Braz J Otorhinolaryngol. 2019;85(2):144–149

Brazilian Journal of
OTORHINOLARYNGOLOGY
www.bjorl.org

ARTIGO ORIGINAL

Overexpression of CDC7 in malignant salivary gland tumors correlates with tumor differentiation☆

Zohreh Jaafari-Ashkavandi[a,*], Mohammad Javad Ashraf[b] e Ali Asghar Abbaspoorfard[a]

[a] *Shiraz University of Medical Sciences, School of Dentistry, Department of Oral and Maxillofacial Pathology, Shiraz, Irã*
[b] *Shiraz University of Medical Sciences, School of Medicine, Department of Pathology, Shiraz, Irã*

Recebido em 5 de setembro de 2017; aceito em 8 de novembro de 2017
Disponível na Internet em 23 de fevereiro de 2018

KEYWORDS
Salivary gland;
CDC7;
Adenoid cystic carcinoma;
Mucoepidermoid carcinoma;
Pleomorphic adenoma

Abstract
Introduction: Cell division cycle-7 protein is a serine/threonine kinase that has a basic role in cell cycle regulation and is a potential prognostic or therapeutic target in some human cancers.
Objectives: This study investigated the expression of cell division cycle-7 protein in benign and malignant salivary gland tumors and also its correlation with clinicopathologic factors.
Methods: Immunohistochemical expression of cell division cycle-7 was evaluated in 46 cases, including 15 adenoid cystic carcinoma, 12 mucoepidermoid carcinoma, 14 pleomorphic adenoma, and 5 normal salivary glands. Cell division cycle-7 expression rate and intensity were compared statistically.
Results: The protein was expressed in almost all tumors. The intensity and mean of cell division cycle-7 expression were higher in malignant tumors in comparison with pleomorphic adenomas ($p = 0.000$). The protein expression was correlated with tumor grades ($p = 0.000$).
Conclusions: The present study demonstrated cell division cycle-7 overexpression in malignant salivary gland tumors in comparison with pleomorphic adenomas, and also a correlation with tumor differentiation. Therefore, this protein might be a potential prognostic and therapeutic target for salivary gland tumors.
© 2018 Published by Elsevier Editora Ltda. on behalf of Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. This is an open access article under the CC BY license (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

DOI se refere ao artigo: https://doi.org/10.1016/j.bjorl.2017.11.004
☆ Como citar este artigo: Jaafari-Ashkavandi Z, Ashraf MJ, Abbaspoorfard AA. Overexpression of CDC7 in malignant salivary gland tumors correlates with tumor differentiation.Braz J Otorhinolaryngol. 2019;85:144–9.
* Autor para correspondência.
E-mail: jaafariz@sums.ac.ir (Z. Jaafari-Ashkavandi).
A revisão por pares é da responsabilidade da Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial.

2530-0539/© 2018 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

PALAVRAS-CHAVE
Glândula salivar;
CDC7;
Carcinoma adenoide cístico;
Carcinoma mucoepidermoide;
Adenoma pleomórfico

Superexpressão de CDC7 em tumores malignos de glândulas salivares correlaciona-se com a diferenciação dos tumores

Resumo
Introdução: A *cell division cycle-7* é uma serina/treonina quinase que tem um papel básico na regulação do ciclo celular e é um potencial marcador prognóstico ou terapêutico em alguns tipos de câncer humano.
Objetivos: Este estudo investigou a expressão de *cell division cycle-7* em tumores de glândulas salivares benignos e malignos e também sua correlação com fatores clínico-patológicos.
Método: A expressão imuno-histoquímica de *cell division cycle-7* foi avaliada em 46 casos, incluindo 15 carcinomas adenoide císticos, 12 carcinomas mucoepidermoides, 14 adenomas pleomórficos e 5 glândulas salivares normais. A taxa de expressão e a intensidade da proteína *cell division cycle-7* foram comparadas estatisticamente.
Resultados: A proteína foi expressa em quase todos os tumores. A intensidade e a média da expressão de *cell division cycle-7* foram maiores em tumores malignos em comparação com adenoma pleomórfico ($p = 0{,}000$). A expressão da proteína foi correlacionada com os graus do tumor ($p = 0{,}000$).
Conclusões: O presente estudo demonstrou a superexpressão de *cell division cycle-7* em tumores malignos de glândulas salivares quando comparada com o adenoma pleomórfico, além de uma correlação com a diferenciação de tumores. Portanto, essa proteína pode ser um potencial marcador prognóstico e terapêutico para tumores de glândulas salivares.
© 2018 Publicado por Elsevier Editora Ltda. em nome de Associação Brasileira de Otorrinolaringologia e Cirurgia Cérvico-Facial. Este é um artigo Open Access sob uma licença CC BY (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Introdução

Os tumores de glândulas salivares (TGS) são tumores relativamente raros e diversos que representam 3% a 6% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço.[1] Esses tumores consistem em diferentes subtipos benignos e malignos com um amplo espectro histopatológico que podem se sobrepor uns aos outros; no entanto, com um comportamento e tratamento clínico diferentes, o adenoma pleomórfico (AP), o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o carcinoma adenoide cístico (CAC) são os TGS benignos e malignos mais comuns. A cirurgia é a principal forma de tratamento e nos tumores malignos a quimiorradioterapia adjuvante pode ser necessária. Hoje, há muita expectativa em encontrar novos tratamentos anticâncer com base na terapia com alvos moleculares. As principais moléculas que participam do crescimento e da divisão celulares são candidatas promissoras para esse objetivo. Elas podem afetar uma ampla variedade de vários tipos de tumores com alta taxa de proliferação.[2]

A proteína *Cell Division Cycle-7* (CDC7) é uma serina-treonina quinase, originalmente relatada na levedura em brotamento, desempenha um papel fundamental na reprodução do DNA, principalmente através da ativação do complexo MCM e regulação do ponto de verificação da fase S no ciclo celular.[3,4] A subunidade regulatória de CDC7 é Dbf4/ativador das fases S.[5] A superexpressão de CDC7 também foi correlacionada com a inativação de P53[5] e foi encontrada em muitas linhagens e tecidos de células tumorais humanas, inclusive câncer de mama, cólon e pulmão, melanoma e carcinoma de células escamosas orais (CCEO); entretanto, essa proteína tem expressão muito baixa ou indetectável em tecidos normais.[2,5–10]

Tem sido demonstrado que a superexpressão de CDC7 foi correlacionada com um prognóstico ruim em pacientes com linfoma de células B.[11] Além disso, contribui para a resistência aos agentes prejudiciais ao DNA e para o aumento da sobrevivência da linhagem celular do CCEO.[9] A CDC7 tem sido um marcador terapêutico no carcinoma de ovário.[12] Portanto, a CDC7 é um potencial e promissor candidato a marcador da inibição do crescimento celular, porque indica a reprodução do DNA antes de ela começar.[4,6,13] Dessa forma, sugere-se a avaliação da função da CDC7 em qualquer tumor específico. Que seja de nosso conhecimento, não há pesquisas focadas na expressão de CDC7 e sua importância nos TGS. Este estudo teve como objetivo avaliar a taxa de expressão de CDC7 e sua correlação com os parâmetros clínico-patológicos dos TGS benignos e malignos mais comuns.

Método

Amostras de tecido

Neste estudo retrospectivo transversal, foram incluídas amostras de 46 pacientes que consistiram de 14 AP, 15 CAC, 12 CME e cinco glândulas salivares normais (GSN). Os casos foram obtidos do arquivo do Departamento de Patologia de 2009 a 2014. Todos os casos apresentavam diagnóstico definido e tecido epitelial adequado. Foram excluídos os casos com inflamação grave. Os dados gerais, inclusive a idade e o sexo do paciente, bem como o local do tumor, tamanho, grau e estadiamento, foram obtidos a partir das fichas médicas dos pacientes.

Imunohistoquímica

Foram obtidas seções de tecido de 4 μm a partir de blocos fixados em formalina e embebidos em parafina. Após desparafinização e reidratação, a recuperação do antígeno foi feita com tampão Tris em PH = 8 a 121 °C durante 20 minutos. A atividade endógena da peroxidase foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% durante 30 minutos. Em seguida, as seções foram incubadas com anticorpo primário (anticorpo policlonal anti-CDC7, 1:50, Genetex Company, EUA) por 60 minutos. O sistema Envision foi introduzido como anticorpo secundário e a amostra foi lavada em PBS. A solução cromogênica usada foi 3,3' diaminobenzidina tetra-hidrocloreto (DAB). Finalmente, as lâminas foram coradas com hematoxilina de Mayer. Uma seção de nódulo linfático normal foi usada como controle positivo e a mesma seção, omitiu-se o anticorpo primário, como controle negativo.

Os tecidos corados foram avaliados por microscopia ótica e as células com núcleos marrons foram consideradas positivas. Em cada caso, pelo menos 1000 células foram contadas em três campos microscópicos e a porcentagem de células positivas foi anotada. A intensidade da coloração foi avaliada e marcada como 1-leve ou 2-moderada/severa, em comparação com o controle positivo. A média da expressão de CDC7 foi classificada como: 1) células positivas < 5%, 2) 5% -10% e 3) > 10%. O escore final foi obtido com a multiplicação da intensidade e do escore percentual. Os dados foram analisados ??pelos testes de Kruskal-Wallis, Tukey e Dunn e correlação de Spearman. Um valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

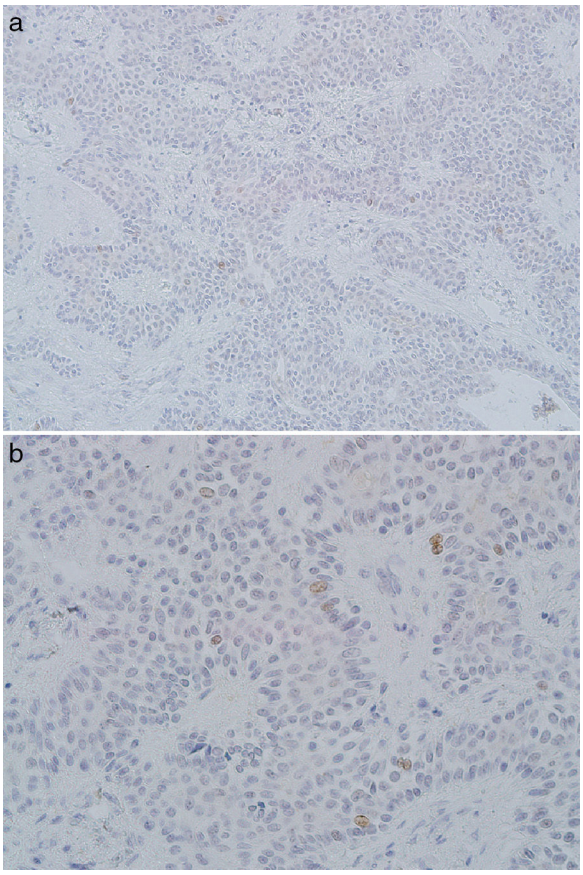

Figura 1 Expressão nuclear fraca de CDC7 no adenoma pleomórfico (A, × 200 e B, × 400).

Resultados

Os pacientes constituíam-se de 18 do sexo masculino e 28 do feminino com média de 49,4 ± 15. Os dados gerais relacionados a todos os grupos do estudo são mostrados na tabela 1.

Nas GSN, dois espécimes exibiram uma coloração nuclear limitada a células acinares e ductais, com intensidade fraca a moderada. Quase todos os tumores, exceto um CME, mostraram expressão nuclear positiva de CDC7.

Os AP apresentaram expressão de CDC7 nas células epiteliais e ductais (fig. 1 A-B), uma média de 2,3 ± 1,2 e 71% dos casos mostraram coloração fraca.

As células epidermoides dos CME mostraram coloração com a CDC7 (fig. 2 A-B) e a maioria dos casos (74%) apresentou expressão moderada/severa com média de 32,1 ± 14,3. As células mucosas e claras não apresentaram coloração. Todos os casos de CAC exibiram expressão de CDC7 moderada/severa com uma média de 9,7 ± 3 (fig. 3 A-B).

Os detalhes sobre a expressão média de CDC7, intensidade de coloração e escore final são mostrados na tabela 2. O teste de Kruskal-Wallis mostrou diferença significante entre os grupos na expressão de CDC7 ($p = 0,000$). O teste de Dunn mostrou significância entre o AP e o CME, bem como entre o AP e CAC ($p = 0,000$ e $p = 0,004$). No entanto, não houve diferença significante entre os grupos CME e CAC. Além disso, os escores finais dos grupos foram significantemente diferentes, de acordo com o teste de Kruskal-Wallis ($p = 0,000$).

Tabela 1 Informações gerais de todos os grupos de estudo

Grupo (n)	AP (14)	CME (12)	CAC (15)	GSN (5)	Total (46)
Idade	39,4 ± 14	60,6 ± 12	49,7 ± 12	49 ± 14	49,4 ± 15,1
(M/F)	5/9	7/5	4/11	2/3	18/28
Local (Maior/Menor)	11/2	10/2	6/8	1/4	28/16
Grau (1, 2, 3)	-	3, 0, 8	5, 10, 0	-	8, 10, 8
Estágio (1, 2, 3, 4)	-	1, 3, 2, 5	1, 3, 4, 5	-	2, 6, 6, 10
Tamanho (1, 2, 3, 4)	-	1, 5, 2, 3	1, 4, 3, 5	-	2, 9, 5, 8

AP, adenoma pleomórfico; CAC, carcinoma adenoide cístico; CME, carcinoma mucoepidermoide; GSN, glândulas salivares normais.
Os dados clínicos de alguns casos não estavam disponíveis.

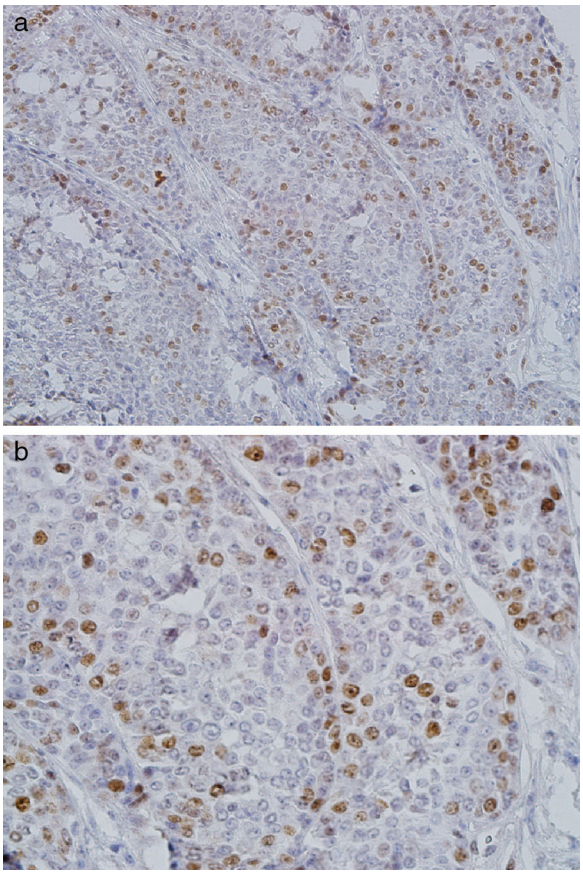

Figura 2 Expressão grave de CDC7 em células epidermoides de carcinoma mucoepidermoide de alto grau (A, × 200; B, × 400).

Tabela 2 Escores de intensidade e expressão média de CDC7 em todos os grupos de estudo

	AP	CME	CAC	GSN
Escore médio de CDC7				
1	5	0	0	2
2	9	1	7	0
3	0	10	7	0
Escore de intensidade				
1	10 (71,4)	2 (18,2)	0	0
2	4 (28,6)	9 (81,8)	15 (100)	2 (100)

AP, adenoma pleomórfico; CAC, carcinoma adenoide cístico; CME, carcinoma mucoepidermoide; GSN, glândulas salivares normais.

O AP apresentou escores significantemente menores da média de CDC7, em comparação com CME e também com grupos de CAC, com o teste de Dunn (p = 0,000 e p = 0,02, respectivamente). No entanto, os grupos CME e CAC foram estatisticamente semelhantes (teste de Dunn, p = 0,26).

Os escores finais também foram diferentes entre os grupos de acordo com os resultados do teste de Kruskal-Wallis (p = 0,000) (tabela 3). O teste de Dunn mostrou que os escores finais do grupo AP foram significantemente menores do que nos dois tumores malignos (p = 0,000); no entanto, os grupos CME e CAC não apresentaram diferenças (p = 1).

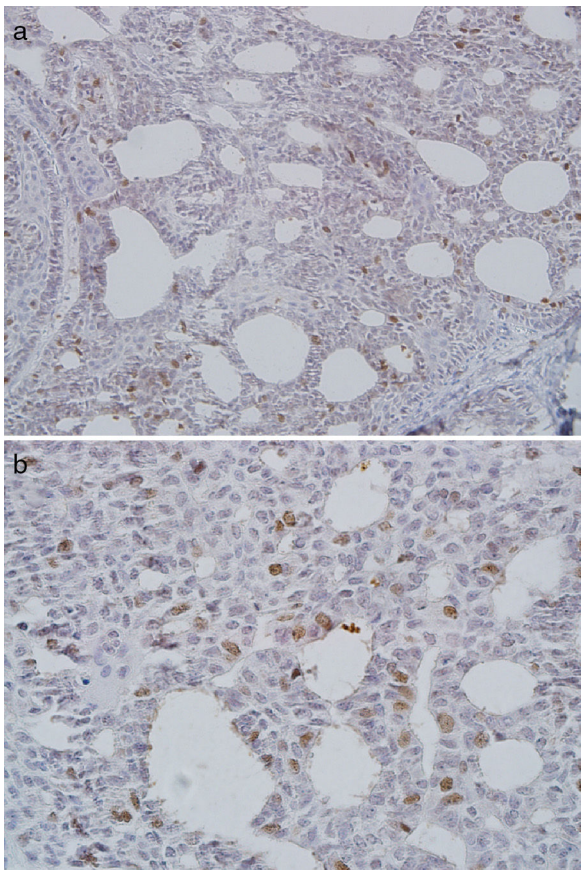

Figura 3 Expressão nuclear grave de CDC7 no carcinoma adenoide cístico (A, × 200; B, × 400).

Tabela 3 Escore final de todos os grupos de estudo (Intensidade × escore médio)

Escores	1	2	3	4	6
CME	1	0	2	0	9
CAC	0	0	1	5	7
AP	0	7	0	2	0
GSN	0	2	0	0	0
Total	1	9	3	7	16

AP, adenoma pleomórfico; CAC, carcinoma adenoide cístico; CME, carcinoma mucoepidermoide; GSN, glândulas salivares normais.

Os tumores de alto grau apresentaram aumento significante da expressão de CDC7 em comparação com os graus baixos e intermediários. O teste de correlação de Spearman mostrou que a expressão de CDC7 foi correlacionada com os graus dos tumores (p = 0,000), mas não com estágio tumoral ou idade e gênero do paciente (p > 0,05).

Discussão

No presente estudo, descrevemos a expressão de CDC7 em AP, CME e CAC e também sua superexpressão em TGS malignos em comparação com glândulas normais e benignas. Vários estudos anteriores já revelaram que a CDC7 tem um

papel básico na proliferação celular, tumorigênese e progressão maligna,[6] ao ativar a reprodução do DNA.[5,8] Nossos achados apoiam estudos prévios feitos em várias linhagens celulares e tecidos de câncer humano. Melling et al. demonstraram a superexpressão da proteína CDC7 em câncer colorretal em associação com a superexpressão de P53 e como marcador prognóstico favorável.[2] Bonte et al. também mostraram que a CDC7 é muito baixa ou indetectável no tecido normal, mas apresenta superexpressão nas linhagens celulares humanas de câncer de mama, cólon e de pulmão.[5] Um estudo mostrou aumento do nível de RNA de CDC7 na linhagem celular de câncer de mama com transformação maligna e também em células hiperproliferantes em menor grau em comparação com células primárias normais.[6] O aumento da expressão de CDC7 tem sido um marcador de CCEO e contribuiu para a resistência ao material prejudicial ao DNA.[9] A CDC7 e a subunidade bf4 formam um complexo que atua como uma proteína quinase ativa em todos os organismos.[14] O alvo principal dessa atividade complexa é o complexo MCM. As células MCM positivas fortes indicam uma atividade alta de CDC7.[11] A MCM2-7 foi considerada como fator de iniciação de reprodução e como um novo biomarcador diagnóstico e prognóstico para vários tipos de câncer humano. A expressão de MCM foi relatada nos tumores que apresentaram superexpressão de CDC7, como o CCEO, linhagem celular e tecido de câncer de mama e também TGS.[15–18] A MCM2 e a MCM3 representaram uma superexpressão em TGS malignos em comparação com os benignos,[17,18] os quais indiretamente apoiam a superexpressão de CDC7 em nossas amostras.

Também foi demonstrado que a superexpressão de CDC7 estava correlacionada com a mutação do gene TP53. A inibição da CDC7 pode induzir a morte celular através de uma via dependente do P53.[19] Bonte et al. encontraram uma correlação entre a perda de P53 e a superexpressão de CDC7 em algumas linhagens de células cancerígenas.[5] Além disso, em outro estudo, a expressão de CDC7 foi relacionada à positividade para P53 no câncer colorretal.[2] A CDC7 foi um alvo terapêutico para câncer de mama com P53 mutante.[6] Estudos anteriores sobre TGS apresentaram maior expressão de P53 em TGS malignos em comparação com AP, o que indiretamente apoia nossos achados.[20]

O presente estudo mostrou uma correlação positiva entre a expressão de CDC7 e graus tumorais. No entanto, nossos dados não mostraram diferença significante entre CAC e CME na expressão de CDC7. Embora o CAC seja um tumor de grau alto com comportamento mais agressivo em comparação com o CME, em nossas amostras a maioria dos espécimes de CME era de tumores de alto grau. Em concordância com nossos resultados, o aumento da expressão de CDC7 foi associado à perda de diferenciação de tumores, instabilidade genômica e desenvolvimento de fenótipo agressivo no câncer de mama.[6] Além disso, os cânceres colorretais e de ovário de grau alto apresentaram maior expressão de CDC7.[2,12] Essa associação da expressão de CDC7 com a diferenciação torna essa proteína um alvo potencial adequado para abordagens terapêuticas e prognósticas. No entanto, em contraste com essas pesquisas, nossos casos, limitados aos que apresentavam dados completos sobre o estágio clínico, não apresentaram correlação significante com a expressão da proteína.

O presente estudo revelou a coloração nuclear de CDC7 em todos os espécimes positivos, o que reforça a função da CDC7 na reprodução do DNA. Estudos anteriores demonstraram acumulação proteica nos núcleos celulares durante a fase G1.[21]

Conclusão

Os presentes achados demonstraram expressão de CDC7 nos TGS benignos e malignos mais comuns e superexpressão nos malignos. A correlação positiva dessa proteína com a diferenciação tumoral demonstra que ela pode atuar como um potencial marcador prognóstico e terapêutico.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

Agradecimentos

Os autores agradecem à Vice-Chancelaria da Universidade de Ciências Médicas de Shiraz pelo apoio a esta pesquisa (Grant # 10052), ao Centro de Consulta de Pesquisa (RCC) da Universidade de Ciências Médicas de Shiraz pela sua inestimável assistência na edição do artigo. Os autores também querem agradecer ao Dr Salehi, do Centro de Desenvolvimento em Pesquisa Odontológica, pela análise estatística. Este manuscrito está vinculado à tese de graduação de Ali Asghar Abbaspour Fard.

Referências

1. Jaafari-Ashkavandi Z, Ashraf M, Afandak N. A clinico-pathologic study of 82 intraoral minor salivary gland tumors. I Red Crescent Med J. 2011;13:674–7.
2. Melling N, Muth J, Simon R, Bokemeyer C, Terracciano L, Sauter G, et al. Cdc7 overexpression is an independent prognostic marker and a potential therapeutic target in colorectal cancer. Diagn Pathol. 2015;10:125.
3. Dally RD, Woods TA. CDC7 Inhibitors. Google Patents; 2014.
4. Montagnoli A, Moll J, Colotta F. Targeting cell division cycle 7 kinase: a new approach for cancer therapy. Clin Cancer Res. 2010;16:4503–8.
5. Bonte D, Lindvall C, Liu H, Dykema K, Furge K, Weinreich M. Cdc7-Dbf4 kinase overexpression in multiple cancers and tumor cell lines is correlated with p53 inactivation. Neoplasia. 2008;10:920–31.
6. Choschzick M, Lebeau A, Marx AH, Tharun L, Terracciano L, Heilenkötter U, et al. Overexpression of cell division cycle 7 homolog is associated with gene amplification frequency in breast cancer. Hum Pathol. 2010;41:358–65.
7. Barkley LR, Santocanale C. MicroRNA-29a regulates the benzo[a]pyrene dihydrodiol epoxide-induced DNA damage response through Cdc7 kinase in lung cancer cells. Oncogenesis. 2013;2:e57.
8. Clarke LE, Fountaine TJ, Hennessy J, Bruggeman RD, Clarke JT, Mauger DT, et al. Cdc7 expression in melanomas, Spitz tumors and melanocytic nevi. J Cutan Pathol. 2009;36:433–8.
9. Cheng AN, Jiang SS, Fan CC, Lo YK, Kuo CY, Chen CH, et al. Increased Cdc7 expression is a marker of oral squamous cell carcinoma and overexpression of Cdc7 contributes to the resistance to DNA-damaging agents. Cancer Lett. 2013;337:218–25.

10. Chen H-J, Zhu Z, Wang X-L, Feng Q-L, Wu Q, Xu Z-P, et al. Expression of huCdc7 in colorectal cancer. World J Gastroenterol. 2013;19:3130–3.
11. Hou Y, Wang HQ, Ba Y. High expression of cell division cycle 7 protein correlates with poor prognosis in patients with diffuse large B-cell lymphoma. Med Oncol. 2012;29:3498–503.
12. Kulkarni AA, Kingsbury SR, Tudzarova S, Hong H-K, Loddo M, Rashid M, et al. Cdc7 kinase is a predictor of survival and a novel therapeutic target in epithelial ovarian carcinoma. Clin Cancer Res. 2009;15:2417–25.
13. Ito S, Taniyami C, Arai N, Masai H. Cdc7 as a potential new target for cancer therapy. Drug News Perspect. 2008;21:481–8.
14. Miller CT, Gabrielse C, Chen YC, Weinreich M. Cdc7p-Dbf4p regulates mitotic exit by inhibiting Polo kinase. PLoS Genet. 2009;5:e1000498.
15. Jurikova M, Danihel L, Polak S, Varga I. Ki67, PCNA, and MCM proteins: markers of proliferation in the diagnosis of breast cancer. Acta Histochem. 2016;118:544–52.
16. Razavi SM, Jafari M, Heidarpoor M, Khalesi S. Minichromosome maintenance-2 (MCM2) expression differentiates oral squamous cell carcinoma from pre-cancerous lesions. Malays J Pathol. 2015;37:253–8.
17. Vargas PA, Cheng Y, Barrett AW, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. J Oral Pathol Med. 2008;37:309–18.
18. Jaafari-Ashkavandi Z, Najvani AD, Tadbir AA, Pardis S, Ranjbar MA, Ashraf MJ. MCM3 as a novel diagnostic marker in benign and malignant salivary gland tumors. Asian Pac J Cancer Prev. 2013;14:3479–82.
19. Vanotti E, Amici R, Bargiotti A, Berthelsen J, Bosotti R, Ciavolella A, et al. Cdc7 kinase inhibitors: pyrrolopyridinones as potential antitumor agents. 1. Synthesis and structure-activity relationships. J Med Chem. 2008;51:487–501.
20. Al-Rawi NH, Omer H, Al Kawas S. Immunohistochemical analysis of P(53) and bcl-2 in benign and malignant salivary glands tumors. J Oral Pathol Med. 2010;39:48–55.
21. Sato N, Sato M, Nakayama M, Saitoh R, Arai K, Masai H. Cell cycle regulation of chromatin binding and nuclear localization of human Cdc7-ASK kinase complex. Genes Cells. 2003;8:451–63.