRIG3 e WIF1. Todos os genes amplificados são relacionados ao câncer, de acordo com o *Cancer Gene Census Sanger* (<https://www.sanger.ac.uk/research/projects/cancergenome/census.html>). As amplificações de HMGA2 e MDM2 foram encontradas em dois de nossos casos, reforçando o seu papel como genes impulsionadores associados à recidiva no CXAP.

O gene HMGA2 (do grupo A humano de alta mobilidade) codifica uma proteína cromatina não histona que pertence a uma família de proteínas HMG, que são superexpressas em neoplasias malignas como do pulmão, pâncreas, carcinoma epidermóide de cavidade oral e câncer de mama.¹⁶⁻¹⁹ As proteínas HMGA2 possuem atividade oncogênica através de vários mecanismos como: indução de E2F1 e atividade de AP1, indução da expressão de ciclina A, inativação de p53 induzi-

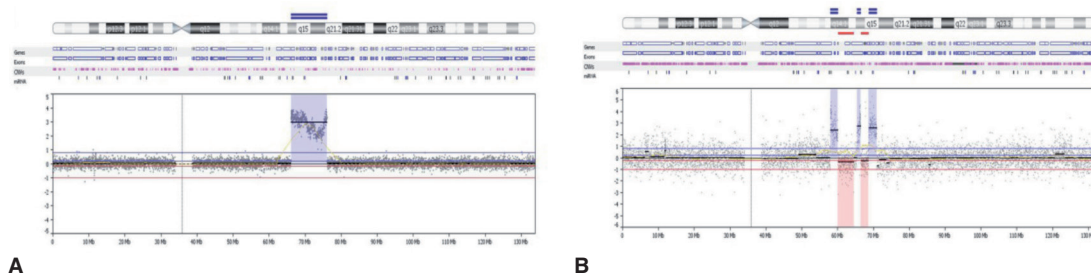


Figura 3 (A) Perfil aCGH do cromossomo 12 mostrando o ganho elevado no número de cópias (amplificação) de 1Mb em 12q14.3q21.2 no caso 1. (B) Perfil aCGH do cromossomo 12 mostrando um padrão complexo constituído por três regiões genômicas que apresentam elevado número de cópias (amplificações) em 12q13.3q14.1 (0,2 Mb), 12q14.3 (0,1 Mb) e 12q15 (0,2 Mb), interpolado com perdas no número de cópias de baixa amplitude.

da por apoptose, impedimento da reparação do DNA, aumento da expressão de proteínas envolvidas na inflamação e modulação da expressão de microRNAs e genes envolvidos na transição epitelial-mesenquimal.²⁰ Além disso, as proteínas HMGA têm um papel crucial na transformação celular porque, quando a sua síntese é bloqueada, ocorre a supressão do fenótipo de malignidade. Essa hipótese está de acordo com nosso achado, porque mostramos a amplificação de HMAG2 desde o caso minimamente invasivo.

A proteína MDM2 (murino duplo minuto-2 homólogo), também conhecida como ligase de proteína ubiquitina Mdm2 (E3), é um oncogene que codifica uma proteína Mdm2 que é um regulador negativo importante do supressor de tumor p53, degradando a proteína p53 ou inibindo a atividade de p53.²¹ A inibição de genes supressores de tumores ou a insensibilidade a sinais de anticrescimento ocorre na maioria dos tumores. As células cancerosas incipientes precisam evadir desses sinais antiproliferativos se quiserem prosperar.¹¹ O presente trabalho mostrou a MDM2 já amplificada em nosso caso minimamente invasivo. A superexpressão de MDM2 também foi observada em uma ampla variedade de tumores humanos, como sarcoma, leucemia, carcinoma mamário, melanoma e glioblastoma.²²

O WHSC1L1 (gene-1 candidato síndrome de Wolf-Hirschhorn) codifica uma pequena proteína contendo um domínio PWWP e é expresso em muitos tecidos. A função dessas proteínas codificadas não é clara, mas a presença do domínio PWWP, um local putativo para a interação proteína-proteína, sugere um papel regulador.²³ O WHSC1L1 já foi identificada como um oncogene e é amplificado e superexpresso em carcinoma do pulmão.²⁴

Os FGFR (receptores do fator de crescimento de fibroblastos), codificados por quatro genes (FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4) estão associados a muitos processos biológicos, como no desenvolvimento de órgãos e na proliferação e migração celular. Vários estudos relataram um papel dos FGFR na tumorigênese devido à regulação de diversos processos relacionados à tumorigênese, incluindo sobrevivência celular, proliferação, inflamação, angiogênese e metástase. A amplificação de FGFR1 foi identificada principalmente no câncer de pulmão.²⁵

O CDK4 (cinases dependentes de ciclina 4) está diretamente envolvido na condução do ciclo celular (Lee et al., 2014). A amplificação de CDK4 foi observada em várias neoplasias malignas, incluindo glioma, câncer de mama, linfoma, melanoma e sarcoma. Às vezes, o CDK4 é coamplificado com MDM2. A proteína codificada por esse gene é uma subunidade

catalítica do complexo proteína-cinase que é importante para a fase G1 de progressão do ciclo celular.²⁶

A família de genes LRIG (domínios contendo repetições ricas em leucina e semelhantes à imunoglobulina) inclui: LRIG1, LRIG2 e LRIG3. A expressão de LRIG provou ser de valor prognóstico em diferentes tipos de cânceres humanos, incluindo câncer de mama, estágio inicial de câncer cervical espinoelular invasivo, carcinoma espinoelular cutâneo, oligodendroglioma e astrocitoma. LRIG1 funciona como um gene supressor tumoral, enquanto pouco se conhece sobre as funções de LRIG2 e LRIG3.²⁷

WIF1 é um gene inibidor do fator de Wnt-1. A proteína codificada por este gene funciona para inibir as proteínas WNT, que são moléculas de sinalização extracelulares que desempenham um papel no desenvolvimento embrionário. Esse gene atua como gene supressor tumoral, e descobriu-se que é epigeneticamente silenciado em vários cânceres.²⁸

Conclusão

Em conclusão, identificamos perfis genômicos exclusivos das alterações no número de cópias entre três casos de CXAP derivado de APR, e as diferenças podem ser explicadas devido aos subtipos histopatológicos e graus de invasão. No entanto, os ganhos recorrentes em 3q e 8q e amplificações em 12q14.3 e 12q15 detectados neste estudo podem ser os fatores promocionais de recidiva da doença.

Financiamento

Processo FAPESP: 2011/23204-5 e Processo FAPESP: 2011/23366-5.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Referências

1. Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Pleomorphic adenoma. World health Organization Classification of Tumors. Pathology & Genetics: head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 254-8.

2. Zbären P, Tschumi I, Nuyens M, Stauffer E. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Am J Surg*. 2005;189:203-7.
3. Laccourreye H, Laccourreye O, Cauchois R, Jouffre V, Menard M, Brasnu D. Total conservative parotidectomy for primary benign pleomorphic adenoma of the parotid gland: a 25-year experience with 229 patients. *Laryngoscope*. 1994;104:1487-94.
4. Leonetti JP, Marzo SJ, Petruzzelli GJ, Herr B. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005;133:319-22.
5. Laskawi R, Schott T, Schroder M. Recurrent pleomorphic adenomas of the parotid gland: clinical evaluation and long-term follow-up. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998;36:48-51.
6. Eneroth CM, Zetterberg A. Malignancy in pleomorphic adenoma. A clinical and micro-spectrophotometric study. *Acta Otolaryngol*. 1974;77:426-32.
7. Phillips PP, Olsen KD. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: report of 126 cases and a review of the literature. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1995;104:100-4.
8. Gupta A, Manipadam MT, Michael R. Myoepithelial carcinoma arising in recurrent pleomorphic adenoma in maxillary sinus. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2013;17:427-30.
9. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, Yang F, Bignell GL, Mudie JL, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell*. 2011;144:27-40.
10. Forment JV, Kaidi A, Jackson SP. Chromothripsis and cancer: causes and consequences of chromosome shattering. *Nat Rev Cancer*. 2012;12:663-70.
11. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell*. 2000;100:57-70.
12. Bradley P. Recurrent salivary gland pleomorphic adenoma: etiology, management, and results. *Curr Opin Otol Head Neck Surg*. 2001;9:100-8.
13. Persson F, Andrén Y, Winnes M, Wedell B, Nordkvist A, Gudnadottir G, et al. High-resolution genomic profiling of adenomas and carcinomas of the salivary glands reveals amplification, rearrangement, and fusion of HMGA2. *Genes Chromosom Cancer*. 2009;48:69-82.
14. Matsuyama A, Hisaoka M, Nagao Y, Hashimoto H. Aberrant PLAG1 expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetic and immunohistochemical study. *Virchows Arch*. 2011;458:583-92.
15. Bahrami A, Dalton JD, Shivakumar B, Krane JF. PLAG1 alteration in carcinoma ex pleomorphic adenoma: immunohistochemical and fluorescence in situ hybridization studies of 22 cases. *Head Neck Pathol*. 2012;6:328-35.
16. Abe N, Watanabe T, Masaki T, Mori T, Sugiyama M, Uchimura H, et al. Pancreatic duct cell carcinomas express high levels of high mobility group I(Y) proteins. *Cancer Res*. 2000;60:3117-22.
17. Miyazawa J, Mitoro A, Kawashiri S, Chada KK, Imai K. Expression of mesenchyme-specific gene HMGA2 in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Cancer Res*. 2004;64:2024-9.
18. Meyer B, Loeschke S, Schultze A, Weigel T, Sandkamp M, Goldmann T, et al. HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*. 2007;46:503-11.
19. Motoyama K, Inoue H, Nakamura Y, Uetake H, Sugihara K, Mori M. Clinical significance of high mobility group A2 in human gastric cancer and its relationship to let-7 microRNA family. *Clin Cancer Res*. 2008;14:2334-40.
20. Fusco A, Fedele M. Roles of HMGA proteins in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2007;7:899-910.
21. Zhao Y, Yu H, Hu W. The regulation of MDM2 oncogene and its impact on human cancers. *Acta Biochim Biophys Sin*. 2014;46:180-9.
22. Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:3453-9.
23. Stec I, van Ommen GJ, den Dunnen JT. WHSC1L1, on human chromosome 8p11.2, closely resembles WHSC1 and maps to a duplicated region shared with 4p16.3. *Genomics*. 2001;76:5-8.
24. Tonon G, Wong KK, Maulik G, Brennan C, Feng B, Zhang Y, et al. High-resolution genomic profiles of human lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005;102:9625-30.
25. Lee Y, Dominy JE, Choi YJ, Jurczak M, Tolliday N, Camporez JP, et al. Cyclin D1-Cdk4 controls glucose metabolism independently of cell cycle progression. *Nature*. 2014;510:547-51.
26. Malumbres M, Barbacid M. Cell cycle. CDKs and cancer: a changing paradigm. *Nat Rev Cancer*. 2009;9:153-66.
27. Muller S, Lindquist D, Kanter L, Flores-Staino C, Henriksson R, Hedman H, et al. Expression of LRIG1 and LRIG3 correlates with human papillomavirus status and patient survival in cervical adenocarcinoma. *Int J Oncol*. 2013;42:247-52.
28. Lambiv WL, Vassallo I, Delorenzi M, Shay T, Diserens AC, Misra A, et al. The Wnt inhibitory factor 1 (WIF1) is targeted in glioblastoma and has a tumor suppressing function potentially by induction of senescence. *Neuro Oncol*. 2011;13:736-47.