

Angélica Reinheimer

**IMUNO-EXPRESSÃO DE P53, WIP-1, MMP-9 E TIMP-1 EM
NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal
Orientadora: Prof^a Dr^a Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro
Co-orientadora: Prof^a Dr^a Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Reinheimer, Angélica

Imuno - expressão de p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1
em neoplasias de glândulas salivares / Angélica
Reinheimer ; orientador, Mabel Mariela Rodríguez
Cordeiro , coorientador, Elena Riet Correa Rivero
, 2019.

82 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de
Pós-Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2019.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Neoplasias de glândulas
salivares. 3. Patologia oral. 4. Imuno-histoquímica.
I. Cordeiro , Mabel Mariela Rodríguez. II. Rivero ,
Elena Riet Correa . III. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Odontologia. IV. Título.

Angélica Reinheimer

**IMUNO-EXPRESSÃO DE p53, WIP-1, MMP-9 E TIMP-1 EM
NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES**

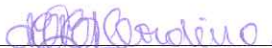
Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor em Odontologia” e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Florianópolis, 28 de fevereiro de 2019.



Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero
Coordenadora do Curso

Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Mabel Marieta Rodríguez Cordeiro
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina



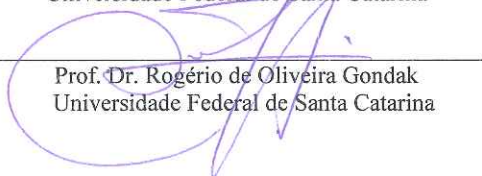
Prof.^a Dr.^a Katya Pulido Díaz
(videoconferência)
Universidad Autónoma de Baja California - México



Prof.^a Dr.^a Cristiane Furuse
Universidade Estadual Paulista – São Paulo – Brasil



Prof.^a Dr.^a Carolina Amália Barcellos da Silva
Universidade Federal de Santa Catarina



Prof. Dr. Rogério de Oliveira Gondak
Universidade Federal de Santa Catarina

Dedico esse trabalho aos meus pais,
Rosali e Lauro, com todo o meu amor e
gratidão.

Ao meu esposo, Leonardo, por seu carinho e
incentivo, que tornaram essa jornada mais
fácil de ser percorrida.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde, força e perseverança para correr atrás dos meus objetivos.

Aos meus irmãos e cunhadas por entenderem a minha ausência, e sempre me apoiarem nas minhas decisões. Aos meus sobrinhos que enchem meu coração de orgulho e amor.

A minha orientadora, Mabel Cordeiro, por acreditar em meu trabalho e me dar a oportunidade de ser sua orientada. Sua tranquilidade, humildade e competência, dignas de um excelente professor, tornam tudo mais simples, foi uma honra trabalhar com você!

A minha co-orientadora, Elena Rivero, pela amizade, ajuda e incentivo na realização desse trabalho. És meu exemplo de profissional, competente em tudo o que fazes. Obrigada também por despertar em mim, a curiosidade e o amor pela patologia.

Aos demais professores que tive o prazer de conviver e aprender um pouco com cada um durante o doutorado: Rogério Gondak, Filipe Modolo, Filipe Daniel, Maria Inês Meurer, Liliane Grando e Felipe Daltoé. "Se vi mais longe foi por estar de pé sobre ombros de gigantes." Obrigada!

Aos amigos que a Pós-Graduação me presenteou: Ana, Emanuely, Jussara, Caroline, Rúbia, Fernanda, Geórgia e Diogo. Obrigada pelo ombro amigo, e por compartilhar as angústias e alegrias dessa fase.

Ao amigo Bubacar, pela grande ajuda na análise estatística. Muito obrigada!

As funcionárias do Laboratório de Patologia Bucal, Sônia e Gilmara, pela ajuda nos experimentos e pelas conversas que faziam o tempo passar mais rápido e ser mais agradável.

A equipe do Serviço de Anatomia Patológica do HU, especialmente à Dra. Daniella Vieira, por permitir que eu realizasse a pesquisa e pelo suporte. Também a funcionária Eliete, pelo auxílio no levantamento de dados, e a companhia nas longas tardes de busca aos prontuários, blocos e lâminas.

A querida Ana Maria Frandolozo, pela dedicação ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, e colaboração para que esse trabalho fosse executado em sua plenitude.

As minhas amigas, Camila, Greyci e Uyara, por serem a família que eu escolhi. Com vocês na minha vida, sei que nunca estarei sozinha. Obrigada por sempre me apoiarem!

Não posso deixar de agradecer as minhas amadas “filhas” felinas, Dora e Brisa, que tornaram minha vida mais feliz desde que chegaram, diminuindo as tensões diárias, e fazendo companhia durante as muitas horas de estudo.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro durante toda a pós-graduação.

A todos que de alguma forma contribuíram para que este trabalho se tornasse realidade.

RESUMO

O estudo dos aspectos moleculares envolvidos na tumorigênese das neoplasias de glândulas salivares tem contribuído para facilitar o diagnóstico e fornecer novas alternativas de tratamento. Nesse contexto, a fosfatase WIP-1 tem surgido como um importante regulador da via de p53, tendo sido encontrada amplificada em vários tipos de câncer. Acredita-se que tenha a capacidade de promover a progressão tumoral pela inativação de p53 e estimulação de metaloproteinasas. Este trabalho teve como objetivo investigar o processo de invasão e progressão tumoral em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares. Para tanto, avaliou-se por meio de imuno-histoquímica, de forma qualitativa e quantitativa, a expressão dos marcadores p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1 em 20 amostras de glândula salivar normal (GN), 25 casos de adenoma pleomórfico (AP), 8 casos de carcinoma mucoepidermoide (CME), 7 casos de carcinoma adenoide cístico (CAC) e 6 casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CEAP). Observou-se que a expressão imuno-histoquímica de p53 foi significativamente maior em neoplasias malignas, do que em glândula salivar normal ($p < 0.05$). WIP-1 também mostrou maior expressão em neoplasias malignas, especialmente quando GN foi comparada com CME ($p = 0.040$) e CAC ($p = 0.016$). MMP-9 mostrou diferença quando GN foi comparada com CAC ($p = 0.010$), e TIMP-1 mostrou diferença significativa entre AP e CEAP ($p = 0.013$). Houve correlação positiva entre p53 e WIP-1 ($p < 0.001$), entre p53 e MMP-9 ($p < 0.001$), entre WIP-1 e MMP-9 ($p < 0.001$) e entre MMP-9 e TIMP-1 ($p = 0.041$). Concluiu-se que WIP-1 não apresenta efeito inibitório significativo para p53, mas provavelmente estimule a atividade de MMP-9 no processo de progressão tumoral em neoplasias de glândulas salivares. Os níveis elevados de expressão de MMP-9 e p53 podem estar associados ao comportamento agressivo do carcinoma adenoide cístico.

Palavras-chave: neoplasias de glândulas salivares. p53. WIP-1. MMP-9. TIMP-1.

ABSTRACT

The study of the molecular aspects involved in the tumorigenesis of salivary gland neoplasms has contributed to facilitate the diagnosis and to provide new treatment alternatives. In this context, WIP-1 phosphatase has emerged as an important regulator of the p53 pathway and has been found to be amplified in several types of cancer. It is believed to have the ability to promote tumor progression by inactivation of p53 and stimulation of metalloproteinases. This work aimed to investigate the tumor invasion and progression process in benign and malignant salivary gland neoplasms. The expression of the p53, WIP-1, MMP-9 and TIMP-1 markers was evaluated in 20 samples of normal salivary gland (GN), 25 cases of pleomorphic adenoma (AP), 8 cases of mucoepidermoid carcinoma (CME), 7 cases of adenoid cystic carcinoma (CAC) and 6 cases of pleomorphic ex-adenoma carcinoma (CEAP). It was observed that immunohistochemical expression of p53 was significantly higher in malignant neoplasms than in normal salivary gland ($p < 0.05$). WIP-1 also showed higher expression in malignant neoplasms, especially when GN was compared with CME ($p = 0.040$) and CAC ($p = 0.016$). MMP-9 showed difference when GN was compared with CAC ($p = 0.010$), and TIMP-1 showed a significant difference between AP and CEAP ($p = 0.013$). There was a positive correlation between p53 and WIP-1 ($p = 0.000$), between p53 and MMP-9 ($p = 0.001$), between WIP-1 and MMP-9 ($p = 0.000$) and between MMP-9 and TIMP-1 ($p = 0.041$). It was concluded that WIP-1 has no significant inhibitory effect on p53 but probably stimulates the activity of MMP-9 in the process of tumor progression of salivary gland neoplasms. Elevated levels of MMP-9 and p53 expression may be associated with the aggressive behavior of cystic adenoid carcinoma.

Keywords: salivary gland neoplasms. p53. WIP-1. MMP-9. TIMP-1.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Via de inibição de p53, por WIP-1.....	28
Figura 2 - Imuno-expressão de p53.....	46
Figura 3 - Imuno-expressão de WIP-1.....	47
Figura 4 - Imuno-expressão de MMP-9.....	48
Figura 5 - Imuno-expressão de TIMP-1	49
Figura 6 - Comparação entre o nível de expressão dos anticorpos em cada grupo.....	52

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Descrição dos anticorpos utilizados	41
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Parâmetros clínicos avaliados.....	45
Tabela 2 – Imunorreatividade dos marcadores.....	50
Tabela 3 – Valores de expressão dos marcadores	50
Tabela 4 – Correlação entre os marcadores	53
Tabela 5 - Comparação entre a expressão dos marcadores e o tipo de glândula salivar acometida	53

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALDH – Aldeído desidrogenase
AP – Adenoma pleomórfico
ATM – Via de sinalização
ATPS – Do inglês: “aminopropyltriethoxysilane” - aminosilano.
CME – Carcinoma mucoepidermoide
CAC – Carcinoma adenoide cístico
CEAP – Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
Chk 1 e 2 – “Checkpoint kinase”
DAB – Diaminobenzidina
DNA – ácido desoxirribonucleico
EGFR – Receptor de fator de crescimento epidérmico
GN – Glândula salivar normal
HE – Hematoxilina e eosina
HRP – Do inglês “Horseradish peroxidase”
HU – Hospital Universitário
LPB – Laboratório de Patologia Bucal
MASC – Carcinoma secretor análogo ao mamário
MDM2- Do inglês: “Murine Doble Minute 2”
MMPs - Metaloproteinases de matriz
OMS – Organização Mundial da Saúde
P53 – Proteína supressora de tumor
P38 MAPK – Do inglês: “p38 mitogen-activated protein kinases”
PBS – Do inglês: “Phosphate buffer saline” - Tampão fosfato-salino
PLAG1 – Gene do adenoma pleomórfico
PPM1D – Gene que codifica WIP-1
SAP – Serviço de Anatomia Patológica
SOX4 – Fator de transcrição
Tp53 – Gene que codifica a proteína p53
TIMPs – Inibidores de metaloproteinases de matriz
UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
WNT/ β Catenina – Via de sinalização
WIP-1 – Fosfatase induzida por p53 do tipo selvagem

LISTA DE SÍMBOLOS

- < - Menor
- > - Maior
- = - Igual
- ± - Desvio-padrão
- % - Porcento
- ® - Marca registrada
- °C - Grau Celsius
- β - Beta
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- mm - Milímetro
- μL - Microlitro
- μm - Micrômetro
- mL - Mililitro
- M - Molar
- mM - Milimolar
- pH - Potencial hidrogeniônico

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3 LACUNA DO CONHECIMENTO.....	33
4 JUSTIFICATIVA.....	35
5 OBJETIVOS.....	37
5.1 Objetivo geral.....	37
5.2 Objetivos específicos.....	37
6 METODOLOGIA	39
6.1 Delineamento do estudo.....	39
6.2 Aspectos éticos e legais.....	39
6.3 Seleção das amostras.....	39
6.4 Levantamento dos dados clínicos.....	40
6.5 Procedimentos Laboratoriais.....	40
6.6 Avaliação imuno-histoquímica.....	42
6.7 Análise estatística.....	42
7 RESULTADOS.....	45
7.1 Análise dos dados clínicos	45
7.2 Análise qualitativa da expressão dos marcadores	46
7.2.1 p53.....	46
7.2.2 WIP-1	47
7.2.3 MMP-9	48
7.2.4 TIMP-1	49
7.3 Análise quantitativa da expressão dos marcadores	50
7.3.1 p53.....	51
7.3.2 WIP-1	51
7.3.3 MMP-9	51
7.3.4 TIMP-1	51
7.4 Correlação entre os marcadores	52

7.5 Comparação entre a expressão dos marcadores e o tipo de glândula salivar	53
8 DISCUSSÃO.....	55
9 CONCLUSÃO.....	63
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICE A – Dados clínicos complementares	78
ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa.....	80

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares constituem um grupo de doenças cuja expressão clínico-patológica traduz-se em uma variedade de lesões, com comportamento benigno ou maligno. A frequência global varia de 0,4 a 13,5 casos por ano para cada 100.000 habitantes (EVESON *et al.*, 2005).

Existem diversos tipos histológicos de neoplasias de glândulas salivares, embora os mais frequentes sejam o adenoma pleomórfico (AP), o carcinoma mucoepidermoide (CME) e o carcinoma adenoide cístico (CAC). O carcinoma ex-adenoma pleomórfico é uma neoplasia maligna menos frequente, porém apresenta significado clínico importante, pois como o nome sugere, origina-se de uma neoplasia benigna, o adenoma pleomórfico (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Com relação aos sítios acometidos, 64 a 80% de todas as neoplasias ocorrem nas glândulas parótidas, 7 a 11% nas glândulas submandibulares, 1% nas glândulas sublinguais e 9 a 23% em glândulas salivares menores (EVESON *et al.*, 2005).

Observa-se que a ampla variedade de tipos histológicos e comportamentos biológicos que essas neoplasias apresentam é a responsável por tornar difícil o diagnóstico e tratamento, suscitando uma constante busca por informações que desvendem os aspectos moleculares envolvidos na tumorigênese (ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015). Estas pesquisas contribuem para que sejam realizadas atualizações constantes nos tipos de neoplasias de glândulas salivares conhecidos. Na última classificação da Organização Mundial da saúde foi incluída uma nova entidade, o Carcinoma secretório análogo ao mamário (MASC) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

O entendimento limitado dessas doenças torna-se especialmente preocupante quando se trata de neoplasias malignas, visto que resulta na falta de regimes eficazes de quimioterapia. Por esse motivo a cirurgia continua sendo o principal tratamento para essas neoplasias e, geralmente, vem acompanhada de morbidade significativa. Isso se reflete na taxa de sobrevivência de cinco anos que cai drasticamente conforme o estágio clínico, sendo 78% para neoplasias em estágio I e 25%, 21%, e 23% para as fases II, III e IV, respectivamente (LUUKKAA, 2005).

Nesse contexto, a imuno-histoquímica pode fornecer aos patologistas uma poderosa ferramenta auxiliar para determinar a diferenciação celular e atribuir classificações corretas e individualizadas, o que pode

impactar positivamente no combate ao tumor e na sobrevivência do paciente (ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015).

Alguns marcadores auxiliam no diagnóstico e entendimento do desenvolvimento desse tipo de neoplasia. Frequentemente utilizam-se os marcadores anti-CD105 e anti-CD34 para avaliação de angiogênese, pois estão relacionados à proliferação de células endoteliais (CARDOSO *et al.*, 2009; MOGHADAM; ABADI; MOKHTARI, 2015), Ki-67, que é um marcador importante de proliferação celular (TADBIR *et al.*, 2012), além de citoqueratinas (NAMBOODIRIPAD, 2014). Também pode ser utilizado o transdutor de sinal e ativador da transcrição (STAT3) que desempenha funções importantes na proliferação celular, favorecendo o desenvolvimento tumoral (ARAÚJO *et al.*, 2008), bem como os marcadores de células mioepiteliais, actina de músculo liso, calponina e vimentina que auxiliam no diagnóstico de alguns tipos de neoplasias (FURUSE *et al.*, 2014). Mas devido à grande variabilidade morfológica, existe uma gama de marcadores que podem ser utilizados de acordo com a suspeita clínica, e ainda há muito a ser explorado em neoplasias de glândulas salivares (NAMBOODIRIPAD, 2014).

A proteína supressora de tumor (p53), que apresenta sua atividade baseada basicamente no controle da transcrição de genes envolvidos no ciclo celular e indução de apoptose vem sendo estudada em neoplasias de glândulas salivares e relacionada com a diferenciação, agressividade e progressão das neoplasias (ALVES *et al.*, 2004; ELABD; MERONI; BLATTNER, 2016).

As MMPs (metaloproteinases de matriz) também participam ativamente do processo de carcinogênese, pois auxiliam a degradação da matriz extracelular, permitindo que as células epiteliais neoplásicas rompam o limite com o tecido conjuntivo. Neste aspecto, a MMP-9 tem um papel crucial na progressão tumoral, atuando diretamente sobre os componentes da membrana basal (EGEBLAD; WERB, 2002).

As atividades desempenhadas pelas MMPs são reguladas sob condições fisiológicas durante a transcrição, ativação do zimogênio e inibição por inibidores endógenos (BREW; NAGASE, 2010). Estes últimos são representados pelos TIMPs, do inglês "*Tissue inhibitors of metalloproteinases*", que desempenham papel inibitório contra a maioria das MMPs conhecidas. Devido à conhecida participação das MMPs no desenvolvimento de diversas doenças, como o câncer, doenças cardíacas e osteoartrite, os TIMPs têm sido estudados como alvos para o desenvolvimento de inibidores específicos com potencial

aplicação clínica nessas doenças (CREEMERS *et al.*, 2001; HIDALGO; ECKHARDT, 2001; MESZAROS; MALEMUD, 2012).

O estudo dos constituintes do processo de carcinogênese já identificados em outros tipos de neoplasias também pode ser útil na elucidação das lacunas no estudo das neoplasias de glândulas salivares. Dentre esses constituintes está a fosfatase WIP-1, que apresenta a capacidade de inibir a proteína supressora de tumor (p53) e tem sido identificada e sobre expressa em vários tipos de câncer, especialmente câncer de mama (EMELYANOV; BULAVIN, 2014). Sua presença parece estar relacionada à progressão do câncer e prognóstico sombrio (DEMIDOV *et al.*, 2009).

Embora a função de vários componentes envolvidos na iniciação tumoral já ter sido identificada, mais estudos são necessários para entender o comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares. Dessa forma, propõe-se a investigação da invasão e progressão tumoral em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, avaliando-se, por meio de imuno-histoquímica, a expressão de p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Neoplasias de glândulas salivares

As neoplasias de glândulas salivares são raras e representam um variado grupo de neoplasias benignas e malignas com diferentes características comportamentais. O diagnóstico histopatológico é a chave para o adequado manejo dessas lesões, uma vez que o grau de agressividade depende do subtipo histológico (BELL; HANNA, 2012). As neoplasias mais prevalentes e que apresentam maior significância clínica serão abordadas nos tópicos abaixo.

2.1.1 Adenoma pleomórfico

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna de glândulas salivares mais comum, correspondendo a cerca de 60% das neoplasias que acometem essas estruturas. Ocorre mais frequentemente na glândula parótida (80% dos casos), mas pode envolver glândulas submandibulares (10%), sublinguais e glândulas salivares menores (EVESON *et al.*, 2005). Embora pouco frequente, pode ocorrer transformação maligna, sendo chamado de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (ELLIS; AUCLAIR, 1996). Clinicamente apresenta-se como uma massa indolor, de crescimento lento, geralmente variando de 2 a 6 cm, porém, sem tratamento pode assumir grandes dimensões (JAIN *et al.*, 2015). O tumor pode ocorrer em qualquer idade, sendo mais comum em adultos de 30 a 50 anos. Há uma leve predileção pelo sexo feminino (TAKAHAMA JUNIOR; ALMEIDA; KOWALSKI, 2009). Microscopicamente, a variedade de padrões histológicos é a principal característica do adenoma pleomórfico, não apenas entre diferentes neoplasias, mas também em diferentes áreas de um mesmo tumor, motivando o seu nome - pleomórfico (do grego - muitas formas) (LEVERSTEIN *et al.*, 1997). É composto por elementos epiteliais e mioepiteliais envolvidos em um estroma de natureza mixoide, lipomatosa, condroide ou osteoide (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). Análise citogenética tem evidenciado que a ocorrência de AP está associada a translocações no gene *PLAG1*, especialmente na região 8q12, o que resulta no desequilíbrio de vários componentes envolvidos na tumorigênese, como as MMPs e seus inibidores teciduais (TIMPs), envolvidos nos mecanismos de invasão tumoral em adenomas pleomórficos (FALCÃO *et al.*, 2014, ZHANG *et al.*, 2009).

2.1.2 Carcinoma mucoepidermoide

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é uma neoplasia de glândulas salivares maligna e localmente invasiva. É responsável por aproximadamente 35% de todas as neoplasias malignas de glândulas salivares maiores e menores, e acomete principalmente a glândula parótida (RAPIDIS *et al.*, 2007). Ocorre mais frequentemente na quinta década de vida e apresenta leve predileção pelo sexo feminino (BEHBOUDI *et al.*, 2006).

Clinicamente, o CME pode apresentar-se como massas submucosas assintomáticas, principalmente quando acomete o assoalho de boca, lábios e região retromolar, enquanto lesões na língua são frequentemente dolorosas (EVESON *et al.*, 2005).

O CME é composto por proporções variáveis de células epidermoides, mucosas e intermediárias. Sua arquitetura varia de predominantemente cística, com células mucosas abundantes, a exclusivamente sólida, contendo ninhos de células epidermoides e poucas células intermediárias. O comportamento clínico desta neoplasia é dependente de seu aspecto histopatológico, podendo apresentar-se de baixo, intermediário ou alto grau, sendo este último o mais agressivo, relacionado a altas taxas de mortalidade (HICKS; FLAITZ, 2000).

Uma das classificações mais utilizadas para determinar o grau histológico do CME é a de Brandwein *et al* (2001), que utiliza escores para registrar características distinguíveis em histologia com base na presença de um componente cístico, necrose, invasão neural, proporção de células epidermoides em comparação com as mucosas, anaplasia e contagem mitótica (BRANDWEIN *et al.*, 2001).

O tratamento de escolha para o CME consiste em ressecção cirúrgica e, em neoplasias de alto grau, utiliza-se, também, radioterapia adjuvante. O tratamento sistêmico, com quimioterapia, tem sido utilizado para o tratamento de neoplasias metastáticas e de forma paliativa, quando não é possível realizar cirurgia ou radioterapia (AGULNIK; SIU, 2004). Vários agentes quimioterápicos já foram estudados e testados, porém sem resposta clínica importante. As taxas de sobrevivência continuam a ser pobres para doença metastática ou para neoplasias recorrentes onde a cirurgia não está indicada (SURAKANTI; AGULNIK, 2008).

2.1.3 Carcinoma adenoide cístico

O carcinoma adenoide cístico (CAC) é considerado a segunda neoplasia maligna mais comum de glândulas salivares e envolve com maior frequência as glândulas salivares maiores (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). No entanto, mais de um terço dos casos acometem glândulas salivares menores, nesse caso, a localização preferencial é o palato, seguido pela língua, mucosa jugal, lábio e assoalho de boca (EVESON *et al.*, 2005). O CAC mostra predileção por pacientes na quinta e sextas décadas de vida (BUCHNER; MERRELL; CARPENTER, 2007).

Clinicamente apresenta-se como um aumento de volume ou nódulo de consistência endurecida, recoberto por mucosa íntegra. Queixas de dor e desconforto podem estar presentes. Tende a crescer lentamente, mimetizando comportamento clínico indolente, o que pode resultar no diagnóstico tardio e, conseqüentemente, pior prognóstico (BHAYANI *et al.*, 2012). A sobrevida também é prejudicada pelas altas taxas de recidiva e metástase (COHEN *et al.*, 2004).

Histologicamente, é possível observar dois tipos de células principais, as células ductais e as células mioepiteliais, organizadas em três padrões definidos: tubular, cribriforme e sólido (EVESON *et al.*, 2005): O padrão tubular apresenta células cuboidais de citoplasma eosinofílico e escasso, arranjadas em estruturas ductiformes de duas camadas de células envoltas por um estroma hialino. As células que circundam internamente esses espaços tubulares são do tipo epitelial ductal que, por sua vez, são cercadas por uma camada periférica de células mioepiteliais. O padrão cribriforme exhibe ninhos de células epiteliais dispostas concêntrica formando diversos espaços cilíndricos. Esses espaços são, na maioria, pseudocistos que apresentam no seu interior proteoglicanos. As células que envolvem esses pseudocistos são células mioepiteliais de núcleo basofílico ovoide e citoplasma escasso. Os espaços ductais são preenchidos por material mucoso eosinofílico e cercados por células cuboidais apresentando citoplasma mais volumoso e eosinofílico. No padrão sólido, as células tumorais formam lençóis ou ninhos de tamanhos e formatos variados, onde se abrem, às vezes, estruturas ductiformes. As células neoplásicas apresentam geralmente morfologia cuboidal, núcleos ovais e hiper cromáticos, com citoplasma claro e escasso (EVESON *et al.*, 2005).

Através de caracterização do perfil genético de CAC, foi observada alta expressão dos fatores de transcrição SOX4 e genes da via Wnt/B-catenina. Além disso, observou-se que o proto-oncogene MYB

apresenta papel importante na patogênese de CAC (FRIERSON *et al.*, 2002). Recentemente a fosfatase WIP-1 também foi encontrada superexpressa em CAC, sugerindo que a sua presença esteja possivelmente relacionada à metástase e prognóstico desfavorável (TANG *et al.*, 2015).

2.1.4 Carcinoma ex-adenoma pleomórfico

O carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CEAP), também conhecido como tumor maligno misto, é uma rara neoplasia maligna que se desenvolve em um adenoma pleomórfico. A transformação maligna vem sendo relatada, principalmente, nos casos de excisão cirúrgica incompleta, múltiplas recidivas e em tumores com longo tempo de evolução (ELLIS; AUCLAIR, 1996; NAGAO *et al.*, 1981).

A incidência do CEAP é de aproximadamente 3,6% de todas as neoplasias de glândulas salivares e 12% das neoplasias malignas de glândulas salivares (EL-NAGGAR *et al.*, 2017). A idade média de acometimento é 60 anos de idade, uma década mais tarde do que o adenoma pleomórfico (EVESON *et al.*, 2005; OLSEN; LEWIS, 2001). Normalmente identifica-se crescimento rápido, por vezes doloroso, em região de aumento de volume prévio (KATABI *et al.*, 2010). Com relação ao comportamento clínico, é considerada uma neoplasia agressiva, pois apresenta altos índices de recorrência, metástase e morte relacionada à doença (ZHAO *et al.*, 2013).

Histologicamente, caracteriza-se pelo componente benigno representando aproximadamente 50 a 60% da área total da neoplasia. A região de AP normalmente é bem demarcada das áreas de componente maligno, onde observa-se uma aparência microscópica variável, com pleomorfismo celular e nuclear, atividade mitótica anormal, além de invasão vascular e perineural (KATABI *et al.*, 2010).

São definidos subtipos histológicos para o CEAP, de acordo com as características do componente maligno, podendo ser classificados como carcinoma do ducto salivar, carcinoma mioepitelial, carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma adenoide cístico, carcinoma indiferenciado, ou adenocarcinoma sem outra especificação (SOE) (OLSEN; LEWIS, 2001). E de acordo com o grau de invasão tumoral através da cápsula fibrosa do AP, o CEAP pode ser subclassificado em intracapsular, minimamente invasivo e amplamente invasivo (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

O diagnóstico pode ser difícil, pois a área de transformação maligna pode ser discreta e, quando identificada, pode ser difícil de

classificá-la (OLSEN; LEWIS, 2001). Também é difícil detectar precocemente a transformação maligna do PA, especialmente em neoplasias com um componente mioepitelial, que é semelhante entre áreas benignas e malignas (ALTEMANI *et al.*, 2005).

A progressão do AP para CEAP é um processo complexo que envolve instabilidade genômica e sucessivas mutações durante o crescimento tumoral, envolvendo, dentre outros fatores, alterações epigenéticas e a perda de genes supressores de tumor (MARIANO *et al.*, 2016). Vários pesquisadores encontraram mutações no gene supressor de tumor Tp53, o que pode contribuir para a progressão tumoral em CEAP (GOMES *et al.*, 2012; MATIZONKAS-ANTONIO *et al.*, 2005).

2.2 Aspectos moleculares das neoplasias de glândulas salivares

Os mecanismos biológicos responsáveis pelo comportamento clínico das neoplasias de glândulas salivares não estão bem esclarecidos, o que tem suscitado a procura por marcadores biológicos que colaborem na previsão desse comportamento e auxiliem no entendimento dos padrões de invasão e progressão dessas neoplasias (ZHU; SCHUERCH; HUNT, 2015). O estudo desses mecanismos pode ser auxiliado pela análise imuno-histoquímica da expressão das proteínas descritas abaixo.

2.2.1 p53

A iniciação tumoral depende de múltiplas alterações funcionais e mutações nas células, que podem ocorrer em qualquer uma das etapas de crescimento e diferenciação celular. Tais alterações afetam principalmente duas classes de genes reguladores: os promotores do crescimento (proto-oncogenes), e os inibidores do crescimento celular (genes supressores de tumor) (SHORTT; JOHNSTONE, 2012).

p53 é uma das mais importantes proteínas supressoras de tumor, codificada pelo gene TP53. A sua atividade supressora tumoral é baseada no controle da transcrição de genes que estão envolvidos no ciclo celular, indução de morte celular, senescência e regulação do metabolismo celular (ELABD; MERONI; BLATTNER, 2016).

Na ausência de estresse celular, a p53 é rapidamente degradada, o que mantém os níveis baixos dessa proteína, e as poucas moléculas restantes de p53 são mantidas inativas. Porém, situações de danos no DNA levam à sua rápida ativação, fazendo com que ela aja primeiramente desacelerando a progressão do ciclo celular, o que

permite que a célula tenha mais tempo para reparar o DNA antes de entrar na fase S ou mitose. Se o dano celular não puder ser reparado, a p53 conduz à apoptose ou à senescência, o que evita a propagação das lesões do DNA para as células-filhas (BOEHME; BLATTNER, 2009).

O que define se a ativação de p53 poupará a célula ou levará à sua morte por apoptose é o equilíbrio intra e extracelular nos eventos de sinalização (MATT; HOFMANN, 2016). Um importante regulador da atividade de p53 é a proteína MDM2, que é produto de um proto-oncogene. MDM2 regula p53 por três diferentes mecanismos: inibindo sua atividade transcricional, controlando sua localização subcelular (promovendo a exportação de p53 do núcleo para o citoplasma) e modulando sua estabilidade proteica. (ELABD; MERONI; BLATTNER, 2016). Nesse contexto, a proteína MDM2 tem a capacidade de inibir p53 e por esse motivo é encontrada amplificada em vários tipos de câncer, incluindo neoplasias de glândulas salivares (ARAÚJO *et al.*, 2000; LIMA *et al.*, 2009; TISATO *et al.*, 2017; VAN-MAERKEN *et al.*, 2009).

O gene supressor de tumor Tp53 é muito suscetível a mutações. De fato, essa é uma das principais alterações gênicas encontradas no câncer humano (MATT; HOFMANN, 2016). Diante de uma mutação, a p53 é anormalmente codificada, transformando-se em p53 mutante, que se acumula no núcleo das células. A proteína p53 normal apresenta meia-vida de apenas seis a 12 minutos, e seu conteúdo é reduzido nos núcleos, dificilmente sendo detectada por imuno-histoquímica. No entanto, a meia-vida da proteína p53 mutada é de quatro a 12 horas, e acumula-se mais intensamente nos núcleos, por esse motivo é detectada mais facilmente (LI *et al.*, 2017).

Alguns estudos correlacionaram a expressão de p53 com a alteração na diferenciação celular, agressividade e progressão das neoplasias de glândulas salivares, os resultados são variáveis mas, de maneira geral, mostra baixa imunorreatividade e valores de expressão em tecido não neoplásico e em neoplasias benignas e valores mais altos em neoplasias malignas, sugerindo que p53 desempenhe um papel no desenvolvimento e progressão dessas neoplasias (ALVES *et al.*, 2004, FAUR *et al.*, 2015; WEBER *et al.*, 2002).

Entretanto, observa-se na literatura, que existe uma limitação importante nas investigações sobre p53, pois ainda não existem valores definidos de expressão que possam refletir no comportamento biológico das neoplasias (NORDKVIST *et al.*, 2000). A associação dos níveis de expressão de p53 e sua relação com outros marcadores envolvidos no processo de iniciação tumoral pode auxiliar nesse entendimento.

2.2.2 WIP-1

WIP-1, do inglês “*wild-type p53-induced phosphatase 1*”, é uma fosfatase de serina/treonina, codificada pelo gene PPM1D, conhecida por sua função de inativar a proteína supressora de tumor, p53, em resposta a diversos estresses ambientais (BULAVIN *et al.*, 2004).

Para desvendar o seu mecanismo de ação, estudos se concentram principalmente nas interações de WIP-1 com moléculas em resposta a danos no DNA, e está claro que um importante papel desempenhado consiste em inativar várias vias de sinalização (ZHU; BULAVIN, 2012). Dentre elas estão a inibição da p38 MAPK, a desfosforilação de diversas moléculas envolvidas na via de sinalização ATM, e da Checkpointkinase2 (ChK2), além de participar da regulação das proteínas oncogênicas MDM2 e MdmX, substratos da ATM. (LU *et al.*, 2008). (Figura 1).

Entretanto, o mecanismo pelo qual essa proteína promove tumorigênese não está completamente elucidado, alguns autores acreditam que o principal alvo seja a inibição da p38 MAPK que, por sua vez, reduz a fosforilação da p53, suprimindo a transcrição mediada por p53, resultando na regulação de realimentação da sinalização de p38-p53, o que contribui para a supressão da apoptose em células cancerosas (HARRIS; LEVINE, 2005).

Outros pesquisadores acreditam que além da inibição de p38 MAPK, desfosforilação e inativação de outras quinases de direcionamento, ocorre a desfosforilação da própria p53 e estabilização de MDM2, considerando este último, o principal contribuinte para o efeito inibitório de p53 (VAN MAERKEN *et al.*, 2009).

Devido a essa capacidade de inativar p53, WIP-1 participa negativamente da complexa rede de mecanismos de proteção que age para impedir o desenvolvimento de neoplasias e a transformação maligna. Por esse motivo, têm sido observada estar sobre-expressa em vários tipos de neoplasias, incluindo câncer de mama (EMELYANOV; BULAVIN, 2014), neuroblastoma (RICHTER *et al.*, 2015), câncer colorretal (DEMIDOV *et al.*, 2007) e nasofaríngeo (ZHANG *et al.*, 2014). A amplificação de WIP-1 também tem sido relacionada com baixas taxas de sobrevida em câncer de pulmão, podendo ser considerada como um bom marcador de prognóstico (ZHAO M. *et al.*, 2016). Também foi relacionada a menor sobrevida em pacientes com glioma (LIANG *et al.*, 2012).

Apesar de WIP-1 ser observada em muitos cânceres humanos, parece que possui uma função potencializadora, mas não tem a

capacidade de desencadear a tumorigênese (GOLOUDINA *et al.*, 2016). Estudos têm mostrado que WIP-1 tem a capacidade de estimular a atividade de metaloproteínas para promover a invasão e progressão tumoral em CAC, carcinoma nasofaríngeo e colangiocarcinoma (LIU *et al.*, 2017; TANG *et al.*, 2015; ZHANG *et al.*, 2014;).

Além de contribuir para o entendimento dos mecanismos envolvidos na progressão tumoral, o estudo da função de WIP-1 tem colaborado para a descoberta de novos alvos terapêuticos, que visam a sua inibição (ALI; ABEDINI; TSANG, 2012; KONG; JIANG; MERCER, 2009).

Entretanto, a expressão de WIP-1 foi pouco estudada até o momento em neoplasias de glândulas salivares. Um único estudo demonstrou que WIP-1 contribuiu para a migração e invasão em CAC. Os resultados revelaram que WIP-1 estimula a migração e invasão do tumor por meio da indução de MMP-9 e de VEGF-C, além da ativação da via de sinalização Wnt/ β -catenina (TANG *et al.*, 2015).

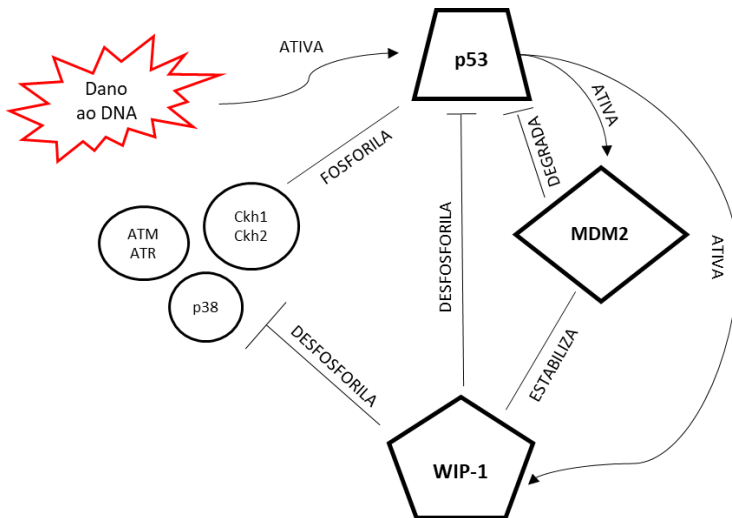


Figura 1. Mecanismos de inibição de p53, por WIP-1. Quando uma célula sofre danos ao DNA, p38 MAP kinase, ATM e possivelmente ATR podem desfosforilar p53 diretamente ou através de Chk1 ou Chk2. Uma vez fosforilada, p53 ativa MDM2 e WIP-1. A partir daí, WIP-1 desfosforila as quinases que fosforilam p53 e diretamente, a própria p53. Além disso, estabiliza a MDM2, que atua na degradação de p53. (Adaptado de LU *et al.*, 2008).

2.2.3 MMP-9

As MMPs têm um impacto importante na progressão tumoral, pois podem regular o microambiente do tumor e, por este motivo, tem sido observado que sua expressão está aumentada em quase todos os cânceres humanos (CURRAN et al., 1999). O seu mecanismo de ação básico - a degradação de proteínas - regula vários comportamentos celulares com relevância para a biologia do câncer. Estes incluem o crescimento das células, diferenciação, apoptose, migração, invasão e angiogênese (EGEBLAD; WERB, 2002).

Atualmente, mais de 20 tipos diferentes de MMPs humanas foram identificadas, as quais são classificadas de acordo com a especificidade do substrato e a sua homologia interna, dentre elas, as colagenases, gelatinases, estromelinas e MMPs ligadas à membrana (HUA et al., 2011; VISSE; NAGASE, 2003).

Uma classe de MMPs frequentemente relacionada à tumorigênese é a de gelatinases, representadas pela MMP-2 e MMP-9. Estas são conhecidas pela capacidade de degradar colágeno do tipo IV, que é um componente importante da membrana basal, a primeira barreira por onde penetram as células tumorais quando as neoplasias se tornam invasivas (PATEL et al., 2005). Mas a função das MMPs não se limita a romper essa barreira física, pois a invasão tumoral é considerada um processo dinâmico e complexo, que envolve múltiplas etapas, como o destacamento de células malignas, atravessamento da matriz extracelular e membrana basal e invasão dos canais linfo-vasculares, tendo as MMPs papel muito importante em todos esses processos (CURRAN et al., 1999).

Estudos clínicos indicam que a elevada expressão de MMP-9 está relacionada com metástase e invasão tumoral em câncer bucal (ZHENG et al., 2015), metástase a distância em câncer colorretal (MURRAY et al., 1996), além de impactar negativamente no prognóstico da doença e sobrevida do paciente em vários tipos de neoplasias (RUOKOLAINEN; PÄÄKKÖ; TURPEENNIEMI-HUJANEN, 2004; SUN et al., 2014). Entretanto, pouco se sabe a respeito da participação das MMPs em neoplasias de glândulas salivares.

Um estudo *in vitro* com células mioepiteliais obtidas e cultivadas a partir de amostras de adenoma pleomórfico, mostrou que quando foi adicionado EGF (fator de crescimento epidérmico) a estas células, observou-se aumento na expressão de MMP-2, indicando que essa adição favorece a dissolução da membrana basal contribuindo para a

migração celular e a progressão tumoral em adenoma pleomórfico (NAVARINI *et al.*, 2015).

Piao *et al.* (2012), avaliaram a expressão imuno-histoquímica de CD147 e MMP-9 em 35 amostras de carcinoma ductal, e relacionaram com o tempo de sobrevida dos pacientes após o tratamento. Concluíram que o aumento da expressão desses marcadores está associado à progressão, comportamento agressivo e prognóstico sombrio em carcinoma do ducto salivar.

Recentemente avaliou-se a imuno-expressão de MMP-9 em 42 amostras de CAC, sendo positiva em 66,7% dos casos. Dessa forma, foi possível relacionar os níveis de expressão a indicadores de prognóstico, como o estadiamento TNM, o tipo histológico do tumor e invasão neural (ZHAO L. *et al.*, 2016).

2.2.4 TIMP-1

As MMPs exercem sua atividade biológica preferencialmente no meio extracelular. Uma vez na matriz extracelular (MEC) também sofrem a influência de substâncias endógenas capazes de desativar seus zimogênios. Os principais responsáveis por regular essa ação são os inibidores teciduais das metaloproteinases de matriz (TIMPs), importantes reguladores da MEC, remodelação de tecidos e comportamento celular (BREW; NAGASE, 2010). Sob condições patológicas, alterações dos níveis de TIMPs são considerados importantes, pois eles afetam diretamente o nível de atividade das MMPs, podendo inibi-las reversivelmente (JENSEN *et al.*, 2010).

Os TIMPs consistem em uma família de quatro proteínas secretadas (TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4). Estudos demonstram que os TIMPs diferem quanto à sua capacidade de inibição de MMPs. Os tipos 1 (TIMP-1) e 2 (TIMP-2) são caracterizados por apresentarem atividade de inibição contra formas ativas de todas as famílias de MMPs, entretanto TIMP-1 preferencialmente forma complexo com a MMP-9, enquanto TIMP-2 forma complexo com a MMP-2 (JENSEN *et al.*, 2010; STERNLICHT; WERB, 2001; ZHANG *et al.*, 2009).

Padrões de expressão de MMP-9 e TIMP-1 estão estreitamente correlacionados com os processos fisiológicos, patológicos e microambientais caracterizados pela degradação e acúmulo de MEC, motivando estudos para desvendar sua participação na iniciação tumoral. O equilíbrio entre essas proteínas é um parâmetro importante a ser avaliado. (AVÂDANEI *et al.*, 2013; MIYAKE *et al.*, 2014; ZHANG *et al.*, 2009).

Além da inibição de MMPs, os TIMPs possuem funções adicionais, incluindo crescimento, diferenciação e migração celular, ação anti e pró-apoptótica, participação na angiogênese, bem como na promoção da invasão tumoral (BREW; NAGASE, 2010). Também parecem funcionar como “fatores de crescimento” e apresentam a capacidade de inibir a angiogênese (GOMEZ *et al.*, 1997).

Estudos têm mostrado que a superexpressão de TIMPs apresenta efeito benéfico, estando relacionada à redução do tamanho de melanoma, devido à sua atividade antiproliferativa (MONTGOMERY *et al.*, 1994). Enquanto outros, mostram que os TIMPs apresentam papel importante na promoção da tumorigênese e metástase de câncer de cólon (SONG *et al.*, 2016) e, quando avaliado no plasma sanguíneo, esteve relacionado a pior prognóstico e baixa sobrevida em pacientes com câncer de mama (WURTZ *et al.*, 2008).

Embora haja conhecimento sobre algumas funções desempenhadas por TIMPs e MMPs em condições fisiológicas e patológicas, os resultados da literatura ainda são conflitantes, e pouco se sabe a respeito da participação de TIMPs em neoplasias de glândulas salivares.

3 LACUNA DO CONHECIMENTO

As neoplasias de glândulas salivares são raras, apresentam um amplo espectro morfológico e diversos padrões histológicos, fazendo com que o diagnóstico seja extremamente difícil. Por esse motivo, faz-se necessária uma constante busca por marcadores biológicos que auxiliem tanto no diagnóstico quanto no entendimento do processo de iniciação e progressão tumoral (NORDKVIST 2000).

Sabe-se que alterações gênicas desempenham um papel importante nas neoplasias. A frequência dessas alterações difere entre os vários tipos de neoplasias e a inativação de genes supressores de tumores e/ou a ativação de genes responsáveis pela proliferação celular estão envolvidos nesse processo (HARRIS; LEVINE, 2005). Essas alterações, juntamente com a identificação de proteínas que participam do processo de invasão tumoral podem ser avaliadas através de análise imuno-histoquímica (FAUR *et al.*, 2015).

A ciência ainda está longe de desvendar todos os mecanismos envolvidos na tumorigênese dos mais diversos tipos de neoplasias. Portanto, toda pequena descoberta é válida, e contribui para o entendimento geral do mecanismo biológico das neoplasias. Ademais, a expressão das proteínas propostas neste estudo ainda não está claramente identificada ou não foi plenamente investigada, sob a óptica da sua participação no processo patológico do câncer de glândulas salivares. Dessa forma este estudo pode contribuir para que novos alvos terapêuticos possam ser desenvolvidos, o que reverteria sobremaneira para um tratamento adequado, impactando positivamente na sobrevivência dos pacientes.

4 JUSTIFICATIVA

O AP, CME, CAC e CEAP são neoplasias de glândulas salivares com etiopatogênese incompletamente elucidada, sendo o diagnóstico, classificação histológica e comportamento clínico alvos de discussão e interesse de estudo, justificando-se a importância do presente trabalho.

WIP-1 está envolvida na invasão e progressão de diversas neoplasias, mas ainda há apenas especulações a respeito do carcinoma adenoide cístico. Esse envolvimento provavelmente se deve à sua capacidade de inativar vias de sinalização associadas à p53, regulando negativamente a sua expressão, porém essa relação não foi estudada nas demais neoplasias de glândulas salivares.

As MMPs são reconhecidamente envolvidas no processo de invasão tumoral, por agir na degradação da membrana basal, e estudos têm mostrado que WIP-1 é uma das responsáveis por estimular esse processo no carcinoma adenoide cístico, carcinoma nasofaríngeo e colangiocarcinoma. Entretanto, poucos estudos e com resultados conflitantes mostram a participação de MMPs na invasão em neoplasias de glândulas salivares, assim como existem poucas informações a respeito da influência de seus inibidores (TIMPs), e não está claro o mecanismo pelo qual a WIP-1 pode contribuir para esse processo.

A elucidação dos mecanismos de invasão e progressão a partir do estudo do padrão de expressão dessas moléculas nos diferentes tipos de neoplasias de glândulas salivares, pode futuramente ser útil como um preditor do comportamento clínico dessas neoplasias, bem como auxiliar na descoberta de novos e efetivos tratamentos.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Analisar a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas (adenoma pleomórfico) e malignas (carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoide cístico e carcinoma ex-adenoma pleomórfico) de glândulas salivares, a fim de melhor compreender a sua participação nos processos de invasão e progressão tumoral.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar um levantamento dos casos de neoplasias de glândulas salivares de interesse e obter os respectivos dados clínico-patológicos.
- Analisar o padrão de expressão imuno-histoquímica de p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1 em glândula salivar normal e nas lesões estudadas.
- Comparar o padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1 na amostra estudada.
- Correlacionar o padrão de expressão dos marcadores com o tipo de glândula salivar afetada (maior ou menor).
- Verificar a interferência dos marcadores p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1 nos achados histopatológicos das lesões estudadas.

6 METODOLOGIA

6.1 Delineamento do estudo

O estudo realizado é de natureza básica, observacional descritivo retrospectivo. Os resultados foram avaliados de forma quantitativa e qualitativa.

6.2 Aspectos éticos e legais

O presente projeto foi submetido à apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), do Comitê Avaliador do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC), recebendo parecer favorável à execução da pesquisa, sob os números de registro: CAAE: 57274016.2.0000.0121, número do parecer: 1.657.413.

6.3 Seleção das amostras

Realizou-se um levantamento de todos os casos de neoplasias de glândulas salivares com base nos laudos histopatológicos do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC), e do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (SAP/HU-UFSC), no período de 1995 a 2016. Todos os casos foram reavaliados e classificados de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

Após a coleta de dados inicial, foram selecionados para estudo imuno-histoquímico, 25 casos de adenoma pleomórfico (AP), oito casos de carcinoma mucoepidermoide (CME), sete casos de carcinoma adenoide cístico (CAC), seis casos de carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CEAP), além de 20 casos de glândula salivar normal (GN). Os casos de glândulas salivares normais foram provenientes de biópsias realizadas para investigação da Síndrome de Sjögren ou mucoccele, compreendendo glândulas salivares maiores e menores, e que tiveram diagnóstico final de glândula salivar com características usuais, livres de inflamação.

Foram utilizados dados referentes às características clínicas das lesões que se encontram descritas nas fichas de biópsia, lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE), blocos de inclusão em parafina e cortes histológicos destes para a realização de imuno-histoquímica em

espécimes de GN, AP, CME, CAC, CEAP, que foram obtidos através de biópsia incisional ou excisional. Pelo fato de parte do material ser proveniente de biópsia incisional, não foi possível realizar a gradação histológica das neoplasias.

Como critérios de inclusão, as fichas de biópsia deveriam estar adequadamente preenchidas, assim como os laudos correspondentes. Além disso, foram utilizadas amostras onde o material biológico estava devidamente fixado e apresentando material suficiente para análise sem exaurir a amostra. Deste modo, foram excluídos da amostra todos os casos que não preencheram esses requisitos.

6.4 Levantamento dos dados clínicos

A verificação dos dados clínicos das amostras selecionadas foi realizada através da análise das fichas de biópsia arquivadas no LPB-UFSC e nos prontuários do HU-UFSC. Foram coletados dados relativos à idade do paciente, sexo, hábitos deletérios, bem como a localização da lesão, sintomatologia e tempo de evolução.

6.5 Procedimentos Laboratoriais

Os espécimes selecionados neste estudo foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica, utilizando os anticorpos anti-humanos para detecção dos antígenos p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1. Os procedimentos técnicos foram realizados no Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC), seguindo o protocolo padronizado pelo mesmo: cortes teciduais seriados de 3µm de espessura, montados sobre lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene; Sigma-Aldrich, São Paulo, SP, Brasil) a 5% em acetona, foram desparafinizados em xilol e hidratados com passagens sucessivas em soluções decrescentes de etanol. Previamente à incubação com os anticorpos primários, com o objetivo de bloquear a atividade endógena da peroxidase, as lâminas foram incubadas em 40 ml de PBS (*Phosphate-Buffered Saline*) + 40 ml de álcool metílico + 20 ml de Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) durante 20 minutos, seguida por solução de peróxido de hidrogênio 3% (90 ml de álcool metílico + 10 ml de H₂O₂), durante 10 minutos.

Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada e imersas em solução tampão citrato 0,01M em pH 6,0 por 40 minutos em banho-maria à temperatura de 96°C com o objetivo de reativar os sítios antigênicos. Após lavagem em água destilada, as lâminas foram imersas

em solução salina tampão fosfato (PBS) 10mM, pH 7,2-7,4 (Sigma Chemical CO, St. Louis, MO, USA). Utilizaram-se lâminas histológicas com um corte tecidual para cada reação. A incubação primária foi obtida adicionando a solução de anticorpo, diluída segundo as orientações do fabricante, sobre os cortes teciduais e as lâminas foram mantidas em câmara úmida por 18 horas. Após esse período foi realizada dupla lavagem dos cortes em tampão PBS por 5 minutos cada, à temperatura ambiente, seguida da incubação com anticorpo secundário anti-IgG biotilado conjugado com um polímero de peroxidase (Kit Envision+/HRP, Dupla ligação coelho/camundongo, DAKO®, Glostrup, Dinamarca) pronto para uso, durante uma hora em câmara úmida à temperatura ambiente. Passado o período de incubação, as amostras foram lavadas por duas vezes em PBS por 5 minutos cada, à temperatura ambiente. Para detecção da reação imuno-histoquímica, as amostras foram cobertas por 3-5 minutos com Kit de solução cromógena contendo 0,03% de 3,3'-diaminobenzindina (DAB) previamente diluída em tampão imidazol pH 7,2 e peróxido de hidrogênio a 0,3% (DAKO®, Glostrup, Dinamarca). A contra-coloração foi obtida pela imersão das lâminas em hematoxilina de Harris por 2,5 minutos. Por fim, foram realizados os processos de desidratação em etanol, diafanização em xilol e montagem definitiva das lâminas com Entellan® (MERCK, Darmstadt, Germany). O controle negativo para cada caso foi obtido pela abolição do anticorpo primário nas reações. O controle positivo e as informações dos anticorpos estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos anticorpos utilizados.

<i>Anticorpo</i>	<i>Origem</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Diluição</i>	<i>Controle Positivo</i>
<i>Anti-p53</i>	Monoclonal de camundongo	Sigma-Aldrich	1:400	Carcinoma de mama
<i>Anti- WIP-1</i>	Monoclonal de camundongo	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Carcinoma de tireoide
<i>Anti-MMP-9</i>	Policlonal de camundongo	Sigma-Aldrich	1:200	Medula óssea
<i>Anti-TIMP-1</i>	Monoclonal de camundongo	Santa Cruz Biotechnology	1:100	Carcinoma de mama

6.6 Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação das reações foi realizada com o software NIH ImageJ 1.52a (National Institute of Health, Maryland, EUA) a partir de imagens capturadas com câmera fotográfica (Cannon, A620, San Jose, CA, USA) acoplada a microscópio de luz (Axiostar Plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), com magnitude de 400x. As imagens foram obtidas em regiões de *hot spot* (áreas com maior marcação).

A imunorreatividade dos anticorpos anti WIP-1, MMP-9 e TIMP-1 foi analisada em cada caso, no parênquima, bem como no estroma imediatamente adjacente. A marcação foi avaliada por meio da porcentagem da área marcada (*pixels* positivos) em relação à área total em cada campo (*pixels* totais), em 5 campos para cada caso. A imunorreatividade de p53 foi analisada por marcações positivas no núcleo das células, contando-se o número de células positivas em relação ao número de células totais, em 5 campos consecutivos. Para todos os marcadores, obteve-se como resultado a média dos valores obtidos nos 5 campos avaliados. Foram consideradas positivas as células que tiveram marcação acastanhada, sendo que os casos que apresentaram >5% marcação foram considerados imunorreativos.

Também foi registrada a média da porcentagem de células positivas ou área marcada em cada grupo, para cada marcador avaliado. Para comparação entre o tipo de glândula avaliada (maior ou menor) e o padrão de expressão dos anticorpos, os casos foram classificados de acordo com a porcentagem de expressão de cada anticorpo, em: expressão negativa ou baixa (<25%), moderada ou alta (>26%) (adaptado de ALVES *et al.*, 2004). Essa análise foi realizada apenas com as neoplasias de glândulas salivares.

6.7 Análise estatística

Após aplicação do teste de normalidade Kolmogorov-Smirnov e a constatação da distribuição anormal dos dados avaliados, optou-se pela realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparar a expressão de cada anticorpo (p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1), com os grupos de casos (GN, AP, CME, CAC e CEAP). Para comparações múltiplas entre os grupos foi utilizado o teste *post hoc* de Dunn. A correlação entre a marcação das proteínas em estudo foi feita por meio da correlação de Spearman, e a comparação dos valores de expressão de acordo com o tipo de glândula afetada, foi realizada com o

teste Qui-quadrado de Pearson. O nível de significância foi estabelecido em $p < 0,05$.

7 RESULTADOS

7.1 Análise dos dados clínicos

Na tabela abaixo (Tabela 1), observa-se a descrição e quantificação das características clínicas dos pacientes com neoplasias de glândulas salivares, benignas e malignas (AP, CME, CAC, CEAP). Para mais informações, verificar o Apêndice 1.

Tabela 1. Parâmetros clínicos avaliados nas neoplasias benignas e malignas.

Características	Glândula normal N= 20	Neoplasias benignas N= 25	Neoplasias malignas N = 21
Sexo			
<i>Masculino</i>	6 (30%)	9 (36%)	9 (42,9%)
<i>Feminino</i>	14 (70%)	16 (64%)	12 (57,1%)
Idade (média)	50,6 anos ± 8,48 anos	42,3 anos ± 27,57 anos	52,4 anos ± 12,72 anos
Diagnóstico			
<i>AP</i>		25 (100%)	
<i>CME</i>	-		8 (38,2%)
<i>CAC</i>			7 (33,3)
<i>CEAP</i>			6 (28,5%)
Localização			
<i>Parótida</i>	1 (5%)	11 (44%)	7 (33,3%)
<i>Submandibular</i>	0	4 (16%)	1 (4,7%)
<i>Sublingual</i>	0	0	3 – (14,1%)
<i>Palato</i>	1 (5%)	6 (24%)	5 (23,8%)
<i>Lábio superior</i>	1 (5%)	2 (8%)	1 (4,7%)
<i>Lábio inferior</i>	14 (70%)	1 (4%)	0
<i>Retromolar</i>	0	0	2 (9,5%)
<i>Mucosa jugal</i>	2 (10%)	1 (4%)	1 (4,7%)
<i>Orofaringe</i>	0	0	1 (4,7%)
Sintomatologia			
<i>Presente</i>	-	4 (16%)	4 (19,1%)
<i>Ausente</i>		20 (80%)	15 (71,4%)
Tempo de evolução			
	-	6,1 anos ± 8,4 anos	6,5 anos ± 4,94 anos CME - 2,6 anos ± 2,8 anos CAC - 2,1 anos ± 5,3 anos CEAP - 17,2 anos ± 7,7 anos
Hábitos deletérios (tabagismo e/ou etilismo)			
<i>Sim</i>		9 (36%)	3 (14,2%)
<i>Não</i>	20 (100%)	8 (32%)	5 (23,8%)

AP- Adenoma pleomórfico, CME - Carcinoma mucoepidermoide, CAC -Carcinoma adenoide cístico, CEAP - Carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

7.2 Análise qualitativa da expressão dos marcadores

7.2.1 p53

A expressão de p53 é predominantemente nuclear. As GN apresentaram, em alguns casos, marcação acastanhada no núcleo das células cilíndricas dos ductos, e leve marcação citoplasmática. O AP apresentou células neoplásicas arranjadas em cordões no interior do estroma com marcação nuclear, localizada em áreas focais, bem como leve marcação citoplasmática. As neoplasias malignas apresentaram como característica predominante a marcação nuclear intensa nas células neoplásicas. No CAC a marcação localizou-se nas células ductais e mioepiteliais presentes nas estruturas tubulares e cribriformes. O CME apresentou marcação de aspecto granular no núcleo das células epidermoides e mucosas e leve marcação citoplasmática, assim como o CEAP, que apresentou marcação nuclear nos lençóis de células epiteliais e mioepiteliais e leve marcação citoplasmática (Figura 2).

p53

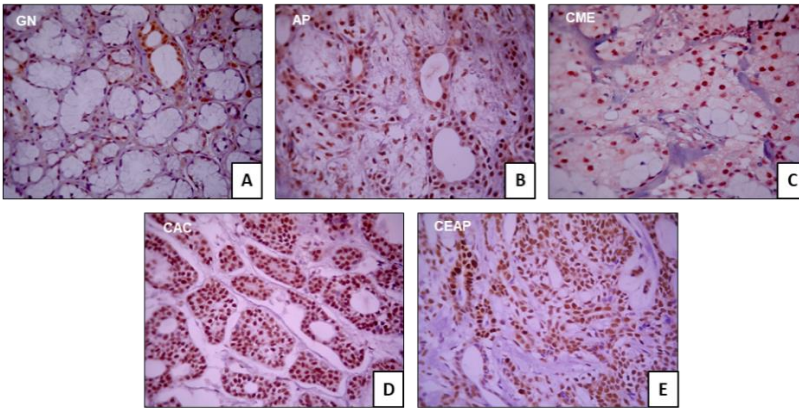


Figura 2. Fotos representativas do padrão de expressão de p53. (A) Glândula salivar normal - marcação acastanhada nos núcleos das células ductais e em células mioepiteliais nas unidades acinares; (B) Adenoma pleomórfico - marcação nuclear e citoplasmática de aspecto granular nas estruturas ductais; (C) Carcinoma mucoepidermoide - marcação de aspecto granular no núcleo das células epidermoides e mucosas e leve marcação citoplasmática; (D) Carcinoma adenoide cístico - marcação nuclear nas células ductais e mioepiteliais nas estruturas tubulares; (E) Carcinoma ex-adenoma pleomórfico - marcação nuclear nos lençóis de células epiteliais e mioepiteliais. H&E, magnificação 400x.

7.2.2 WIP-1

A marcação de WIP-1 é predominantemente citoplasmática, e apresentou nas GN marcação leve nas células dos ductos estriados, leve salpicado no citoplasma das células serosas, além de marcação de coloração acastanhada nas traves de tecido conjuntivo que dividem o parênquima glandular em lóbulos. Já o AP apresentou marcação nuclear em alguns casos, de aspecto granular, nas células das estruturas ductais, bem como nas células mioepiteliais plasmocitoides e de morfologia estrelada no interior do estroma mixoide. O CME mostrou marcação citoplasmática predominante nas células epidermoides e mucosas, porém algumas células, em regiões focais, apresentaram marcação nuclear. O CAC revelou marcação citoplasmática de intensidade moderada nas células ductais e mioepiteliais neoplásicas. O CEAP apresentou marcação citoplasmática nos lençóis de células epiteliais e mioepiteliais, além de núcleos corados em regiões focais (Figura 3).

WIP-1

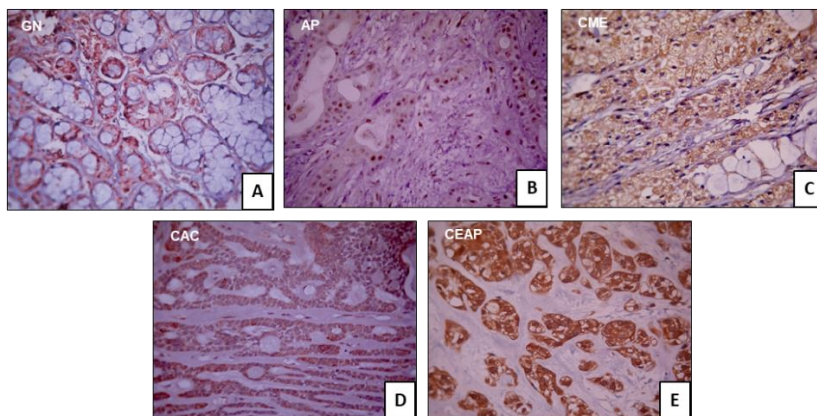


Figura 3. Fotos representativas do padrão de expressão de WIP-1. (A) Glândula salivar normal- marcação leve nas células ductais e no citoplasma das células acinares; (B) Adenoma pleomórfico - marcação nuclear de aspecto granular, nas células das estruturas ductais, bem como nas células mioepiteliais. (C) Carcinoma mucoepidermoide- marcação citoplasmática predominante nas células epidermoides, intermediárias e mucosas; (D) Carcinoma adenoide cístico -marcação citoplasmática de intensidade moderada nas células ductais e mioepiteliais neoplásicas; (E) Carcinoma ex-adenoma pleomórfico - marcação citoplasmática nas células epiteliais e mioepiteliais, além de núcleos corados em regiões focais. H&E, magnificação 400x.

7.2.3 MMP-9

A marcação de MMP-9 é predominantemente citoplasmática. As GN apresentaram, em alguns casos, marcação nuclear acastanhada em poucas células ductais, bem como nas traves de tecido conjuntivo. Os casos de AP apresentaram, em sua maioria, marcação nuclear e citoplasmática nas estruturas ductais, ninhos e ilhas neoplásicas, além das células mioepiteliais no interior do estroma. O CME mostrou marcação citoplasmática nas células epidermoides, intermediárias e mucosas, além de marcação nuclear de aspecto granular. O CAC mostrou alta marcação predominantemente citoplasmática de aspecto granular nas estruturas tubulares e cribriformes. O CEAP mostrou marcação citoplasmática nos lençóis de células neoplásicas (Figura 4).

MMP-9

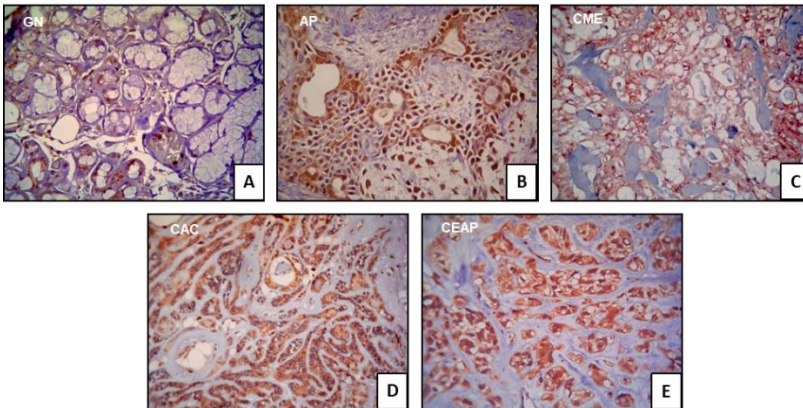


Figura 4. Fotos representativas do padrão de expressão de MMP-9. (A) Glândula salivar normal - marcação nuclear em poucas células ductais; (B) Adenoma pleomórfico - marcação nuclear e citoplasmática nas estruturas ductais, ninhos e ilhas neoplásicas, além das células mioepiteliais no interior do estroma mixoide. (C) Carcinoma mucoepidermoide - marcação citoplasmática nas células epidermoides, intermediárias e mucosas; (D) Carcinoma adenoide cístico - alta marcação predominantemente citoplasmática de aspecto granular nas estruturas tubulares; (E) Carcinoma ex-adenoma pleomórfico - marcação citoplasmática nas células neoplásicas. H&E, magnificação 400x.

7.2.4 TIMP-1

A marcação de TIMP-1 é predominantemente citoplasmática. As GN apresentaram, em poucos casos, leve marcação citoplasmática nas células acinares e marcação acastanhada nas traves de tecidos conjuntivo. O AP apresentou marcação citoplasmática nas células ductais, em regiões focais e nas células mioepiteliais no interior do estroma condroide/mixoide. O CAC mostrou marcação citoplasmática em poucos casos, caracteristicamente em áreas focais nas estruturas ductais. O CME mostrou marcação citoplasmática leve e difusa nas células epidermoides. Já o CEAP mostrou alta marcação citoplasmática nos lençóis de células neoplásicas (Figura 5).

TIMP-1

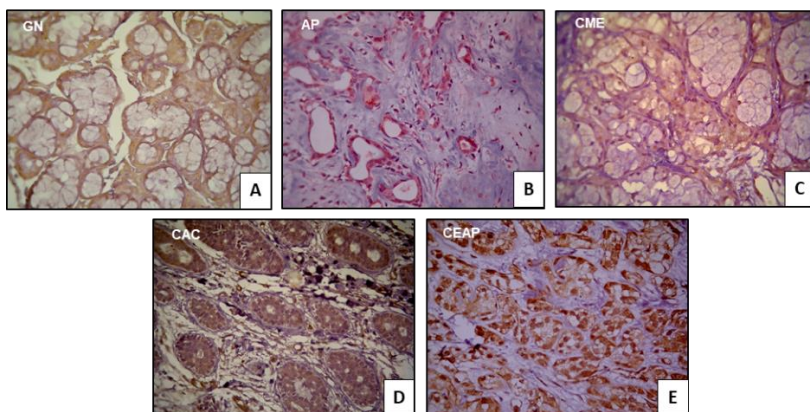


Figura 5. Fotos representativas do padrão de expressão de TIMP-1. (A) Glândula salivar normal- leve marcação citoplasmática nas células acinares e nas traves de tecido conjuntivo; (B) Adenoma pleomórfico - marcação citoplasmática nas células ductais e mioepiteliais neoplásicas; (C) Carcinoma mucoepidermoide - marcação citoplasmática leve e difusa nas células epidermoides; (D) Carcinoma adenoide cístico - marcação citoplasmática nas estruturas ductais; (E) Carcinoma ex-adenoma pleomórfico - alta marcação citoplasmática nas células neoplásicas. H&E, magnificação 400x.

7.3 Análise quantitativa da expressão dos marcadores

A imunorreatividade nos grupos de casos pode ser observada na Tabela 2. A média da porcentagem de células positivas ou área marcada em cada grupo, está representada na Tabela 3. A comparação dos níveis de expressão de cada anticorpo com os grupos de casos está representada na Figura 6.

Tabela 2. Número de casos imunorreativos para cada marcador avaliado (p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1) em cada grupo (GN, AP, CME, CAC e CEAP).

	GN n=20	AP n=25	CME n=8	CAC n=7	CEAP n=6	Total
P53	10 (50%)	23 (92%)	8 (100%)	6 (85%)	6 (100%)	53 (80,3%)
WIP-1	8 (40%)	11 (44%)	7 (87%)	6 (85%)	4 (66%)	36 (54,5%)
MMP-9	14 (70%)	22 (88%)	8 (100%)	7 (100%)	6 (100%)	57 (86,3%)
TIMP-1	6 (30%)	4 (16%)	3 (37,5%)	3 (42,8%)	3 (50%)	19 (28,7%)

AP- Adenoma pleomórfico, CME - Carcinoma mucoepidermoide, CAC - Carcinoma adenoide cístico, CEAP - Carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

Tabela 3. Porcentagem média da expressão dos marcadores (p53, WIP-1, MMP-9 e TIMP-1) em cada grupo avaliado (GN, AP, CME, CAC e CEAP).

	GN	AP	CME	CAC	CEAP
P53	8,98 ± 9,22	24,70 ± 17,36	39,06 ± 12,61	52,31 ± 31,26	42,91 ± 21,38
WIP-1	4,47 ± 4,77	4,76 ± 4,61	14,96 ± 8,33	15,69 ± 6,05	12,31 ± 11,84
MMP-9	13,97 ± 10,05	17,85 ± 9,86	24,86 ± 8,70	32,95 ± 12,29	23,69 ± 6,64
TIMP-1	4,03 ± 5,36	2,08 ± 4,55	3,15 ± 2,38	3,89 ± 1,67	8,57 ± 7,07

AP- Adenoma pleomórfico, CME - Carcinoma mucoepidermoide, CAC - Carcinoma adenoide cístico, CEAP - Carcinoma ex-adenoma pleomórfico. ± desvio-padrão.

7.3.1 p53

Na análise da expressão de p53, houve imunorreatividade numa grande quantidade de casos (77,2%), e predominaram valores moderados de expressão do marcador em todas as neoplasias, enquanto GN apresentou menores valores de expressão. Dessa forma foi observada diferença estatística significativa ($p < 0.005$) quando a expressão proteica do grupo GN foi comparada com AP, CME, CAC e CEAP (Figura 6A).

7.3.2 WIP-1

Na avaliação de WIP-1 observou-se imunorreatividade em 48,4% dos casos, com as neoplasias malignas apresentando valores de expressão maiores para as neoplasias malignas, em comparação com AP e GN. Houve diferença significativa ($p < 0.005$) quando GN foi comparado à CAC e CME e quando o grupo AP foi comparado com CAC. (Figura 6B).

7.3.3 MMP-9

A MMP-9 mostrou imunorreatividade na maioria das amostras (86%) e todas mostraram valores aproximados de expressão. Pode-se observar que houve diferença estatística ($p < 0.005$) na porcentagem de área marcada apenas quando o grupo GN foi comparado com CAC. Além disso, quando se compara AP e CAC, observa-se uma tendência a apresentar diferença na expressão de MMP-9. (Figura 6C).

7.3.4 TIMP-1

O marcador TIMP-1 foi o que mostrou a menor porcentagem de casos marcados (16%), e ainda baixos níveis de expressão do marcador em todos os casos, no entanto foi possível identificar diferença estatística ($p < 0.005$) entre os grupos AP e CEAP. (Figura 6D).

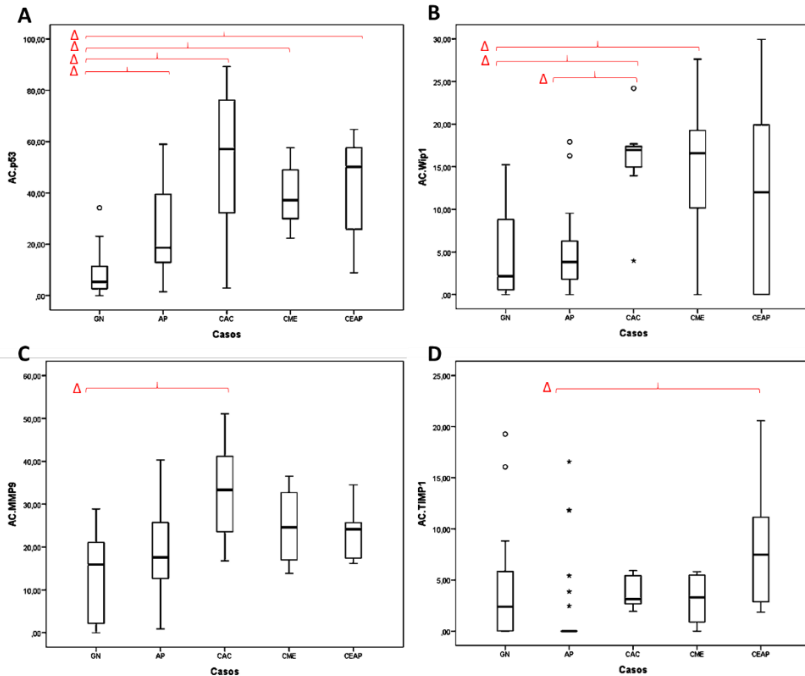


Figura 6. Gráfico Boxplot revelando os níveis de expressão dos marcadores e distribuição dos dados em cada grupo. (A) p53 mostrou diferença estatística entre GN e AP ($p < 0.005$), GN e CME ($p < 0.005$), GN e CAC ($p < 0.005$) e GN e CEAP ($p < 0.005$); (B) WIP-1 mostrou diferença estatística entre GN e CME ($p < 0.005$), GN e CAC ($p < 0.005$), e AP e CAC ($p < 0.005$); (C) MMP-9 mostrou diferença entre GN e CAC ($p < 0.005$); (D) TIMP-1 mostrou diferença estatística entre AP e CEAP ($p < 0.005$). * Outlier, Δ diferença estatística entre dois grupos.

7.4 Correlação entre os marcadores

Através da análise da porcentagem de área ou de células marcadas em cada grupo, observou-se correlação positiva entre os marcadores p53 e WIP-1, p53 e MMP-9, WIP-1 e MMP-9, WIP-1 e TIMP-1, MMP-9 e TIMP-1 (Tabela 4).

Tabela 4. Resultado do teste de correlação de Spearman para cada marcador avaliado.

	p53	WIP-1	MMP-9	TIMP-1
p53	r = 1000	---	---	---
WIP-1	r = 0.448 p = 0.000*	r = 1000	---	---
MMP-9	r = 0.385 p=0.001*	r = 0.553 p = 0.000*	r =1000	---
TIMP-1	r = 0.0159 p = 0.201	r = 0.485 p = 0.000*	r = 0.252 p = 0.041*	r = 1000

r: valor de correlação

*dados estatisticamente significantes (p< 0.05)

7.5 Comparação entre a expressão dos marcadores e o tipo de glândula salivar

Quando agrupadas as neoplasias de glândulas salivares e divididas em grupos conforme a localização, não houve diferença estatística na expressão dos marcadores (Tabela 5).

Tabela 5. Comparação entre a expressão dos marcadores nas neoplasias e o tipo de glândula de salivar acometida.

		NEGATIVA/BAIXA	MODERADA/ALTA	VALOR DE p
P53	1	12 (26%)	13 (28,3%)	0,377
	2	7 (15,2%)	14 (30,4%)	
WIP-1	1	24 (52,1%)	1 (2,1%)	0,543
	2	21 (45,6%)	0	
MMP-9	1	15 (32,6%)	10 (21,7%)	0,541
	2	12 (26%)	9 (19,5%)	
TIMP-1	1	25 (54,3%)	0	-
	2	21 (45,6%)	0	

1 – Glândula maior, 2 – Glândula menor.

8 DISCUSSÃO

O presente estudo abordou a análise imuno-histoquímica de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares em comparação com tecido não-neoplásico. O AP é a neoplasia benigna mais comum, representando aproximadamente 65% de todos os casos, e tem sido alvo de estudos, especialmente pela sua capacidade de transformação maligna (GAO et al., 2017, MARIANO et al., 2016). Os casos de AP avaliados neste estudo mostraram predileção pelo sexo feminino e a idade média foi de 42,3 anos. Estes dados foram compatíveis com a literatura, que mostra a mesma predileção por sexo e a idade média de acometimento entre 30 e 50 anos (LI et al., 2008; GAO et al., 2017; TAKAHAMA JUNIOR; ALMEIDA; KOWALSKI, 2009). As neoplasias malignas também mostraram predileção pelo sexo feminino (57,1%) e a idade média de acometimento foi de 52,4 anos. Normalmente as neoplasias malignas acometem pacientes ligeiramente mais velhos do que as neoplasias benignas, especialmente entre a 6ª e 7ª décadas de vida (ITO et al., 2005; ARAYA et al., 2015).

A escolha dos tipos de neoplasias malignas selecionados para este estudo baseou-se principalmente na frequência encontrada na literatura. O carcinoma mucoepidermoide é o mais frequente, representando aproximadamente 29,6% de todas as neoplasias malignas de glândulas salivares, seguido pelo carcinoma adenoide cístico (28,9%) (GAO et al., 2017). Apesar da quantidade reduzida de casos, encontramos distribuição semelhante dessas duas lesões neste estudo (38,2% e 33,3% respectivamente). O carcinoma ex-adenoma pleomórfico normalmente é o 4º em maior incidência, ficando atrás do adenocarcinoma sem outra especificação (SOE), porém é importante estudar a sua relação com o adenoma pleomórfico, motivo pelo qual foi incluído nesta pesquisa (GAO et al., 2017; LI et al., 2008).

A maioria dos autores concorda que a glândula salivar mais acometida por neoplasias é a parótida (WANG et al., 2015). Neste estudo essa predileção foi encontrada tanto para as neoplasias benignas quanto as malignas. Quando se avaliou separadamente as glândulas salivares menores, o palato mostrou-se como a localização preferencial, o que corrobora com os achados da literatura (GAO et al., 2017; ARAYA et al., 2015, LAISHRAM et al., 2013). Não houve diferença estatística na expressão dos marcadores de acordo com o tipo de glândula afetada, se maior ou menor.

Apresentar sintomatologia dolorosa é um evento incomum em neoplasias benignas, no entanto, pode acontecer devido à compressão de

estruturas nervosas, especialmente quando acometem glândula parótida, em que pode ocorrer compressão do nervo facial, causando dor ou paralisia (UPTON et al., 2007), o que foi observado em quatro casos de AP (16%) deste estudo. Nas neoplasias malignas a sintomatologia é mais frequente, e estava presente em 19,1% dos casos, no entanto, não houve diferença significativa comparando com as neoplasias benignas. A presença de sintomas pode servir como um indicativo de malignidade (CHAU et al., 1986, COMOGLU et al., 2017).

As neoplasias benignas têm como característica um longo tempo de evolução até o diagnóstico, devido ao fato de apresentarem crescimento lento e indolor (JAIN et al., 2015). As neoplasias malignas podem assemelhar-se às benignas, apresentando comportamento clínico indolente (BHAYANI et al., 2012). Neste estudo, o tempo médio de evolução das neoplasias malignas foi de 6,5 anos, maior do que o tempo de evolução das neoplasias benignas (6,1 anos), resultados que diferem da literatura. Estudos mostram tempo de evolução de 4 anos e 11 meses para o AP, e indicam tempo de evolução menor para as neoplasias malignas (OHTAKE et al., 2002; LUNA-ORTIZ et al., 2016).

O CAC apresentou tempo de evolução médio de 2,1 anos, o mesmo encontrado em um estudo realizado na população mexicana (LUNA-ORTIZ et al., 2016). Já para o CME esse período foi de 2,6 anos, menor do que o encontrado em outro estudo (5,6 anos) (CARDOSO et al., 2000). Porém, o CEAP apresentou tempo de evolução médio de 17,2 anos, o que fez com que a média final ficasse elevada nas neoplasias malignas. Isso acontece pelo fato de o CEAP ser precedido pelo AP que, naturalmente, apresenta um longo tempo de evolução, inclusive estudos já mostraram que os APs que apresentam longo período de evolução, ou que recidivam, estão mais sujeitos a transformação maligna (NAGAO et al., 1981). Por outro lado, o CEAP apresenta tempo de evolução que pode variar de um mês até 52 anos (OLSEN; LEWIS, 2001).

De maneira geral, os pacientes com câncer de cabeça e pescoço apresentam alta incidência de abuso de tabaco e álcool, considerados fatores etiológicos de diversos tipos de câncer (TERHAARD et al., 2008). No entanto, parece não existir associação significativa desses hábitos com neoplasias benignas ou malignas de glândulas salivares (MUSCAT; WYNDER, 1998). Os resultados desta pesquisa indicaram que os hábitos deletérios foram mais prevalentes em pacientes com AP do que com neoplasias malignas, porém, os dados estavam disponíveis apenas para uma pequena parte da amostra estudada, dificultando a análise estatística dos resultados. Também deve-se levar em consideração que a radioterapia e a exposição ocupacional a produtos químicos são consideradas fatores

de risco importantes no desenvolvimento de neoplasias malignas de glândulas salivares (RADOI et al., 2018).

A etiopatogênese ainda não está elucidada, bem como os diversos mecanismos envolvidos na tumorigênese das neoplasias de glândulas salivares. Na tentativa de desvendar alguns desses mecanismos, investigou-se, no presente estudo, a expressão imuno-histoquímica de alguns marcadores biológicos. A técnica de imuno-histoquímica é uma ferramenta útil para investigar a natureza celular, padrão de diferenciação, proliferação celular e expressão de proteínas (NAGAO et al., 2012).

Os resultados encontrados neste estudo mostraram imunorreatividade para p53 na maioria das neoplasias (92% das neoplasias benignas e 95% das malignas). Vários estudos analisados encontraram porcentagens menores, especialmente para neoplasias benignas. Faur et al. (2015), avaliando vários tipos de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, obtiveram 39% das neoplasias benignas e 61% das neoplasias malignas positivas para p53, e quanto ao padrão de marcação, as neoplasias benignas apresentaram padrão focal (<5% de imunopositividade) ou regional (5-30% de imunopositividade), enquanto as neoplasias malignas apresentaram padrão regional ou difuso (>50% de imunopositividade) (FAUR et al., 2015). Os dados relativos às neoplasias benignas foram muito semelhantes aos encontrados no nosso estudo, enquanto que o padrão de expressão de p53 das neoplasias malignas foi ligeiramente maior.

A porcentagem de marcação de p53 em AP foi de 24,7%, CME 39%, CAC 52,3% e CEAP 42,9%, enquanto Al-Rawi et al., (2010), observaram nível de expressão de aproximadamente 20% em AP, 35% em CME, 14% em CAC e 8,5% em CEAP (AL-RAWI et al., 2010). Ao avaliar o padrão de expressão de p53 em APs recorrentes, autores observaram valores de expressão maiores quando comparado a APs primários, e sugeriram que p53 possa ter um papel importante na agressividade e progressão tumoral (VÉKONY et al., 2008). Outros autores também apontaram que a alta expressão de p53 em AP está relacionada a maior risco de desenvolver CEAP (OHTAKE et al., 2002).

Porém, os resultados que mais se aproximaram aos encontrados neste estudo foram os de Tarakji et al., (2010), que observaram positividade para p53 em 75,9% dos casos de AP, com marcação de moderada a alta, e positividade para CEAP em 44,4% dos casos, também com marcação moderada a alta. Devido à semelhança no padrão de expressão entre as neoplasias, os autores concluíram que os níveis de expressão de p53 não podem ser usados como um critério para diferenciar AP de CEAP (TARAKJI et al., 2010). No presente estudo também não foi

observada diferença significativa entre esses dois grupos, o que confirma que a análise da expressão de p53 não é um parâmetro eficiente para diferenciar AP e CEAP.

Apesar dos conflitantes resultados encontrados na literatura observa-se, na maioria dos estudos, uma tendência a apresentar índices de p53 maiores em neoplasias malignas do que benignas (KARJA et al., 1997; ALVES et al., 2004; AL-RAWI et al., 2010; FAUR et al., 2015), o que também foi observado no presente estudo. Esses dados podem indicar um potencial de agressividade maior, visto que estudos têm indicado um pior prognóstico para neoplasias malignas de glândulas salivares com alta expressão de p53 (KARJA et al., 1997; LI et al., 2017). Neste estudo, o CAC foi a neoplasia maligna que apresentou a maior expressão de p53, possivelmente refletindo a característica de comportamento agressivo atribuída a ela, visto que comumente está associada a recidivas, metástase e menor sobrevida (COHEN et al., 2004).

Observa-se que os estudos acerca de p53 são difíceis de comparar pois utilizam diferentes técnicas, diluições de anticorpos e métodos de avaliação (ALAIZARI et al., 2015).

Além disso, deve-se considerar que, através de imuno-histoquímica, é detectada principalmente a p53 mutada, que não só perde sua função supressora tumoral, como promove a proliferação celular excessiva, podendo levar à transformação maligna (LI et al., 2017). Essa técnica apresenta alta sensibilidade, porém pouca especificidade, dessa forma, células positivas para p53 não estão mutadas em pelo menos 10% dos casos (LITOFISKY et al., 1997). Achados ocasionais podem ser considerados como estabilização ou acúmulo de proteínas, e não obrigatoriamente mutações (ROSA et al., 1997).

Assim como a p53, WIP-1 tem sido encontrada superexpressa em vários cânceres humanos (LU et al., 2008). Acredita-se que WIP-1 regule negativamente a expressão de p53, por esse motivo a alta expressão de WIP-1 pode ser encontrada em associação a baixa expressão de p53 (YANG et al., 2017). No entanto, esse padrão não foi encontrado no presente estudo, onde foi observada correlação positiva entre os marcadores.

Liang et al., (2012), através de avaliação imuno-histoquímica, observaram alta expressão de p53 e WIP-1 em gliomas, além de co-localização, em linhagens de células de glioblastoma. Os autores sugeriram que WIP-1 juntamente com p53 mutada podem ativar um mecanismo alternativo de progressão tumoral (LIANG et al., 2012). Outros autores também não encontraram diferença importante entre a expressão de WIP-1 e p53, e acreditam que WIP-1 contribua para a

progressão do adenocarcinoma pulmonar através da desfosforilação da p38, que resulta na regulação positiva de EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico) (SATO et al., 2011).

As funções desempenhadas por p53 dependem de múltiplos mecanismos e essa proteína atua sobre várias vias de sinalização (BOEHME; BLATTNER, 2009). Portanto, qualquer alteração genética que tenha impacto sobre proteínas envolvidas com a apoptose, controle do ciclo celular ou reparo aos danos do DNA, é capaz de modular a resposta da p53 ao estresse (HARRIS; LEVINE, 2005). Nesse contexto, pode-se sugerir que, embora WIP-1 não tenha apresentado ação inibitória significativa para p53 em neoplasias de glândulas salivares, pode ter contribuído para a progressão tumoral por outros mecanismos.

Neste estudo observou-se imunorreatividade e média de expressão de WIP-1 maior para tumores malignos do que benignos e glândula normal, indicando uma possível relação do marcador com agressividade tumoral. Estudos já mostraram que a expressão de WIP-1 está relacionada com pior prognóstico e menores taxas de sobrevivência (LIANG et al., 2012; ZHAO M et al., 2016). Quanto ao local de marcação, a expressão de WIP-1 apresentou-se predominantemente no citoplasma das células neoplásicas e, ocasionalmente em núcleos, concordando com os achados da literatura (TANG et al., 2015, LIU et al., 2017).

O estudo de Tang et al., (2015), observou resultados semelhantes ao deste estudo ao mostrar imunorreatividade de WIP-1 em 67,7% dos casos de CAC, e ausência de expressão em glândula salivar normal. Os autores ainda conseguiram associar os níveis elevados de WIP-1 à invasão, recorrência e metástase, sugerindo que possa ser utilizado como um potencial marcador de prognóstico. Além disso, observaram que o silenciamento de WIP-1 reduz a expressão de MMP-9 e VEGF e, conseqüentemente, a migração e invasão. Portanto, WIP-1 atua induzindo a progressão tumoral em CAC (TANG et al., 2015).

Outro estudo em carcinoma nasofaríngeo também demonstrou que WIP-1 tem a capacidade de estimular a atividade da MMP-9 (ZHANG et al., 2014). Os achados da presente pesquisa mostraram valores de correlação positivos na expressão de WIP-1 e MMP-9 ($r = 0.553$), sugerindo que WIP-1 possa estimular a atividade de MMP-9 ou atuar em conjunto na progressão das neoplasias de glândulas salivares, visto que as MMPs desempenham um papel crucial na iniciação e progressão tumoral (CURRAN et al., 1999).

Contribuindo com esses achados, observou-se imunorreatividade para MMP-9 em todas as neoplasias malignas. No entanto, houve

diferença estatística apenas quando o padrão de expressão de GN foi comparado com CAC. Souza-Freitas et al. (2018) encontraram valores altos de expressão para CAC, sugerindo que a MMP-9 possa estar envolvida no comportamento mais agressivo dessas neoplasias (SOUZA-FREITAS et al., 2018). Os resultados da presente pesquisa também suportam essa hipótese.

O fato de não se observar significância estatística na comparação de GN com CME e CEAP, provavelmente se deva aos níveis de MMP-9 que foram observados em GN (13,97%), predominantemente nas células ductais, e que não diferiram muito dos encontrados nas neoplasias. Outros autores também encontraram resultados semelhantes (NAGEL et al., 2004; ZHANG et al., 2009, AZUMA et al., 2000), indicando que as células ductais parecem ser a fonte de MMPs, pois essas também são encontradas na saliva de indivíduos saudáveis (HOQUE et al., 1998).

A imunomarcagem de MMP-9 em casos de AP mostrou-se intensa nas células mioepiteliais. Estudos sugerem que as células mioepiteliais sejam a principal fonte de gelatinases no AP, apresentando um papel crítico na progressão tumoral (ZHANG et al., 2009). Não foi observada diferença estatística quando AP foi comparado com as neoplasias malignas, concordando com outro estudo (NAGEL et al., 2004). Em contrapartida, Tian et al. (2005) encontraram expressão significativamente maior de MMP-2 e MMP-9 em carcinoma de glândula salivar quando comparado com AP, sugerindo que desempenham papel importante na invasão tumoral das neoplasias malignas (TIAN et al., 2005).

Atuando na regulação das MMPs estão os inibidores de metaloproteinases (TIMPs) (JENSEN et al., 2010). Nesta pesquisa não foi observada diferença na expressão de TIMP-1 quando comparadas as neoplasias com GN, provavelmente porque as GN apresentaram marcação significativa de TIMP-1, o que já foi relatado em outros estudos (NAGEL et al., 2004; ZHANG et al., 2009).

No entanto, foi possível observar diferença significativa quando se comparou a expressão de TIMP-1 entre AP e CEAP. De fato, as neoplasias malignas de glândulas salivares normalmente apresentam maior expressão de TIMPs do que as benignas (VERSTAPPEN J; VON DEN HOFF JW, 2006, KAYANO et al., 2004; TIAN et al., 2005). Autores mostram que o aumento de TIMPs em neoplasias malignas pode significar uma tentativa de manter um equilíbrio com as MMPs objetivando controlar a proteólise da matriz extracelular (SOUZA-FREITAS et al., 2018).

Também se observou, neste estudo, correlação positiva entre MMP-9 e seu inibidor TIMP-1, não ficando clara a função inibidora de

TIMP-1 sobre MMP-9. Falcão et al. (2014), por meio de imunofluorescência, encontraram co-localização de MMPs e TIMPs em AP e acreditam que essas proteínas possam combinar forças para modular eventos invasivos em AP (FALCÃO et al., 2014). Sugere-se, ainda, que TIMP-1 estimule a proliferação celular e estabilize as células contra estímulos apoptóticos (WANG et al., 2002). Nesse contexto, pode-se inferir que TIMP-1 contribua juntamente com MMP-9 para a progressão tumoral.

TIMPs também podem agir como supressores tumorais e de metástase (SHI et al., 1999). Percebe-se que tanto as metaloproteinases quanto os seus inibidores apresentam múltiplas funções, e como fazem parte de uma grande família de proteínas, provavelmente interajam com as demais para modular a invasão e progressão tumoral (SONG et al., 2016). Porém, os resultados ainda são escassos e conflitantes e mais estudos são necessários para um melhor entendimento do papel dos TIMPs nas neoplasias de glândulas salivares, bem como a sua relação com as MMPs nessas lesões.

Neste estudo, salientam-se algumas limitações, especialmente relacionadas ao tamanho da amostra e a ausência do bloco cirúrgico para análise histopatológica completa, o que permitiria um estudo mais detalhado das lesões. Apesar das limitações, os resultados encontrados contribuem para o estudo do comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares, um campo que embora seja bastante explorado, ainda não está completamente elucidado.

9 CONCLUSÃO

Diante dos resultados encontrados neste estudo, pode-se sugerir que WIP-1 não atua diretamente na inibição de p53 em neoplasias de glândulas salivares. No entanto, parece contribuir por outros mecanismos para induzir a progressão tumoral, como a estimulação de MMP-9, que atua juntamente com TIMP-1. Além disso, os níveis elevados de expressão de MMP-9 e p53 podem estar associados ao comportamento agressivo do carcinoma adenoide cístico.

REFERÊNCIAS

- AGULNIK, M.; SIU, L. L. An update on the systemic therapy of malignant salivary gland cancers: role of chemotherapy and molecular targeted agents. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, v. 4, n. 6, p. 543-51, Nov 2004.
- ALAIZARI, N. A. et al. p53 expression in pleomorphic adenoma of salivary glands: A systematic review and meta-analysis. *Arch Oral Biol*, v. 60, n. 9, p. 1437-41, Sep 2015.
- ALI, A. Y.; ABEDINI, M. R.; TSANG, B. K. The oncogenic phosphatase PPM1D confers cisplatin resistance in ovarian carcinoma cells by attenuating checkpoint kinase 1 and p53 activation. *Oncogene*, v. 31, n. 17, p. 2175-86, Apr 2012.
- AL-RAWI, N. H.; OMER, H.; AL KAWAS, S. Immunohistochemical analysis of p53 and Bcl-2 in benign and malignant salivary glands tumors. *J Oral Pathol Med*, v. 39, n. 1, p. 48-55, Jan 2010.
- ALTEMANI, A. et al. Carcinoma ex pleomorphic adenoma (CXPA): immunoprofile of the cells involved in carcinomatous progression. *Histopathology*, v.46, n.6, p. 635–641, Jun 2005.
- ALVES, F. A. et al. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 33, n. 6, p. 593-7, Sep 2004.
- ARAÚJO, V. C. et al. Immunohistochemical Mdm2 expression in minor salivary gland tumours and its relationship to p53 gene status. *Oral Oncol*, v. 36, n. 1, p. 67-9, Jan 2000.
- ARAÚJO, V. C. et al. STAT3 expression in salivary gland tumours. *Oral Oncol*, v. 44, n. 5, p. 439-45, May 2008.
- ARAYA, J. et al. Incidence and prevalence of salivary gland tumours in Valparaíso, Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, v. 20, n. 5, p. e532-9, Sep 2015.

AVĀDANEI, R. et al. High variability in MMP2/TIMP2 and MMP9/TIMP1 expression in secondary liver tumors. *Rom J Morphol Embryol*, v. 54, n. 3, p. 479-85, 2013.

AZUMA, M. et al. Suppression of tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase 9 production by the introduction of a super-repressor form of inhibitor of nuclear factor $\kappa\beta$ complementary DNA into immortalized human salivary gland acinar cells. Prevention of the destruction of the acinar structure in Sjogren's syndrome salivary glands. *Arthritis Rheum*, v. 43, n. 8, p. 1756-67, Aug 2000.

BEHBOUDI, A. et al. Molecular classification of mucoepidermoid carcinomas-prognostic significance of the MECT1-MAML2 fusion oncogene. *Genes Chromosomes Cancer*, v. 45, n. 5, p. 470-81, May 2006.

BELL, D.; HANNA, E. Y. Salivary gland cancers: biology and molecular targets for therapy. *Curr Oncol Rep*, v. 14, n. 2, p. 166-74, Apr 2012.

BHAYANI, M. K. et al. Prognosis and risk factors for early-stage adenoid cystic carcinoma of the major salivary glands. *Cancer*, v. 118, n. 11, p. 2872-8, Jun 2012.

BOEHME, K. A.; BLATTNER, C. Regulation of p53--insights into a complex process. *Crit Rev Biochem Mol Biol*, v. 44, n. 6, p. 367-92, Nov-Dec 2009.

BRANDWEIN, M. S. et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol*, v. 25, n. 7, p. 835-45, Jul 2001.

BREW, K.; NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. *Biochim Biophys Acta*, v. 1803, n. 1, p. 55-71, Jan 2010.

BUCHNER, A.; MERRELL, P. W.; CARPENTER, W. M. Relative frequency of intra-oral minor salivary gland tumors: a study of 380 cases from northern California and comparison to reports from other parts of the world. *J Oral Pathol Med*, v. 36, n. 4, p. 207-14, Apr 2007.

BULAVIN, D. V. et al. Inactivation of the Wip1 phosphatase inhibits mammary tumorigenesis through p38 MAPK-mediated activation of the p16(Ink4a)-p19(Arf) pathway. *Nat Genet*, v. 36, n. 4, p. 343-50, Apr 2004.

CARDOSO, S. V. et al. Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. *BMC Cancer*, v. 9, p. 391, 2009.

CARDOSO, W. P. et al. Proliferating cell nuclear antigen expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *Sao Paulo Med J*, v. 118, n. 3, p. 69-74, May 2000.

CHAU, M. N.; RADDEN, B. G. Intra-oral salivary gland neoplasms: a retrospective study of 98 cases. *J Oral Pathol*, v. 15, n. 6, p. 339-42, 1986.

COHEN, A. N. et al. Adenoid cystic carcinoma of the submandibular gland: a 35-year review. *Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 131, n. 6, p. 994-1000, Dec 2004.

COMOGLU, S. et al. Comprehensive analysis of parotid mass: A retrospective study of 369 cases. *Auris Nasus Larynx*, May 2017.

CREEMERS, E. E. et al. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*, v. 89, n. 3, p. 201-10, Aug 2001.

CURRAN, S.; MURRAY, G. I. Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*, v. 189, n. 3, p. 300-8, Nov 1999.

DEMIDOV, O. N. et al. Wip1 phosphatase regulates p53-dependent apoptosis of stem cells and tumorigenesis in the mouse intestine. *Cell Stem Cell*, v. 1, n. 2, p. 180-90, Aug 2007.

DEMIDOV, O. N. et al. Wip1, an oncogene targeting tumor suppressors expressed in intestinal stem cells. *Current Colorectal Cancer Reports*, v. 5, n. 4, p. 197-202, October 2009.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. *Nat Rev Cancer*, v. 2, n. 3, p. 161-74, Mar 2002.

ELABD, S.; MERONI, G.; BLATTNER, C. TRIMming p53's anticancer activity. *Oncogene*, v.35, n.43, p.5577-84, 2016.

ELLIS, GL.; AUCLAIR, P. Tumors of Salivary Glands. In: Armed Forces Institute of Pathology, Atlas of Tumor Pathology, Fascicle 17; v.3, n.26, p. 155-75, 1996.

EL-NAGGAR, A. K. et al. Tumours of salivary glands. In: EL-NAGGAR, A. K. World Health Organization. Classification of Head and Neck Tumours. 4th edition. Lyon: IARC, 2017.

EMELYANOV, A.; BULAVIN, D. V. Wip1 phosphatase in breast cancer. *Oncogene*, v. 34, n. 34, p. 4429-38, Aug 2014.

EVESON, J.W et al. Tumours of the salivary glands. In: BARNES, L. et al. World Health Organization. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 3th edition. Lyon: IARC, 2005.

FALCÃO, A. S. et al. A novel cell line derived from pleomorphic adenoma expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and shows numeric chromosomal anomalies. *PLoS One*, v. 9, n. 8, p. e105231, 2014.

FAUR, A. C. et al. Ki-67 and p53 immunostaining assessment of proliferative activity in salivary tumors. *Rom J Morphol Embryol*, v. 56, n. 4, p. 1429-39, 2015.

FRIERSON, H. F. et al. Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol*, v. 161, n. 4, p. 1315-23, Oct 2002.

FURUSE, C. et al. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol*, v. 13, n. 1, p. 57-65, Jan 2005.

GAO, M. et al. Salivary gland tumours in a northern Chinese population: a 50-year retrospective study of 7190 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 46, n. 3, p. 343-349, Mar 2017.

GOLOUDINA, A. R. et al. Wip1 phosphatase: between p53 and MAPK kinases pathways. *Oncotarget*, v. 7, n. 21, p. 31563-71, May 2016.

GOMES, C. C. et al. Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms. *PLoS One*, v. 7, n. 7, p. e41261, 2012.

GOMEZ, D. E. et al. Tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, regulation and biological functions. *Eur J Cell Biol*, v. 74, n. 2, p. 111-22, Oct 1997.

HARRIS, S. L.; LEVINE, A. J. The p53 pathway: positive and negative feedback loops. *Oncogene*, v. 24, n. 17, p. 2899-908, Apr 2005.

HICKS, J.; FLAITZ, C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. *Oral Oncol*, v. 36, n. 5, p. 454-60, Sep 2000.

HIDALGO, M.; ECKHARDT, S. G. Development of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer therapy. *J Natl Cancer Inst*, v. 93, n. 3, p. 178-93, Feb 2001.

HOQUE, M. O.; AZUMA, M.; SATO, M. Significant correlation between matrix metalloproteinase activity and tumor necrosis factor-alpha in salivary extravasation mucoceles. *J Oral Pathol Med*, v. 27, n. 1, p. 30-3, Jan 1998.

HUA, H. et al. Matrix metalloproteinases in tumorigenesis: an evolving paradigm. *Cell Mol Life Sci*, v. 68, n. 23, p. 3853-68, Dec 2011.

ITO, F. A. et al. Salivary tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*, v. 34, n. 5, p. 533-6, Jul 2005.

JAIN, S. et al. Pleomorphic Adenoma of the Parotid Gland: Report of a Case With Review of Literature. *Ethiop J Health Sci*, v. 25, n. 2, p. 189-94, Apr 2015.

JENSEN, S. A. et al. Expression of matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinases 1 (TIMP-1) by colorectal

cancer cells and adjacent stroma cells--associations with histopathology and patients outcome. *Eur J Cancer*, v. 46, n. 18, p. 3233-42, Dec 2010.

KARJA, V. J. et al. Expression and mutations of p53 in salivary gland tumours. *J Oral Pathol Med*, v. 26, n. 5, p. 217-23, May 1997.

KATABI, N. et al. Prognostic factors of recurrence in salivary carcinoma ex pleomorphic adenoma, with emphasis on the carcinoma histologic subtype: a clinicopathologic study of 43 cases. *Hum Pathol*, v. 41, n. 7, p. 927-34, Jul 2010.

KAYANO, K. et al. Activation of pro-MMP-2 mediated by MT1-MMP in human salivary gland carcinomas: possible regulation of pro-MMP-2 activation by TIMP-2. *J Pathol*, v. 202, n. 4, p. 403-11, Apr 2004.

KONG, W.; JIANG, X.; MERCER, W. E. Downregulation of Wip-1 phosphatase expression in MCF-7 breast cancer cells enhances doxorubicin-induced apoptosis through p53-mediated transcriptional activation of Bax. *Cancer Biol Ther*, v. 8, n. 6, p. 555-63, Mar 2009.

LAISHRAM, R. S. et al. Pattern of salivary gland tumors in Manipur, India: A 10 year study. *South Asian J Cancer*, v. 2, n. 4, p. 250-3, Oct 2013.

LEVERSTEIN, H. et al. Surgical management of 246 previously untreated pleomorphic adenomas of the parotid gland. *Br J Surg*, v. 84, n. 3, p. 399-403, Mar 1997.

LI, L.J. et al. Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. *Oral Oncol*, v. 44, n. 2, p. 187-92, 2008.

LI, Q. et al. Prognostic significance of p53 immunohistochemical expression in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a meta-analysis. *Oncotarget*, v. 8, n. 17, p. 29458-29473, Apr 2017.

LIANG, C. et al. Over-expression of wild-type p53-induced phosphatase 1 confers poor prognosis of patients with gliomas. *Brain Res*, v. 1444, p. 65-75, Mar 2012.

LIMA, M.D.M. et al. MDM2, P53, P21WAF1 and pAKT protein levels in genesis and behaviour of adenoid cystic carcinoma. *Cancer Epidemiol*, v. 33, n. 2, p. 142-6, Aug 2009.

LITOFISKY, N. S.; RECHT, L. D. The impact of p53 tumor suppressor gene on glioma biology. *Neurosurg Focus*, v. 3, n. 3, p. e4, Sep 15 1997.

LIU, S. et al. Wip1 is associated with tumorigenity and metastasis through MMP-2 in human intrahepatic cholangiocarcinoma. *Oncotarget*, v. 8, n. 34, p. 56672-56683, Aug 2017.

LU, X. et al. The type 2C phosphatase Wip1: an oncogenic regulator of tumor suppressor and DNA damage response pathways. *Cancer Metastasis Rev*, v. 27, n. 2, p. 123-35, Jun 2008.

LUNA-ORTIZ, K. et al. Adenoid Cystic Carcinoma in a Mexican Population. *J Maxillofac Oral Surg*, v. 15, n. 2, p. 236-42, Jun 2016.

LUUKKAA, H. et al. Salivary gland cancer in Finland 1991--96: an evaluation of 237 cases. *Acta Otolaryngol*, v. 125, n. 2, p. 207-14, Feb 2005.

MARIANO, F. V. et al. Evaluation of a subset of tumor suppressor gene for copy number and epigenetic changes in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma carcinogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, v. 122, n. 3, p. 322-31, Sep 2016.

MATIZONKAS-ANTONIO, L. F. et al. TP53 mutations in salivary gland neoplasms. *Braz Dent J*, v. 16, n. 2, p. 162-6, 2005.

MATT, S.; HOFMANN, T. G. The DNA damage-induced cell death response: a roadmap to kill cancer cells. *Cell Mol Life Sci*, Jan 2016.

MESZAROS, E.; MALEMUD, C. J. Prospects for treating osteoarthritis: enzyme-protein interactions regulating matrix metalloproteinase activity. *Ther Adv Chronic Dis*, v. 3, n. 5, p. 219-29, Sep 2012.

MIYAKE, H. et al. Significance of circulating matrix metalloproteinase-9 to tissue inhibitor of metalloproteinases-2 ratio as a predictor of disease progression in patients with metastatic renal cell

carcinoma receiving sunitinib. *Urol Oncol*, v. 32, n. 5, p. 584-8, Jul 2014.

MOGHADAM, S. A.; ABADI, A. M.; MOKHTARI, S. Immunohistochemical analysis of CD34 expression in salivary gland tumors. *J Oral Maxillofac Pathol*, v. 19, n. 1, p. 30-3, Jan-Apr 2015.

MONTGOMERY, A. M. et al. Effect of tissue inhibitor of the matrix metalloproteinases-2 expression on the growth and spontaneous metastasis of a human melanoma cell line. *Cancer Res*, v. 54, n. 20, p. 5467-73, Oct 1994.

MURRAY, G. I. et al. Matrix metalloproteinase-1 is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Nat Med*, v. 2, n. 4, p. 461-2, Apr 1996.

MUSCAT, J. E.; WYNDER, E. L. A case/control study of risk factors for major salivary gland cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 118, n. 2, p. 195-8, Feb 1998.

NAGAO, K. et al. Histopathologic studies on carcinoma in pleomorphic adenoma of the parotid gland. *Cancer*, v. 48, n. 1, p. 113-21, Jul 1981.

NAGAO, T. et al. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. *Acta Histochem Cytochem*, v. 45, n. 5, p. 269-82, Oct 2012.

NAGEL, H. et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathology*, v. 44, n. 3, p. 222-31, Mar 2004.

NAMBOODIRIPAD, P. C. A review: Immunological markers for malignant salivary gland tumors. *J Oral Biol Craniofac Res*, v. 4, n. 2, p. 127-34, May-Aug 2014.

NAVARINI, N. F. et al. The EGF signaling pathway influences cell migration and the secretion of metalloproteinases by myoepithelial cells in pleomorphic adenoma. *Tumour Biol*, v. 36, n. 1, p. 205-11, Jan 2015.

NORDKVIST, A. et al. Expression and mutation patterns of p53 in benign and malignant salivary gland tumors. *Int J Oncol*, v. 16, n. 3, p. 477-83, Mar 2000.

OHTAKE, S. et al. Precancerous foci in pleomorphic adenoma of the salivary gland: recognition of focal carcinoma and atypical tumor cells by P53 immunohistochemistry. *J Oral Pathol Med*, v. 31, n. 10, p. 590-7, Nov 2002.

OLSEN, K. D.; LEWIS, J. E. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review. *Head Neck*, v. 23, n. 9, p. 705-12, Sep 2001.

PATEL, B. P. et al. Activation of MMP-2 and MMP-9 in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Surg Oncol*, v. 90, n. 2, p. 81-8, May 2005.

PIAO, S. et al. Increased expression of CD147 and MMP-9 is correlated with poor prognosis of salivary duct carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*, v. 138, n. 4, p. 627-35, Apr 2012.

RADOI, L. et al. Risk factors for salivary gland cancers in France: Results from a case-control study, the ICARE study. *Oral Oncol*, v. 80, p. 56-63, May 2018.

RAPIDIS, A. D. et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol*, v. 43, n. 2, p. 130-6, Feb 2007.

RICHTER, M. et al. WIP1 phosphatase as a potential therapeutic target in neuroblastoma. *PLoS One*, v. 10, n. 2, p. e0115635, 2015.

ROSA, J. C. et al. Immunoexpression of c-erbB-2 and p53 in benign and malignant salivary neoplasms with myoepithelial differentiation. *J Clin Pathol*, v. 50, n. 8, p. 661-3, Aug 1997.

RUOKOLAINEN, H.; PÄÄKKÖ, P.; TURPEENNIEMI-HUJANEN, T. Expression of matrix metalloproteinase-9 in head and neck squamous cell carcinoma: a potential marker for prognosis. *Clin Cancer Res*, v. 10, n. 9, p. 3110-6, May 2004.

SATOH, N. et al. Oncogenic phosphatase Wip1 is a novel prognostic marker for lung adenocarcinoma patient survival. *Cancer Sci*, v. 102, n. 5, p. 1101-6, May 2011.

SHI, Y. et al. Tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) mRNA is elevated in advanced stages of thyroid carcinoma. *Br J Cancer*, v. 79, n. 7-8, p. 1234-9, Mar 1999.

SHORTT, J.; JOHNSTONE, R. W. Oncogenes in cell survival and cell death. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, v. 4, n. 12, Dec 2012.

SONG, G. et al. TIMP1 is a prognostic marker for the progression and metastasis of colon cancer through FAK-PI3K/AKT and MAPK pathway. *J Exp Clin Cancer Res*, v. 35, n. 1, p. 148, Sep 2016.

SOUZA-FREITAS, V. et al. Expression of matrix metalloproteinases (MMPs-2, -7, -9, and -26) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs-1 and -2) in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, v. 275, n. 12, p. 3075-3082, Dec 2018.

STERNLICHT, M. D.; WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu Rev Cell Dev Biol*, v. 17, p. 463-516, 2001.

SUN, Q. et al. High expression of matrix metalloproteinase-9 indicates poor prognosis in human hilar cholangiocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*, v. 7, n. 9, p. 6157-64, 2014.

SURAKANTI, S. G.; AGULNIK, M. Salivary gland malignancies: the role for chemotherapy and molecular targeted agents. *Semin Oncol*, v. 35, n. 3, p. 309-19, Jun 2008.

TADBIR, A. A. et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*, v. 13, n. 10, p. 5155-9, 2012.

TAKAHAMA JUNIOR, A.; ALMEIDA, O. P.; KOWALSKI, L. P. Parotid neoplasms: analysis of 600 patients attended at a single institution. *Braz J Otorhinolaryngol*, v. 75, n. 4, p. 497-501, 2009 Jul-Aug 2009.

TANG, Y. L. et al. WIP1 stimulates migration and invasion of salivary adenoid cystic carcinoma by inducing MMP-9 and VEGF-C. *Oncotarget*, v. 6, n. 11, p. 9031-44, Apr 2015.

TARAKJI, B.; KUJAN, O.; NASSANI, M. Z. Immunohistochemical Expression of p53 in Pleomorphic Adenoma and Carcinoma Ex Pleomorphic Adenoma. *J Cancer Epidemiol*, v. 2010, p. 250606, 2010.

TERHAARD, C. H. et al. The prognostic role of comorbidity in salivary gland carcinoma. *Cancer*, v. 113, n. 7, p. 1572-9, Oct 2008.

TIAN, K. et al. Relationship of the Disturbed Balance between Matrix Metalloproteinases and their Tissue Inhibitors and the Invasion of Malignant Salivary Gland Tumours. *West China Journal of Stomatology*, v. 23, n. 04, p. 273-276, 2005.

TISATO, V. et al. MDM2/X inhibitors under clinical evaluation: perspectives for the management of hematological malignancies and pediatric cancer. *J Hematol Oncol*, v. 10, n. 1, p. 133, Jul 2017.

UPTON, D. C. et al. Parotidectomy: ten-year review of 237 cases at a single institution. *Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 136, n. 5, p. 788-92, May 2007.

VAN MAERKEN, T. et al. Escape from p53-mediated tumor surveillance in neuroblastoma: switching off the p14(ARF)-MDM2-p53 axis. *Cell Death Differ*, v. 16, n. 12, p. 1563-72, Dec 2009.

VEKONY, H. et al. Deregulated expression of p16INK4a and p53 pathway members in benign and malignant myoepithelial tumours of the salivary glands. *Histopathology*, v. 53, n. 6, p. 658-66, Dec 2008.

VERSTAPPEN, J.; VON DEN HOFF, J. W. Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): their biological functions and involvement in oral disease. *J Dent Res*, v. 85, n. 12, p. 1074-84, Dec 2006.

VISSE, R.; NAGASE, H. Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. *Circ Res*, v. 92, n. 8, p. 827-39, May 2003.

WANG, T. et al. Both tissue inhibitors of metalloproteinases-1 (TIMP-1) and TIMP-2 activate Ras but through different pathways. *Biochem Biophys Res Commun*, v. 296, n. 1, p. 201-5, Aug 2002.

WANG, X. D. et al. Tumours of the salivary glands in northeastern China: a retrospective study of 2508 patients. *Br J Oral Maxillofac Surg*, v. 53, n. 2, p. 132-7, Feb 2015.

WEBER, A. et al. Expression profiles of p53, p63, and p73 in benign salivary gland tumors. *Virchows Arch*, v. 441, n. 5, p. 428-36, Nov 2002.

WURTZ, S. O. et al. Plasma and serum levels of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 are associated with prognosis in node-negative breast cancer: a prospective study. *Mol Cell Proteomics*, v. 7, n. 2, p. 424-30, Feb 2008.

YANG, S. et al. Clinical significance of Wip1 overexpression and its association with the p38MAPK/p53/p16 pathway in NSCLC. *Mol Med Rep*, v. 15, n. 2, p. 719-723, Feb 2017.

ZHANG, X. et al. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathology*, v. 55, n. 3, p. 250-60, Sep 2009.

ZHANG, Y. et al. WIP1 regulates the proliferation and invasion of nasopharyngeal carcinoma in vitro. *Tumour Biol*, v. 35, n. 8, p. 7651-7, Aug 2014.

ZHAO, J. et al. Prognostic factors affecting the clinical outcome of carcinoma ex pleomorphic adenoma in the major salivary gland. *World J Surg Oncol*, v. 11, n. 1, p. 180, Aug 8 2013.

ZHAO, L. et al. Expression of SKA1 and MMP-9 in primary salivary adenoid cystic carcinoma: Correlation with tumor progression and patient prognosis. *Acta Otolaryngol*, v. 136, n. 6, p. 575-9, Jun 2016.

ZHAO, M. et al. Association between overexpression of Wip1 and prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett*, v. 11, n. 4, p. 2365-2370, Apr 2016.

ZHENG, W. Y. et al. Elevated Matrix Metalloproteinase-9 Expression Correlates with Advanced Stages of Oral Cancer and Is Linked to Poor Clinical Outcomes. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 73, n. 12, p. 2334-42, Dec 2015.

ZHU, S.; SCHUERCH, C.; HUNT, J. Review and updates of immunohistochemistry in selected salivary gland and head and neck tumors. *Arch Pathol Lab Med*, v. 139, n. 1, p. 55-66, Jan 2015.

ZHU, Y. H.; BULAVIN, D. V. Wip1-dependent signaling pathways in health and diseases. *Prog Mol Biol Transl Sci*, v. 106, p. 307-25, 2012.

APÊNDICE A – Dados clínicos complementares

A tabela abaixo apresenta detalhadamente as informações clínicas referentes a cada caso avaliado nesse estudo.

	Sexo	Idade	Diagnóstico	Tipo de glândula	Hábitos deletérios	Sintomatologia	Tam. (cm)	Evolução
1	F	39	GN	Maior	Não	Não	-	-
2	F	25	GN	Menor	Não	Não	-	-
3	F	28	GN	Maior	Não	Não	-	-
4	M	41	GN	Menor	Não	Não	-	-
5	F	49	GN	Menor	Não	Não	-	-
6	F	70	GN	Menor	Não	Não	-	-
7	F	64	GN	Menor	Não	Não	-	-
8	M	31	GN	Menor	Não	Não	-	-
9	M	61	GN	Menor	Não	Não	-	-
10	F	77	GN	Menor	Não	Não	-	-
11	F	52	GN	Menor	Não	Não	-	-
12	F	61	GN	Menor	Não	Não	-	-
13	F	68	GN	Menor	Não	Não	-	-
14	M	21	GN	Menor	Não	Não	-	-
15	F	50	GN	Menor	Não	Não	-	-
16	F	58	GN	Menor	Não	Não	-	-
17	M	34	GN	Menor	Não	Não	-	-
18	F	71	GN	Menor	Não	Não	-	-
19	F	61	GN	Menor	Não	Não	-	-
20	M	51	GN	Menor	Não	Não	-	-
21	M	29	AP	Maior	Tabagista	Não	-	3
22	F	26	AP	Maior	Tabagista	Sim	-	4
23	M	55	AP	Maior	-	Não	2	2
24	M	44	AP	Maior	Tabagista	Não	5	10
25	M	61	AP	Maior	Etilista	Não	-	6
26	F	32	AP	Maior	-	-	-	8
27	F	54	AP	Maior	-	Sim	8	20
28	F	16	AP	Maior	-	Não	-	1
29	F	43	AP	Maior	Tabagista	Não	4	2
30	F	34	AP	Maior	-	Sim	3	3
31	F	38	AP	Maior	-	Não	4	2
32	F	44	AP	Maior	Não	Não	3	13
33	M	38	AP	Menor	Não	Não	-	-
34	F	72	AP	Menor	Não	Não	1,5	1

35	F	26	AP	Menor	Não	Não	-	10
36	F	32	AP	Menor	Não	Não	2,5	10
37	M	37	AP	Menor	Etilista	Sim	1	2
38	F	65	AP	Menor	Não	Não	1,5	0,5
39	F	76	AP	Menor	Não	Não	1,5	-
40	F	68	AP	Menor	Tabagista	Não	2	0,5
41	F	38	AP	Menor	Não	Não	1,5	10
42	M	34	AP	Menor	-	Não	1	3
43	M	27	AP	Maior	-	Não	4	5
44	M	30	AP	Maior	Tabagista	Não	4	10
45	F	39	AP	Maior	Tabagista	Não	1,4	15
46	F	73	CAC	Maior	Não	Não	4	8
47	M	48	CAC	Maior	-	Não	-	4
48	M	75	CAC	Maior	-	Não	-	0,3
49	M	32	CAC	Menor	-	Sim	-	1
50	F	48	CAC	Menor	Não	Sim	2	0,5
51	F	48	CAC	Menor	-	Sim	2	0,4
52	F	51	CAC	Menor	Não	Não	-	0,5
53	M	33	CME	Maior	-	-	-	-
54	F	56	CME	Menor	-	Não	-	-
55	M	25	CME	Menor	-	Não	1	5
56	F	-	CME	Maior	-	-	-	-
57	F	60	CME	Menor	-	Não	-	-
58	M	43	CME	Menor	Não	Não	1,2	2
59	F	85	CME	Menor	-	Sim	-	-
60	F	14	CME	Maior	Não	Não	3	1
61	M	29	CEAP	Maior	Etilista	Não	4	4
62	F	47	CEAP	Maior	-	Não	4	20
63	M	72	CEAP	Maior	Tabagista	Não	8	30
64	F	85	CEAP	Maior	-	Não	-	15
65	F	61	CEAP	Menor	Tabagista	Não	-	-
66	M	55	CEAP	Menor	-	Não	4	-

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo do comportamento biológico de tumores benignos e malignos de glândulas salivares

Pesquisador: Elena Riet Correa Rivero

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 57274016.2.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.657.413

Apresentação do Projeto:

"Estudo do comportamento biológico de tumores benignos e malignos de glândulas salivares". As alterações do estroma e sua influência no desenvolvimento e progressão dos tumores de glândulas ainda são pouco abordadas na literatura da área. Desta forma, este estudo pretende contribuir para um melhor entendimento sobre o crescimento infiltrativo de tumores de glândulas salivares, por meio da avaliação de proteínas envolvidas no processo de proliferação das células neoplásicas e associação com a interação parênquima/estroma, no mecanismo de crescimento e invasão dessas lesões.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico das neoplasias de glândulas salivares, especialmente o AP, CEAP, CME e CAC, por meio do estudo das interações parênquima/estroma nos mecanismos de crescimento e invasão tumoral.

Objetivos Secundários:

1- Promover um levantamento dos laudos histopatológicos de todos os casos de tumores de glândulas salivares diagnosticados pelo Laboratório de Patologia Bucal da UFSC (LPB-UFSC) e pelo

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.657.413

Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário (SAP/HU-UFSC);

- 2- Proceder a avaliação histológica dos casos selecionados e classificar os tumores de acordo com os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde;
- 3- Investigar a presença de fibroblastos senescentes, por meio de marcadores de senescência celular (p16 e beta galactosidase), assim como por meio de marcadores de FAC (podoplanina), no estroma de AP, CEAP, CAC e CME;
- 4- Investigar a expressão de caveolina-1 e osteopontina nos tumores;
- 5- Investigar o balanço entre as MMPs e seus reguladores (TIMP) no mecanismo de invasão tumoral;
- 6- Estabelecer o índice de proliferação epitelial, por meio da marcação do antígeno Ki-67; 7- Analisar o padrão de expressão imuno-histoquímica das proteínas p53 e Wip-1 nos tumores;
- 8- Comparar a expressão das proteínas entre os tumores;
- 9- Fazer a correlação das proteínas em estudo;
- 10- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Uma vez que será utilizado material de arquivo, o único risco desta pesquisa seria a perda do anonimato, porém, é compromisso veemente dos pesquisadores envolvidos manter o sigilo sobre a identidade dos participantes.

Benefícios:

As interações parênquima/estroma no mecanismo de invasão dos tumores de glândulas salivares ainda são pouco abordadas na literatura da área. Como resultado, ainda existem lacunas importantes na compreensão do comportamento biológico dessas neoplasias, especialmente no que diz respeito aos mecanismos de crescimento e invasão. O conhecimento detalhado dos mecanismos de invasão dessas lesões poderá possibilitar o estabelecimento de terapias ativas menos invasivas, melhorando dessa forma a vida dos pacientes que apresentam essas lesões.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata o presente de um projeto de pesquisa da Profa. Dra. Elena Riet Correa Rivero vinculado à linha de pesquisa "Estudos dos eventos celulares e moleculares envolvidos nos processos fisiológicos e patológicos de interesse para a Odontologia", do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC. Este estudo envolverá dois Serviços de diagnóstico relacionados ao SUS:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade CEP: 88.040-400
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.657.413

Ambulatório de Estomatologia da HU e Laboratório de Patologia Bucal da UFSC. O desenvolvimento deste projeto visa contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico de tumores de glândulas salivares, especialmente o AP, CEAP, CME e CAC, por meio do estudo das interações parênquima/estroma nos mecanismos de crescimento e invasão tumoral. Espera-se, por meio do estudo minucioso dos mecanismos de invasão dessas lesões, contribuir com os conhecimentos da área, possibilitando, em um futuro próximo, modalidades terapêuticas menos agressivas para os pacientes que apresentam essas lesões. O estudo tem relevância científica, a documentação está completa e TCLE apresentado atende na íntegra a Resolução CNS nº466/12 e normas complementares. Assim, recomendamos a sua aprovação.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Documentação completa.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não foram detectadas pendências ou inadequações neste projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_742508.pdf	22/06/2016 16:05:10		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoDaInstituicao.pdf	22/06/2016 16:04:51	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoDePesquisa.pdf	20/06/2016 15:49:15	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	20/06/2016 15:48:57	Elena Riet Correa Rivero	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRostoAssinada.pdf	20/06/2016 15:46:36	Elena Riet Correa Rivero	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.657.413

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 01 de Agosto de 2016

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br