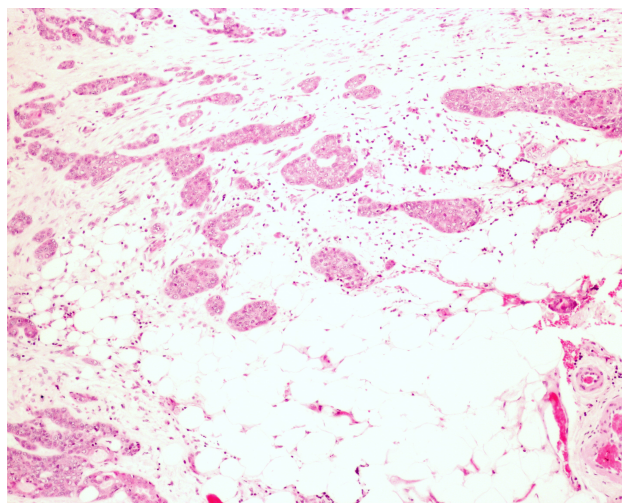


**FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO
PORTO**

Monografia de investigação no âmbito das ciências básicas

Ano Letivo 2013/2014

**“Estudo das características clínico-patológicas e da expressão dos elementos da via
intra celular EGFR/HER2-Akt-mTOR em carcinomas adenoide císticos – relação
com o prognóstico”**



José Alberto Ferraz Martins de Almeida Maia

Porto, 2014

**FACULDADE DE MEDICINA DENTÁRIA DA UNIVERSIDADE DO
PORTO**

Monografia de investigação no âmbito das ciências básicas

Ano Letivo 2013/2014

**“Estudo das características clínico-patológicas e da expressão dos elementos da via
intra celular EGFR/HER2-Akt-mTOR em carcinomas adenoide císticos – relação
com o prognóstico”**

IDENTIFICAÇÃO

Nome: José Alberto Ferraz Martins de Almeida Maia

Endereço de correio electrónico: zemaia90@hotmail.com

Orientadora:

Professora Doutora Catarina Alexandra Pires Eloy - Professora auxiliar convidada das unidades curriculares Biopatologia I e Biopatologia II do Mestrado Integrado em Medicina Dentária (MIMD) da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto.

Agradecimentos

À Professora Doutora Catarina Eloy, por todo o apoio dado, toda a paciência e acima de tudo por ter acreditado na minha capacidade de realizar este trabalho.

A todos os meus professores, mestres para mim, que me ajudaram nesta caminhada e sempre me motivaram a seguir em frente.

A toda a minha família, por me fazer sentir que o meu lugar é sempre com eles e ao seu lado. Que nos próximos anos eu possa através deste curso ser para vocês o dom que são para mim.

Aos Gen, que se encontram sempre muito mais perto da alma. Obrigado por todos as conversas que me ajudaram a ser quem sou hoje.

Aos colegas que se revelaram sempre companheiros de viagem que tornam um percurso aparentemente difícil, fácil de percorrer. E especialmente à minha binómia, a Cátia, por me aturar todos os dias na clínica.

Ao Kiko, pelo acompanhamento ao longo destes últimos 3 anos e pela ajuda na execução desta monografia. Fica a amizade, são estas que valem a pena.

À família da escola Alberta Lima, a todos os alunos e em especial à Belinha que tanto contribuíram para que ao longo deste último ano eu redescobrisse a importância da dança na minha vida.

“Que todos sejam um”

Chiara Lubich

Índice:

Lista de abreviaturas.....	5
Resumo.....	6
<i>Abstract</i>	7
Introdução.....	9
Metodologia.....	12
Objectivos.....	15
Resultados.....	16
Discussão.....	23
Conclusão.....	26
Bibliografia.....	27
Anexos.....	29

Lista de abreviaturas

CAC	Carcinoma adenóide cístico
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
HER2	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i>
mTOR	<i>Mammalian target of rapamycin</i>
Akt	Proteína Kinase B
HE	Hematoxilina-eosina

Resumo:

Introdução: O Carcinoma adenóide cístico (CAC), representa cerca de 22% a 25% dos tumores malignos das glândulas salivares e é um dos mais comuns nas glândulas *minor*. De entre os alvos terapêuticos mais estudados em modelos de carcinomas está a via de sinalização HER2/EGFR→Akt→mTOR. Esta via encontra-se associada ao crescimento, proliferação e morte celular.

Metodologia: Foi efetuado um estudo retrospectivo de uma série de 12 casos de CAC. As variáveis registadas foram: género, idade do paciente, localização do CAC, tamanho do tumor, estado da margem cirúrgica, estadiamento tumoral, invasão perineural, necrose, presença de metástases e recidivas e estado actual do paciente. Foi feita uma análise imunohistoquímica para detectar a sobre-expressão dos elementos da via HER2/EGFR→Akt→mTOR.

Resultados/Conclusões: Existe uma maior tendência para os homens serem afectados, sendo a idade média dos doentes de 60,2 anos, embora este tumor pareça ser mais metastizante nas mulheres. A glândula parótida é a mais afectada pelo CAC. O mTOR exprime-se com mais frequência e intensidade no tecido normal do que no tecido tumoral ao contrário do que acontece com o EGFR. O EGFR exprimiu-se com mais intensidade em tumores maiores ($p=0,044$), em ambas as recidivas e numa metástase, podendo este ser indicador de um pior prognóstico quando o EGFR está sobre-expresso. Encontrou-se uma relação marginalmente significativa entre a sobre-expressão do mTOR e a menor idade dos doentes ($p=0,051$), tendo sido também verificado que o mTOR esteve sub-expresso em CAC's de mulheres e em CAC's sem invasão perineural.

Palavras-chave: Carcinoma adenóide cístico, glândula salivar, HER2, EGFR, Akt, mTOR.

Abstract:

Introduction: The ACC (Adenoid cystic carcinoma), it's responsible for about 22% to 25% of the malignant tumors of the salivary glands and it's one of the most common in the minor glands. Of all the therapeutic targets that are most studied we find the HER2/EGFR→Akt→mTOR chain. This chain is associated to the growth, proliferation and cellular death.

Methodology: A retrospective study of 12 cases of ACC was made. The studied variables were: sex of the patient, age of the patient, place of the ACC, size of the tumor, surgical margin, tumor staging, perineural invasion, necrosis, presence of metastasis and recurrence and current state of the patient. An imunohistochemical analysis was executed to detect the overexpression of the HER2/EGFR→Akt→mTOR pathway.

Results/Conclusion: There is a tendency for the ACC to occur in men rather than women and the medium age of the first diagnosis is 60,2 years, although this tumor appears to create more metastasis in women. The parotid is also the most affected gland by the ACC. There is an overexpression of mTOR in the peritumoral tissue in contrast with the expression of EGFR in this same tissue. The EGFR was overexpressed in bigger tumors ($p=0,044$), in both recurrences and in one of the metastasis of the ACC which may imply that the EGFR can be an indicator of a worst prognosis. It was found a correlation between the overexpression of mTOR and the age of the patients ($p=0,051$). It was also an overexpression of mTOR in the women's ACC and in the ACC's without perineural invasion.

Keywords: Adenoid cystic carcinoma, salivary glands, HER2, EGFR, Akt, mTOR.

Introdução

As glândulas salivares são órgãos que se encontram na região da cabeça e pescoço que excretam o seu produto, a saliva, na cavidade oral^[1]. Existem dois grupos de glândulas salivares: as *major* e as *minor*. O primeiro grupo engloba as parótidas, as sublinguais e as submandibulares, sendo estas encontradas bilateralmente e em redor da cavidade oral. No segundo grupo estão as glândulas de menor dimensão que se dispõem dispersas pela mucosa da cavidade oral (lábio, vestibulo, mucosa jugal, palato e pavimento da boca e trato respiratório alto)^[2].

Os carcinomas das glândulas salivares são tumores raros que se caracterizam pela grande variação morfológica. Eles representam menos de 1% de todos os cancros e cerca de 6% a 7% dos cancros da região da cabeça e pescoço^[14]. Estão descritos pelo menos 24 tipos diferentes de carcinomas destas glândulas^[10]. Dentro deste grupo está o Carcinoma adenóide cístico (CAC) que representa cerca de 1% de todos os tumores malignos da região maxilofacial. O CAC, é responsável por cerca de 22% a 25% dos tumores malignos das glândulas salivares e é um dos mais comuns nas glândulas *minor*.^[3,4]

O CAC pode ser diagnosticado em qualquer idade embora seja mais frequente nas quinta e sexta décadas de vida, não tendo predileção pelo género^[5]. O CAC desenvolve-se com mais frequência nas glândulas salivares *minor* orais seguido das *major* e das glândulas *minor* extra-orais^[5]. Caracteristicamente, o CAC desenvolve-se de forma assintomática, com um crescimento lento e gradual^[6] até à invasão dos nervos periféricos, condicionando dor. A disseminação do CAC faz-se preferencialmente por via hematogénea, sendo possível que as metástases apenas se manifestem alguns anos depois do diagnóstico inicial^[5,7].

O CAC tem um comportamento biológico muito agressivo, provocando nos doentes que o desenvolvem nas glândulas salivares um prognóstico reservado a longo prazo, mesmo após tratamento cirúrgico e radioterapia. As percentagens de sobrevivência são de 70% em 5 anos, 40% em 15 anos e 15% em 25 anos^[9]. Neste sentido, torna-se importante descobrir tratamentos que possam ser efectivos no controlo do CAC com extensão local avançada e em fase metastática^[9].

Estão documentadas alterações cromossómicas no CAC, mas estas são menos frequentes quando se comparam com outros carcinomas do trato aero digestivo superior e inferior. As alterações cromossómicas principais no CAC ocorrem no gene 12 e 19^[17].

O tratamento personalizado e dirigido tem-se tornado útil no tratamento de neoplasias malignas. De entre os alvos terapêuticos mais estudados em modelos de carcinomas está a via de sinalização HER2/EGFR→Akt→mTOR. Esta via encontra-se associada ao crescimento, proliferação e morte celular^[8].

Segundo a literatura, o EGFR assim como o HER2 estão sobre-expressos em vários tumores que incluem o cancro da mama, bexiga, pâncreas, ovário, endométrio, gastrointestinal, rim, próstata e das glândulas salivares.^[10, 13, 15]

O HER2 é uma glicoproteína membranar que é codificada pelo gene *HER2* que está localizado no cromossoma 17q12^[12]. O HER2 participa de reações em cascata que produzem diversos efeitos, estando a sobre-expressão desta proteína associada a carcinomas mais agressivos em vários modelos de cancro^[12]. O HER2 está envolvido no início e progressão da doença e poderá também ser um bom indicador da resposta à terapia hormonal e química^[16].

Nas glândulas salivares, a EGFR exprime-se em cerca de 1/3 dos carcinomas destes órgãos, independentemente do tipo histológico e parâmetros clínicos^[10]. Esta proteína, codificada pelo gene *EGFR* localizado no cromossoma 7p12, tem sido relacionada com mau prognóstico, tumores mais avançados e também mais agressivos, nomeadamente no carcinoma dos ductos salivares, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma ex-adenoma pleomórfico^[10].

O Akt e o mTOR fazem também parte da via de sinalização do HER2 e do EGFR. Existem evidências de que o mTOR possa também estar envolvido no aparecimento de metástases ganglionares^[10]. Esta evidência foi observada no modelo de carcinoma hepatocelular^[18].

Assim sendo, e segundo a literatura, esta via de sinalização apresenta-se como um bom alvo de tratamento dirigido, devido à sua sobre-expressão em carcinomas das glândulas salivares – carcinoma dos ductos salivares, carcinoma mucoepidermoide, CAC, carcinoma de células acinares e carcinoma ex adenoma pleomorfo^[10].

As figuras 1, 2, 3 e 4 ilustram algumas características morfológicas do CAC.

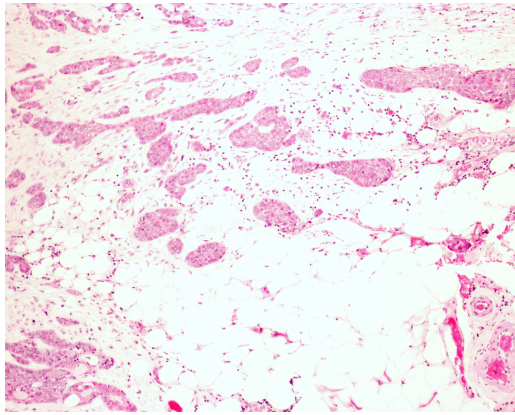


Figura 1 – Aspecto microscópico de CAC primário. (HE, 100x)

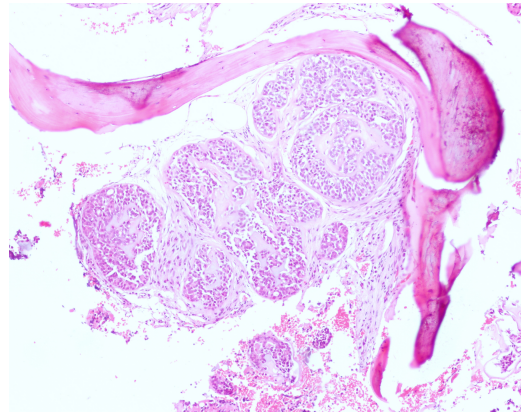


Figura 2 – Metástase femural do CAC. (HE, 100x)

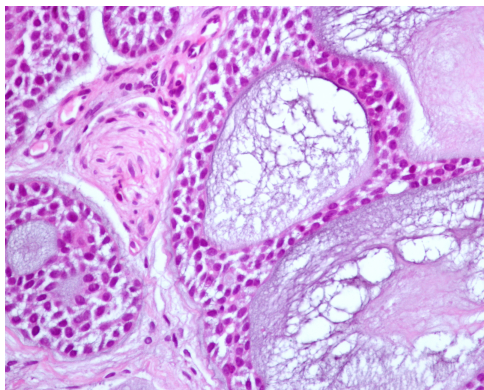


Figura 3 – Invasão perineural pelo CAC (HE, 200x)

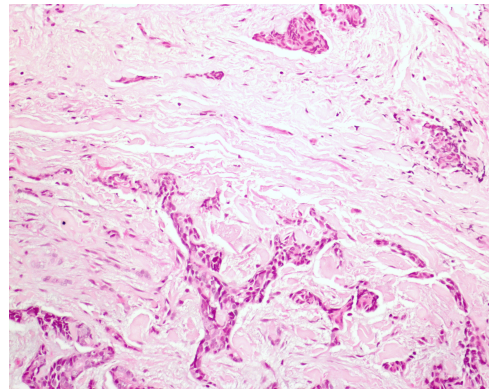


Figura 4 – Invasão muscular pelo CAC (HE, 200x)

Metodologia

Foi efetuado um estudo retrospectivo de uma série de 12 casos de CAC arquivados nos serviços de Anatomia Patológica do Hospital de S. João, datados entre 1998 e 2007 e no IPO (Instituto Português de Oncologia) do Porto, datados entre 2008 e 2013.

Foram colhidos dos arquivos todas as lâminas e blocos correspondentes aos 12 casos de CAC primários, assim como, todas as amostras disponíveis de recidivas e metástases correspondentes. As lâminas de cada caso foram observadas ao microscópio por dois observadores (CE/JM). Toda a informação foi retirada a partir dos processos clínicos dos doentes e também da observação histológica das amostras, sendo esta registada numa base de dados que não expõe a identificação dos doentes mantendo, por isso, o seu anonimato. As informações retiradas dos processos clínicos foram: o género, a idade dos doentes e a localização do CAC, a presença de recidiva e metástases e se os doentes se encontravam vivos, mortos ou se foram perdidos em *follow-up*.

As variáveis observadas ao microscópio foram: tamanho do tumor, estado da margem cirúrgica, estadiamento tumoral, invasão peri-neural e necrose.

Para que se pudesse fazer a observação da expressão dos componentes da via de sinalização HER2/EGFR→Akt→mTOR foi necessário elaborar um protocolo específico. Para o anticorpo anti-EGFR utilizou-se uma diluição de 1:100. A recuperação antigénica utilizada foi feita com CC1 e o tempo de incubação foi de 32min. Para o anticorpo anti-HER2 não foi necessária diluição pois este é um anticorpo pré-diluído. A recuperação antigénica foi feita com CC1 e o tempo de incubação foi de 12min. Para o anticorpo anti-mTOR a diluição foi de 1:100. A recuperação antigénica foi efectuada também com CC1 e tempo de incubação foi de 48min. A coloração foi realizada no aparelho Ventana® Benchmark Ultra.

Não foi possível, por motivos técnicos, otimizar a reação com o anticorpo Akt. Desta forma, os resultados para este elemento não estarão presentes neste estudo.

Foram utilizados, em cada teste, os controlos positivos e negativos apropriados.

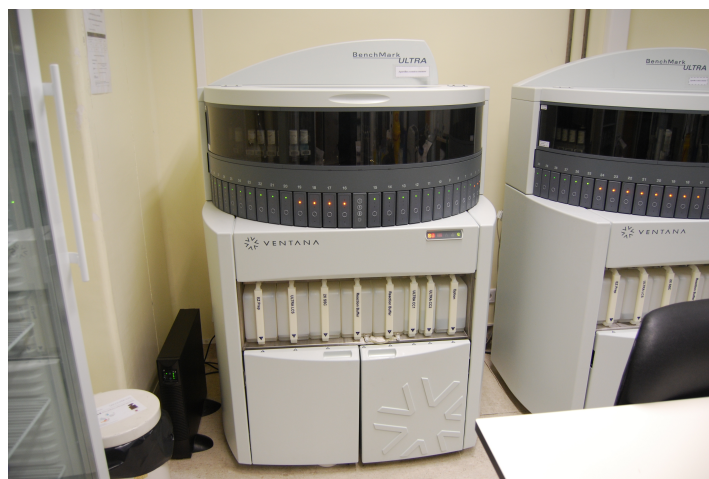


Imagem 5 – Aparelho Ventana® Benchmark Ultra.

A expressão de EGFR foi citoplasmática e a do mTOR e HER2 foi membranar. O registo da expressão foi realizado consoante a seguinte tabela:

Expressão citoplasmática (EGFR)		Expressão membranar (HER2 e mTOR)	
Valor	Expressão	Valor	Expressão
0	Ausente ou fraca em <10% das células	0	Ausente ou fraca em <10% das células
1	Fraca em ≥10% das células	1	Parcial e fraca em ≥10% das células
2	Moderada em ≥10% das células	2	Moderada e fraca em ≥10% das células
3	Forte em toda as células	3	Forte em todas as células, a toda a volta da membrana

Agrupou-se esta classificação em dois grupos: O “Ausente” e o “Fraco” (Valor = 0 e 1) correspondem a “Negativo” e o “Moderado” e “Forte” (Valor = 2 e 3) a “Positivo”.

Também foram agrupados os diferentes estádios do TMN em dois grupos, sendo que, um grupo representa os estádios I e II e o outro grupo representa os estádios III e IV.

Quanto à idade, os doentes foram divididos em quatro categorias, sendo estas: “30-50”, “50-60”, “60-70” e “>70” anos.

A análise estatística da informação e o tratamento dos dados foi executado no programa IBM SPSS Statistics 21. Foram executados todos os testes do qui-quadrado,

procurando relação entre as características morfológicas e relacionando a expressão dos elementos EGFR e mTOR com o género, idade, localização do tumor, tamanho do tumor, estado atual do paciente invasão perineural e necrose. Foi também procurada a associação destes fatores com o estadiamento do CAC.

Objetivos:

O objetivo deste estudo é verificar se a expressão dos elementos da via intracelular HER2/EGFR-Akt-mTor se relacionam com o estadiamento do CAC e as suas características clínico-patológicas.

Resultados:

Na Tabela 1 estão representadas as características demográficas e morfológicas que foram verificadas e registadas para cada caso de CAC da série estudada.

Caso	Gênero	Idade	Estado actual do paciente	Localização tumor primário	Tamanho tumor	Margem cirúrgica	Invasão perineural	Estadio	Necrose	Nº Recidivas	Metástases	Localização metástases
1	Feminino	37	Perdido em follow-up	Parótida	0,5 cm	R0	Sim	III + IV	Não	0	1	Fêmur
2	Masculino	83	Falecido pela doença	Sub-Mandibular	0,9 cm	R1	Sim	III + IV	Sim	0	0	—
3	Masculino	58	Falecido pela doença	Parótida	1,2 cm	Rx	Sim	III + IV	Não	2	0	—
4	Masculino	56	Vivo sem doença	Parótida	1,8 cm	R0	Não	I + II	Não	0	0	—
5	Masculino	74	Perdido em follow-up	Minor - Palato	2,0 cm	R0	Sim	I + II	Não	0	0	—
6	Masculino	40	Falecido pela doença	Parótida	2,1 cm	R2	Sim	III + IV	Não	0	0	—
7	Feminino	50	Vivo sem doença	Parótida	0,8 cm	R0	Sim	III + IV	Não	0	1	Gânglio Linfático
8	Masculino	40	Vivo sem doença	Parótida	0,7 cm	R0	Sim	I + II	Não	0	0	—
9	Masculino	58	Perdido em follow-up	Minor - Palato	2,5 cm	R1	Sim	I + II	Não	0	0	—
10	Feminino	79	Vivo sem doença	Parótida	7,1 cm	Rx	Sim	III + IV	Não	0	0	—
11	Masculino	62	Perdido em follow-up	Parótida	1,5 cm	Rx	Sim	III + IV	Não	0	0	—
12	Masculino	87	Vivo sem doença	Parótida	3,0 cm	Rx	Sim	I + II	Não	0	0	—

Tabela 1 – Características morfológicas da série de CAC.

Dos 12 casos estudados de CAC, 9 (75%) desenvolveram-se em indivíduos do género masculino e apenas 3 no género feminino (25%), tendo os dois grupos idades compreendidas entre os 37 e os 87 anos, sendo a sua média 60,2 anos. A localização preferencial de desenvolvimento do CAC foi na parótida (75%) tendo as glândulas *minor* dois casos (16,7%), e a sub-mandibular apenas um (8,3%).

Os tumores apresentavam tamanhos entre 0,5 cm e 7,1 cm, sendo a sua média de 2,0 cm. De todos os casos, destaca-se o maior – 7,1 cm – uma vez que após análise do ficheiro do doente (caso 10), verificou-se que este tumor infiltrava toda a parótida.

As margens cirúrgicas observadas foram na maioria R0 (margem sem lesão) – 5 casos, (41,6%), seguidas de Rx (impossibilidade de avaliar a margem) – 4 casos (33,3%), R1 (margem com neoplasia microscópica) – 2 casos (16,7%) e R2 (margem com neoplasia macroscópica) – 1 caso (8,3%). De todos os casos em que foi possível obter o *follow-up* dos doentes e a margem cirúrgica foi R0, estes estão vivos e sem doença. Nos casos de CAC com margem cirúrgica envolvidas - R1 e R2 – os doentes faleceram por doença, sendo que um foi perdido em *follow-up*.

Relativamente ao estadiamento TNM, 5 casos (41,6%) estavam nos estádios iniciais I e II e os outros 7 casos (58,4%) encontravam-se em estágio III e IV. Dez casos (83,3%) apresentavam invasão peri-neural e apenas 1 dos 12 (8,3%) apresentava necrose.

Ambas as recidivas observadas foram detetadas no mesmo caso (caso 3) situando-se ambas na parótida. Foram encontradas metástases em dois casos, uma no gânglio linfático e outra no tecido ósseo femural. O CAC recidivou em 8,3% dos casos e metastizou em 16,7%. As duas metástases foram encontradas nos dois casos cujo género era feminino, sendo que nenhum caso do género masculino revelou metástases.

A Tabela 2 representa os resultados do estudo imuno-histoquímico de EGFR, HER2 e mTOR na série de CAC, e respectivas recidivas e metástases.

Caso	HER2 tumor	HER2 Normal	mTOR tumor	mTOR Normal	EGFR tumor	EGFR Normal	Metástase/Recidiva
1	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	N/O	
	Negativo	N/O	Positivo	N/O	Positivo	N/O	Metástase
2	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
3	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	
	Negativo	N/O	Negativo	N/O	Positivo	N/O	Recidiva
	Negativo	N/O	Positivo	N/O	Positivo	N/O	Recidiva
4	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
5	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Negativo	
6	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	
7	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	
	Negativo	N/O	Negativo	N/O	Negativo	N/O	Metástase
8	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	
9	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo	
10	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Negativo	
11	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo	Positivo	Negativo	
12	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	

Tabela 2 . Resultados dos testes para os diferentes anti-corpos da série de tumores primários, das metástases e das recidivas do CAC. (A palavra “normal” aqui refere-se a tecido peri-tumoral, aparentemente normal).

*N/O – Não observado

Do caso 1 apenas se testou a metástase, no tumor primário não foi possível concluir os testes.

O HER2 não obteve nenhuma expressão nos CAC estudados, nem no tecido aparentemente normal, nem nas metástases e recidivas.

O EGFR estava sobre-expresso em ambos os casos de recidiva. Nas metástases, o EGFR estava sobre-expresso numa e sub-expresso na outra. Verificou-se que o EGFR se encontrava maioritariamente sub-expresso em tecido peritumoral aparentemente normal, estando presente neste tecido em apenas um caso dos onze casos de CAC estudados (9,0%). O EGFR encontrou-se sobre-expresso em três casos no CAC (27,2%). Obteve-se uma relação estatisticamente significativa ($p=0,044$) entre o EGFR e o tamanho dos tumores estando este sobre-expresso em todos os tumores de maiores dimensões (>3 cm).

O mTOR revelou-se sobre-expresso numa recidiva e sub-expresso na outra. O mesmo aconteceu para as metástases. O mTOR encontra-se sobre-expresso na maioria das amostras (72,7%) do tecido peritumoral aparentemente normal, e a sua sobre-expressão no CAC é de apenas 36,3%. Encontrou-se uma relação marginalmente significativa: entre a sobre-expressão do mTOR e a idade dos doentes ($p=0,051$).

Em nenhum dos casos estudados de CAC em mulheres se observou expressão de mTOR.

Verificou-se que os dois tumores que não possuíam invasão perineural também não obtiveram sobre-expressão de EGFR nem de mTOR. Estes dois casos (caso 4 e 5) também revelaram que os tumores estavam em estadios mais precoces (I + II) e a sua margem cirúrgica era R0. No período de *follow-up*, verificou-se que um dos doentes encontra-se vivo sem doença e o outro paciente foi perdido em *follow-up*.

Não foram encontradas mais nenhuma relações estatisticamente significativas entre quaisquer outros elementos estudados.

Na Tabela 3, relacionam-se os elementos EGFR e mTOR e as características morfológicas estudadas para esta série de CAC.

	Género		"p"	Idade				"p"	localização			"p"	Tamanho				"p"	Invasão perineural		"p"	Estadio			"p"	Metastização		"p"	Recidiva		"p"	Necrose			Estado actual do paciente		
	Masculino	Feminino		30-50	50-60	60-70	>70		Parótida	Sub-Mandibular	Minor		"<1cm"	"1-2cm"	"2-3cm"	">3cm"		Sim	Não		I + II	III + IV	Sim		Nao	Sim		Nao	Sim		Nao	Sim	Nao	Sim	"falecido por doença"	"vivo sem doença"
Expressão EGFR	Negativo	6	1	0,618	2	3	0	2	0,329	4	1	2	0,308	3	1	3	0	0,044	5	2	0,382	4	3	0,348	1	6	0,636	0	7	0,364	6	1	0,636	2	3	.714
	Positivo	3	1		0	1	1	2		4	0	0		0	2	0	2		4	0		1	3		0	4		1	3		4	0		6	1	
Expressão mTOR	Negativo	5	2	0,382	0	3	0	4	0,051	5	1	1	0,692	2	2	1	2	0,502	5	2	0,382	3	4	0,652	1	6	0,636	1	6	0,636	6	1	0,636	2	4	.643
	Positivo	4	0		2	1	1	0		3	0	1		1	1	2	0		4	0		2	2		0	4		0	4		0	4		0	4	

Tabela 3 – relação entre a expressão dos elementos mTOR e EGFR e as características morfológicas estudadas, na série de CAC's.

As figuras 5, 6 e 7 demonstram a expressão dos anticorpos para o EGFR, HER2 e mTOR no CAC:

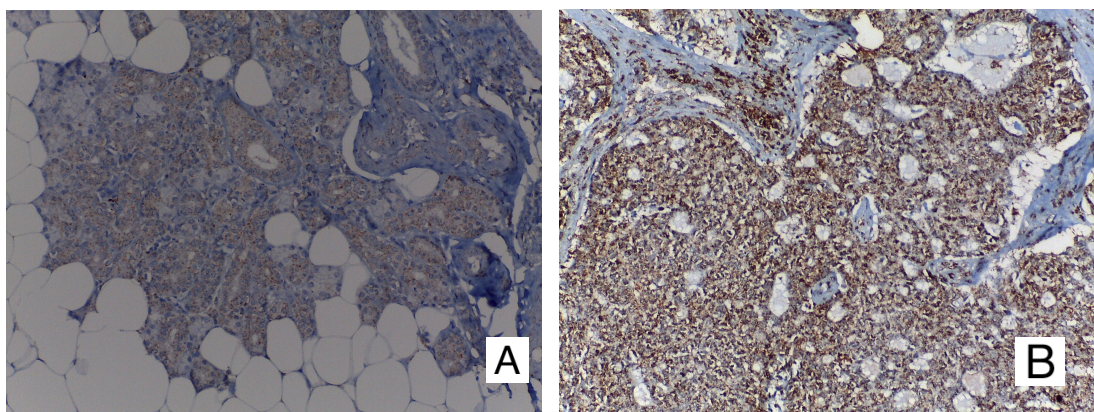


Figura 5 – Expressão imuno-histoquímica de EGFR. A) – Glândula salivar normal (200x). B) – CAC (200x)

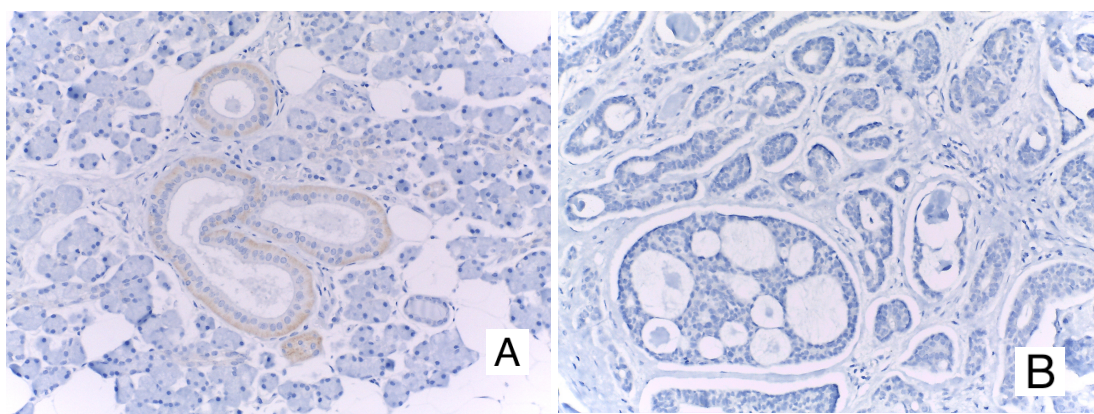


Figura 6 – Expressão imuno-histoquímica de HER2. A) – Glândula salivar normal (200x). B) – CAC (200x)

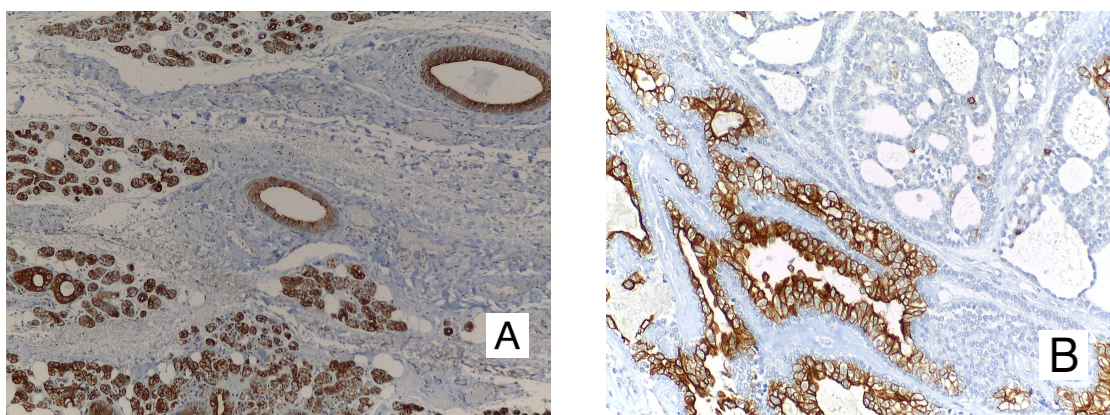


Figura 7 – Expressão imuno-histoquímica de mTOR. A) – Glândula salivar normal (100x). B) – CAC (200x)

Discussão:

Neste estudo verificou-se que a glândula mais afetada pelo CAC é a parótida. Este resultado não vai completamente de encontro aos dados descritos na literatura, que documenta que as glândulas mais afetadas são as glândulas *minor*, seguidas das parótidas^[3,5,9].

A média de idades dos casos estudados de CAC é de 60,2 anos. Nesta série os doentes são diagnosticados ligeiramente mais tarde do que a maioria das séries da literatura, onde está descrito que o CAC é mais comum na quinta e sexta décadas de vida^[3,5]. No entanto há autores que referem que o aparecimento preferencial é entre os 50 e os 60 anos de idade^[22]. Na cavidade oral, não está estabelecida qualquer preferência de género para o aparecimento do CAC^[5], mas outros estudos apresentam séries em que nos casos estudados existia um número maior de homens^[14,22]. O presente estudo revelou que a maior parte dos doentes com este carcinoma eram do género masculino, no entanto, as duas metástases que foram encontradas na série ocorreram em CAC's de doentes do género feminino.

Dos casos de CAC em que a margem cirúrgica estava livre de tumor, os doentes estão vivos e sem doença, enquanto que os casos de CAC com margens cirúrgicas envolvidas, faleceram por doença. Esta evidência sugere que um bom procedimento cirúrgico (remoção total do carcinoma) tem um grande impacto no prognóstico do CAC.

Os dois casos de CAC (casos 4 e 5) que não possuíam invasão perineural também não obtiveram sobre-expressão de mTOR nem de EGFR. Estes dois casos encontravam-se também em estadios não tão avançados (I + II) e a sua margem cirúrgica era R0. Verificou-se que atualmente um paciente está vivo sem doença e o outro foi perdido em *follow-up*. Estes achados sugerem que a simultânea ausência de invasão perineural e falta de sobre-expressão de mTOR e EGFR em CAC se associam a um prognóstico mais favorável.

Nesta série, o HER2 não se encontra sobre-expresso nas amostras testadas. A literatura refere que existe uma grande discrepância de valores (0%-100%) no que toca à expressão do HER2 no CAC^[9,15]. Isto pode ser devido ao procedimento laboratorial de fixação da amostra que pode provocar uma perda da quantidade de HER2. Assim sendo, para amostras que já possuam baixa quantidade desta proteína, este aspeto pode revelar-se de grande impacto.

A expressão do EGFR acontece nas células tumorais mais precisamente na membrana e no citoplasma^[10]. Tal como o HER2, o EGFR varia muito na sua expressão no CAC (0%-85%)^[15]. Esta discrepância de resultados pode ser eventualmente explicada pelos diferentes métodos e técnicas utilizados para detetar esta expressão, podendo estes testes variar em especificidade e sensibilidade^[15]. Na série estudada a expressão do EGFR no casos de CAC foi de 27,2%, o que se admite estar compreendido no âmbito descrito na literatura.

Obteve-se uma relação estatisticamente significativa ($p=0,044$) entre o EGFR e o tamanho dos tumores estando este sobre-expresso em todos os tumores de maiores dimensões (>3 cm). No caso 3, que possui duas recidivas, observou-se que existia uma sobre-expressão do EGFR em ambas as recidivas. Esta sobre-expressão também foi observada numa das metástases. Estes achados (sobre-expressão em tumores maiores, nas recidivas e na metástase) sugerem que a sobre-expressão do EGFR pode ter um papel importante na progressão da doença neoplásica neste modelo de cancro. Estes achados deverão ser estudados numa série com mais casos de CAC.

A expressão de mTOR no CAC está documentada na literatura, sendo por vezes encontrado no citoplasma, membrana ou no núcleo nos tumores das glândulas salivares^[10,21]. Nos testes em glândulas salivares normais, o mTOR é negativo para a sua componente nuclear, no entanto é positivo na sua componente membranar neste mesmo grupo, sendo que, para o CAC a sua percentagem de expressão é baixa^[21]. A percentagem de expressão nuclear do mTOR é maior nos CAC quando comparado com outros tumores das glândulas salivares^[21]. Nesta série, concluiu-se que o mTOR se exprimiu na membrana das células do CAC num valor próximo do valor encontrado na literatura. Verificou-se também que o tecido peritumoral aparentemente normal obteve para o mTOR uma percentagem muito mais elevada de expressão do que no tecido tumoral do CAC, como era de esperar.

Também foi verificado que o mTOR não se exprimiu nos dois casos (caso 1 e 7) que ocorreram em doentes do género feminino, que nesta série de pequenas dimensões pode produzir um resultado fortuito, que deverá ser objeto de estudo em séries de CAC com mais casos.

Uma das relações marginalmente significativas encontrada, foi entre a sobre-expressão do mTOR e a menor idade dos doentes. Isto sugere que o mTOR não se

sobre-expressa tão frequentemente em doentes com idades mais avançadas. Este achado é confirmado pela literatura, que refere que a maior parte de sobre-expressão de mTOR acontece em idades mais precoces^[21]. A literatura refere ainda que a redução de expressão do mTOR está associada a um aumento do número de anos na vida dos indivíduos^[23]. Crê-se que esta redução de expressão seja um mecanismo de sobrevivência onde a diminuição desta proteína potencia a sobrevivência do indivíduo^[23].

Conclusão

Podemos, com o estudo desta série, concluir que nesta população a que pertencem os casos de CAC das glândulas salivares, estudados desde 1998 a 2013, provenientes do HSJ e do IPO do Porto:

- Existe uma maior tendência para os homens serem afetados pelo CAC, embora este tumor pareça ser mais vezes metastizante nas mulheres.
- O estado da margem cirúrgica de CAC em glândulas salivares tem um papel determinante no prognóstico dos doentes com esta neoplasia.
- O mTOR exprime-se mais no tecido normal da glândula salivar do que no tecido tumoral de CAC, ao contrário do que acontece com o EGFR.
- O EGFR sobre-expressou-se nos tumores de CAC de maiores dimensões (>3cm), em ambas as recidivas e numa das metástases do CAC podendo este achado sugerir que o EGFR terá um papel na progressão da doença neoplásica neste modelo de cancro.
- O mTOR expressa-se com mais frequência em doentes com idades menos avançadas do que em doentes mais idosos.

Bibliografia:

1. Nagao, T., et al., *Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice*. Acta Histochem Cytochem, 2012. **45**(5): p. 269-82.
2. Junqueira, L., et al., *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, 2008.
3. Kokemueller, H., et al., *Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience*. Int J Oral Maxillofac Surg, 2004. **33**(1): p. 25-31.
4. Gibbons, M.D., et al., *Molecular differences in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands*. Laryngoscope, 2001. **111**(8): p. 1373-8.
5. Jaso, J. and R. Malhotra, *Adenoid cystic carcinoma*. Arch Pathol Lab Med, 2011. **135**(4): p. 511-5.
6. Wetterskog, D., et al., *Mutation profiling of adenoid cystic carcinomas from multiple anatomical sites identifies mutations in the RAS pathway, but no KIT mutations*. Histopathology, 2013. **62**(4): p. 543-50.
7. Spiro, R.H., *Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin*. Am J Surg, 1997. **174**(5): p. 495-8.
8. Oda, K., et al., *A comprehensive pathway map of epidermal growth factor receptor signaling*. Mol Syst Biol, 2005. **1**: p. 2005 0010.
9. Dori, S., et al., *HER2/neu expression in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin: an immunohistochemical study*. J Oral Pathol Med, 2002. **31**(8): p. 463-7.
10. Suzuki, S., et al., *EGFR and HER2-Akt-mTOR signaling pathways are activated in subgroups of salivary gland carcinomas*. Virchows Arch, 2012. **461**(3): p. 271-82.
11. Galbiatti, A.L., et al., *Head and neck cancer: causes, prevention and treatment*. Braz J Otorhinolaryngol, 2013. **79**(2): p. 239-47.
12. Glisson, B., et al., *HER2 expression in salivary gland carcinomas: dependence on histological subtype*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(3): p. 944-6.
13. Clauditz, T.S., et al., *Epidermal growth factor receptor (EGFR) in salivary gland carcinomas: potentials as therapeutic target*. Oral Oncol, 2012. **48**(10): p. 991-6.
14. Agulnik, M., et al., *Phase II study of lapatinib in recurrent or metastatic epidermal growth factor receptor and/or erbB2 expressing adenoid cystic carcinoma and non adenoid cystic carcinoma malignant tumors of the salivary glands*. J Clin Oncol, 2007. **25**(25): p. 3978-84.
15. Dodd, R.L. and N.J. Slevin, *Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies*. Oral Oncol, 2006. **42**(8): p. 759-69.
16. Scholl, S., P. Beuzebec, and P. Pouillart, *Targeting HER2 in other tumor types*. Ann Oncol, 2001. **12 Suppl 1**: p. S81-7.
17. El-Rifai, W., et al., *Novel DNA copy number losses in chromosome 12q12--q13 in adenoid cystic carcinoma*. Neoplasia, 2001. **3**(3): p. 173-8.
18. Chen, J.S., et al., *Involvement of PI3K/PTEN/AKT/mTOR pathway in invasion and metastasis in hepatocellular carcinoma: Association with MMP-9*. Hepatol Res, 2009. **39**(2): p. 177-86.
19. Rosner, M. and M. Hengstschlager, *Cytoplasmic and nuclear distribution of the protein complexes mTORC1 and mTORC2: rapamycin triggers dephosphorylation and delocalization of the mTORC2 components rictor and sin1*. Hum Mol Genet, 2008. **17**(19): p. 2934-48.
20. Wei, Q., et al., *EGFR, HER2, and HER3 expression in laryngeal primary tumors and corresponding metastases*. Ann Surg Oncol, 2008. **15**(4): p. 1193-201.
21. Ettl, T., et al., *The PI3K/AKT/mTOR signalling pathway is active in salivary gland cancer and implies different functions and prognoses depending on cell localisation*. Oral Oncol, 2012. **48**(9): p. 822-30.
22. Spiers, A.S., et al., *Metastatic Adenoid Cystic Carcinoma of Salivary Glands: Case Reports and Review of the Literature*. Cancer Control, 1996. **3**(4): p. 336-342.
23. Harries, L.W., et al., *Advancing age is associated with gene expression changes resembling mTOR inhibition: evidence from two human populations*. Mech Ageing Dev, 2012. **133**(8): p. 556-62.

ANEXOS

Exmo. Senhor

Estudante José Alberto Ferraz Martins de Almeida

Maia

Curso de Mestrado Integrado em

Medicina Dentária da

Faculdade de Medicina Dentária da U. Porto

29 JAN. 2014

Assunto: Avaliação pela Comissão de Ética da Faculdade de Medicina Dentária da Universidade do Porto do Plano de Atividades a realizar no âmbito da unidade curricular “Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica” do Mestrado Integrado em Medicina Dentária e cujo título é: “Estudo das características clinico-patológicas e da expressão dos elementos da via intra celular EGFR/HER2-Akt-mTOR em carcinomas adenoide císticos – relação com o prognóstico”.

Informo V. Exa. que o projeto supra citado foi:

- **Aprovado** na reunião da Comissão de Ética do dia 29 de janeiro de 2014.

Com os melhores cumprimentos,

O Presidente da Comissão de Ética



António Felino

(Professor Catedrático)

PARECER ORIENTADOR

Informo que o Trabalho de Monografia desenvolvido pelo estudante José Alberto Ferraz Martins de Almeida Maia com o título: “Estudo das características clínico-patológicas e da expressão dos elementos da via intracelular EGFR/HER2-Akt-mTOR em carcinomas adenoide císticos – relação com o prognóstico” está de acordo com as regras estipuladas na FMDUP, foi por mim conferido e encontra-se em condições de ser apresentado em provas públicas.

17 / 07 / 2014

A Orientadora



DECLARAÇÃO

Monografia de Investigação

Declaro que o presente trabalho, no âmbito da Monografia de Investigação/Relatório de Atividade Clínica, integrado no MIMD, da FMDUP, é da minha autoria todas as fontes foram devidamente referenciadas.

17/07/2014

José Alberto Feres Santos de Almeida Soares

O Investigador