

**APOPTOSE NAS GLÂNDULAS SALIVARES  
HUMANAS: AVALIAÇÃO DE MARCADORES NO  
PROCESSO DE TUMORIGÊNESE DA GLÂNDULA  
UTILIZANDO COMO MODELOS O ADENOMA  
PLEOMÓRFICO E O CARCINOMA  
MUCOEPIDERMÓIDE**

**GABRIELA MADUREIRA DA SILVA**

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio  
Prudente para obtenção do título de Mestre  
em Ciências**

**Área de Concentração: Oncologia**

**Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho  
Camillo**

**Co-Orientadora: Dra. Silvia Vanessa Lourenço**

**São Paulo**

**2016**

## FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Silva, Gabriela Madureira da

**Apoptose nas glândulas salivares humanas: avaliação de marcadores no processo de tumorigênese da glândula utilizando como modelos adenoma pleomórfico e o carcinoma mucoepidermóide / Gabriela Madureira da Silva – São Paulo, 2016.**

65p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. APOPTOSE. 2. GLÂNDULAS SALIVARES. 3. ADENOMA PLEOMORFO. 4. CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE. 5. BIOMARCADORES TUMORAIS

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe e a minha avó, que são os maiores exemplos de mulheres guerreiras, batalhadoras e de caráter, onde me espelho para ser metade do que elas são, elas que me inspiram a ser independente, de caráter e humana. Dedico também este trabalho a minha orientadora Dra. Cláudia, que sempre esteve a disposição para o que precisasse, que é uma pessoa fantástica, na qual tenho admiração.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar saúde.

Agradeço a minha mãe por tudo o que ela é e representa na minha vida, o quanto me ajuda e pelo bom exemplo que sempre me deu.

Agradeço a minha Avó, por ser a melhor vovó do mundo, não tenho palavras para descreve-la.

Agradeço a Dra Cláudia por me orientar e me ensinar muitas coisas, pela paciência e atenção.

Agradeço a Dra Silvia por me orientar durante esse período de convivência.

Agradeço ao meu namorado Rodrigo pela parceria, por sempre me apoiar, me incentivar e pelo amor e respeito.

Agradeço meu irmão Rafael, que apesar dos desentendimentos sempre está ali para me ajudar.

Agradeço a Gabriela A. por ser minha irmã de alma, amiga e companheira para tudo.

Agradeço a Elen pela grande amizade, por ser uma amiga sem igual.

Agradeço a Gabriella P. porque além de amiga, ser uma pessoa na qual tenho um carinho enorme.

Agradeço aos meus amigos que estão sempre presentes e fazem parte da minha vida. Em especial, Jéssica, Diego, Vinicius, Flávio, Everton e Guilherme.

Agradeço as meninas e meninos do CIPE pela ajuda, pelas risadas nos momentos vagos e por fazerem parte da minha vida de alguma maneira. Em especial, Bianca, Emne, Beatriz Nunes, Michelle, Hermano, Flávia, Renata, Juliana, Elen, Kátia, Agatha e Elisangela.

Agradeço as meninas da pós-graduação (Vanuza, Luciana e Ana) pela gentileza e pelo atendimento para tudo o que precisamos.

Agradeço a Fundação Antonio Prudente pela oportunidade e todo o corpo docente pelos grandes ensinamentos.

Agradeço a Ágatha da estatística pela grande ajuda.

Agradeço aos funcionários do SAME por me ajudarem e pela grande atenção.

Agradeço os funcionários da patologia, em especial Carlinhos, Severino e Ivan, por serem tão gentis e por atender meus pedidos.

Agradeço à FAPESP pelo auxílio financeiro (Processo 11/02051-6) e à CAPES pela bolsa concedida.

Agradeço a todos aqueles que de alguma maneira se preocupam comigo e me ajudaram de alguma forma.

## RESUMO

Silva GM. **Apoptose nas glândulas salivares humanas: avaliação de marcadores no processo de tumorigênese da glândula utilizando como modelos adenoma pleomórfico e o carcinoma mucoepidermóide.** São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Esses tumores são classificados em benignos e malignos e correspondem a cerca de 3% dos tumores de cabeça e pescoço. Apesar dos avanços alcançados pelas pesquisas, biomarcadores que auxiliem no diagnóstico das neoplasias das glândulas salivares e que expliquem a sua evolução e progressão ainda são motivos de intensa investigação. O mecanismo de apoptose desempenha um papel importante na formação do lúmen durante a organogênese de estruturas glandulares, incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares. Neste estudo, foi investigada a expressão das proteínas: PAR-4, PHLDA1, FAS, FAS-L, SPARC, MUC1 e Ki-67, que estão associadas aos processos de apoptose e proliferação celular, em 40 casos de carcinoma mucoepidermóide e em 49 casos de adenoma pleomórfico utilizando a técnica de imunistoquímica. A proteína PAR-4 foi expressa em 98,0% dos casos de adenoma pleomórfico e em 100,0% dos casos de carcinoma mucoepidermóide, apresentando positividade nuclear e/ou citoplasmática. A proteína MUC-1 foi expressa em 96,0% dos casos de adenoma pleomórfico e em 94,9% dos casos de carcinoma mucoepidermóide, apresentando um padrão citoplasmático de expressão. A proteína Ki-67 foi expressa em média em 5,7 (variando de 0 a 54,3 células) células por 10 campos de grande aumento e em média em 29,8 (variando de 0 a 146,9 células) células por 10 campos de grande aumento nos casos de carcinoma mucoepidermóide. A proteína SPARC foi expressa em 79,5% dos casos de adenoma pleomórfico e em 45,5% dos

casos de carcinoma mucoepidermóide. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células de suporte do tumor. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas células mioepiteliais. A proteína PHLDA1 foi expressa em 100,0% dos casos de adenoma pleomórfico e em 80,6% dos casos de carcinoma mucoepidermóide. A proteína FAS foi expressa de maneira focal em 88,6% dos casos de adenoma pleomórfico e em 66,7% dos casos de carcinoma mucoepidermóide. A proteína FAS-L foi expressa em 10,4% dos casos de adenoma pleomórfico e em 12,8% dos casos de carcinoma mucoepidermóide. Comparando-se a expressão das proteínas nos diferentes tumores, foi observada uma maior expressão das proteínas SPARC, FAS e PHLDA1 nos casos de adenoma pleomórfico e maior expressão da proteína Ki-67 nos casos de carcinoma mucoepidermóide. A expressão da proteína SPARC está associada a tumores de baixo grau histológico e expressão da proteína Ki-67 está associada com a presença de metástase em linfonodo nas amostras de carcinoma mucoepidermóide. A expressão da proteína FAS e menor expressão da proteína Ki-67 estão associadas a melhores taxas de sobrevida global e câncer específica. Dessa forma, a expressão das proteínas SPARC, FAS e Ki-67 parece apresentar um papel prognóstico nos os tumores de glândula salivar.

## SUMMARY

Silva GM. **[Apoptosis in human salivary glands: evaluation of markers during the tumorigenesis process using pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma as models]**. São Paulo; 2016. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Salivary gland tumors comprise a heterogeneous group of lesions, with different histological characteristics and different clinical behavior. These tumors are classified as benign and malignant and correspond to 3% of the head and neck tumors. Despite the advances in the research field, biomarkers that aid in the diagnosis of salivary gland tumors and that explain their evolution and progression are still matter of intensive research. Apoptosis plays an important role in organogenesis of glandular structures, including the development of salivary glands. In this study, the expression of PAR-4, PHLDA1, FAS, FAS-L, SPARC, MUC1 and Ki-67 proteins was investigated in 40 cases of mucoepidermoid carcinoma and 49 cases of pleomorphic adenoma by immunohistochemistry. PAR-4 protein was expressed in 98.0% of pleomorphic adenoma cases and 100.0% of mucoepidermoid carcinoma cases, presenting nuclear and/or cytoplasmic positivity. MUC1 protein was expressed in 96.0% of pleomorphic adenoma cases and 94.9% of mucoepidermoid carcinoma cases, presenting a cytoplasmic pattern. Ki-67 protein was expressed in 5.7 (range 0 to 54.3 cells) cells per 10 high power fields in pleomorphic adenoma cases and in 29.8 (range 0 to 146.9 cells) cells per 10 high power fields in mucoepidermoid carcinoma cases. SPARC protein was expressed in 79.5% of pleomorphic adenoma cases and in 45.5% of mucoepidermoid carcinoma cases. In pleomorphic adenoma cases the positivity was observed in myoepithelial cells whereas in mucoepidermoid carcinoma the positivity was observed in the surrounding stroma. PHLDA1 protein was expressed in 100.0% of pleomorphic adenoma cases and 80.6% of mucoepidermoid

carcinoma cases. FAS protein was focally expressed in 88.6% of pleomorphic adenoma cases and in 66.7% of mucoepidermoid carcinoma cases. FAS-L protein was expressed 10.4% of pleomorphic adenoma cases and 12.8% of mucoepidermoid carcinoma cases. Comparing protein expression in both tumors it was observed an increased expression of FAS, SPARC and PHLDA1 proteins in pleomorphic adenoma cases and increased expression of Ki-67 protein in mucoepidermoid carcinoma cases. The expression of SPARC protein was associated with low grade tumors and expression of Ki-67 protein was associated with lymph node metastasis in mucoepidermoid carcinoma samples. The expression of FAS protein and decreased expression of Ki-67 protein were associated with better overall cancer-specific survival rates. Therefore, the expression of SPARC, FAS and Ki-67 proteins seems to play a prognostic role for salivary gland tumors.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Mecanismo de apoptose: proteínas envolvidas nas vias extrínseca e intrínseca.....	6
<b>Figura 2</b>	Aspectos histopatológicos do carcinoma mucoepidermóide.....	20
<b>Figura 3</b>	Aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico.....	21
<b>Figura 4</b>	Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de carcinoma mucoepidermóide das glândulas.....	28
<b>Figura 5</b>	Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de adenoma pleomórfico das glândulas salivares.....	29
<b>Figura 6</b>	Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de glândula salivar sem evidência de neoplasia.....	30
<b>Figura 7</b>	Curvas de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para a expressão da proteína FAS.....	41
<b>Figura 8</b>	Curvas de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com maior ou menor expressão de Ki-67.....	41

## LISTA DE QUADRO E TABELAS

<b>Quadro 1</b>	Anticorpos primários, clones, procedência, diluição, recuperação antigênica e padrão de marcação.....	17
<b>Tabela 1</b>	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico.....	22
<b>Tabela 2</b>	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide.....	23
<b>Tabela 3</b>	Análise da imuno-expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, SPARC, PHLDA1, FAS e FAS-L em amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide.....	27
<b>Tabela 4</b>	Associação da expressão da proteína SPARC com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide.....	32
<b>Tabela 5</b>	Associação da expressão da proteína SPARC com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	33
<b>Tabela 6</b>	Associação da expressão da proteína Ki-67 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide.....	33
<b>Tabela 7</b>	Associação da expressão da proteína Ki-67 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	34

<b>Tabela 8</b>	Associação da expressão da proteína PAR-4 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	34
<b>Tabela 9</b>	Associação da expressão da proteína PAR-4 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide.....	35
<b>Tabela 10</b>	Associação da expressão da proteína PHLDA1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	35
<b>Tabela 11</b>	Associação da expressão da proteína PHLDA1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide.....	36
<b>Tabela 12</b>	Associação da expressão da proteína FAS com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	36
<b>Tabela 13</b>	Associação da expressão da proteína FAS com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide.....	37
<b>Tabela 14</b>	Associação da expressão da proteína FAS-L com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	38
<b>Tabela 15</b>	Associação da expressão da proteína FAS-L com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide.....	38

<b>Tabela 16</b>	Associação da expressão da proteína MUC-1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico.....	39
<b>Tabela 17</b>	Associação da expressão da proteína MUC-1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide.....	39
<b>Tabela 18</b>	Taxas de sobrevida global e câncer específica em pacientes com carcinoma mucoepidermoide, considerando-se a expressão das proteínas PHLDA1, MUC-1, SPARC, FAS, FAS-L e Ki-67.....	40

# ÍNDICE

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1	O Desenvolvimento das Glândulas Salivares.....	1
1.2	Tumores de Glândula Salivar.....	2
1.3	Apoptose.....	4
1.4	Justificativa.....	13
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>14</b>
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.1	Objetivos Específicos .....	14
<b>3</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1	Casuística .....	15
3.2	Imunoistoquímica .....	16
3.3	Análise Estatística.....	18
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>19</b>
4.1	Seleção das amostras.....	19
4.2	Dados clínicos, patológicos e demográficos.....	22
4.3	Imunoistoquímica.....	23
4.4	Análise estatística.....	31
4.4.1	Análise da expressão das proteínas nos diferentes Tumores .....	31
4.4.2	Análise da associação da expressão das proteínas e características clínicas, demográficas e patológicas .....	31
4.4.3	Análise de sobrevida .....	40
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>42</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>50</b>

<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>51</b>
----------	---	-----------

### **ANEXOS**

**Anexo 1** Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

**Anexo 2** Expressão das proteínas PAR-4, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L, MUC-1 e Ki-67 em amostras de adenoma pleomórfico (AP) e carcinoma mucoepidermóide (MEC)

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O DESENVOLVIMENTO DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são estruturas complexas formadas por um sistema de ductos e ácinos. A estrutura do sistema ductal é composta por células luminais e não-luminais (células basais e células mioepiteliais). As unidades secretoras acinares e os ductos intercalares são envolvidos pelas células mioepiteliais enquanto que as outras porções do sistema ductal contam com a presença das células basais (RAUBENHEIMER et al. 1987; REDMAN 1994).

Além das glândulas pequenas dispersas pela cavidade oral, existem três pares de glândulas salivares maiores: as glândulas parótida, submandibular (submaxilar) e sublingual. O parênquima destas glândulas consiste em terminações secretoras e em um sistema de ductos ramificados que se arranjam em lóbulos, separados entre si por septos de tecido conjuntivo que se originam da cápsula. As terminações secretoras possuem 2 dois tipos de células secretoras – serosas ou mucosas, além das células mioepiteliais não secretoras. Esta porção secretora precede um sistema de ductos cujos componentes modificam a saliva, à medida que a conduzem para a cavidade oral (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2004; HOLMBERG e HOFFMAN 2014).

As glândulas salivares se desenvolvem, de forma geral, de maneira similar: sua formação se inicia com a proliferação de cordões sólidos de células epiteliais que se proliferam e se ramificam, formando uma estrutura pseudoglandular. A estrutura ramificada sofre então degeneração das células centrais e se canaliza, formando estruturas secretoras terminais. Estas sofrem um processo final de diferenciação que irá finalmente formar os ácinos maduros (TONGUE e LUKE 1984; HAND e WHITEHILL 1986; DALE 1994; ELLIS e AUCLAIR 2008). As neoplasias das glândulas salivares são derivadas dos diversos segmentos glandulares e, de forma geral, relacionam-se com estes pelas características fenotípicas e moleculares.

## **1.2 TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. Esses tumores são classificados em benignos (adenoma pleomórfico, mioepitelioma, tumor de Warthin, entre outros) caracterizados por crescimento lento e progressão da doença indolente ou tumores e malignos (carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide-cístico, carcinoma de células acinares, entre outros) alguns possuem um prognóstico pior (BARNES et al. 2005; VASCONCELOS et al. 2015). Esses tumores representam 1% a 4% de todas as neoplasias humanas e correspondem a cerca de 3% dos tumores de cabeça e pescoço,

(ALVES et al. 2002; LIMA et al. 2005; OGAWA et al. 2008; BAGULKAR et al. 2015).

O carcinoma mucoepidermóide (MEC) é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares, originando nas glândulas salivares maiores e menores, ocorre principalmente nas glândulas parótidas apresentando uma composição variável de células escamosas, mucosas e intermediárias (AUCLAIR et al. 1992; BRANDWEIN et al. 2001; MCHUGH et al. 2012). É frequentemente observado em crianças e adolescentes e tem uma leve predileção por mulheres (HICKS e FLAITSZ 2000; BRANDWEIN et al. 2001).

O adenoma pleomórfico é o tumor benigno mais comum das glândulas salivares. O padrão histopatológico de adenoma pleomórfico é caracterizado pela heterogeneidade morfológica, grande diversidade celular, pois possui mistura de células ductais e mioepiteliais, bem como alterações no padrão de diferenciação - graus variados de tecido condróide, hialino, mixóide e ósseo - e na arquitetura da glândula (IANEZ et al. 2013; ALAIZARI et al. 2015). Apesar do adenoma pleomórfico apresentar uma lenta progressão, sem tratamento pode causar significativa morbidade e até a morte se ocorrer transformação maligna (MENDENHALL et al. 2008). A taxa de recorrência desses tumores varia de 1 a 5% e também há o risco de transformação maligna, que pode ocorrer de 3% a 4% dos casos (LINGAM et al. 2011).

Diversos estudos têm sido realizados na tentativa de se compreender os mecanismos envolvidos na tumorigênese desse grupo de lesões. O processo de apoptose parece desempenhar um importante papel na

formação das estruturas glandulares, incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares (MELNICK e JASKOLL 2000; JASKOLL et al. 2001; PATEL et al. 2006; CHUNG e ANDREW 2008; ANDREW e EWALD 2010; PRADHAN et al. 2010).

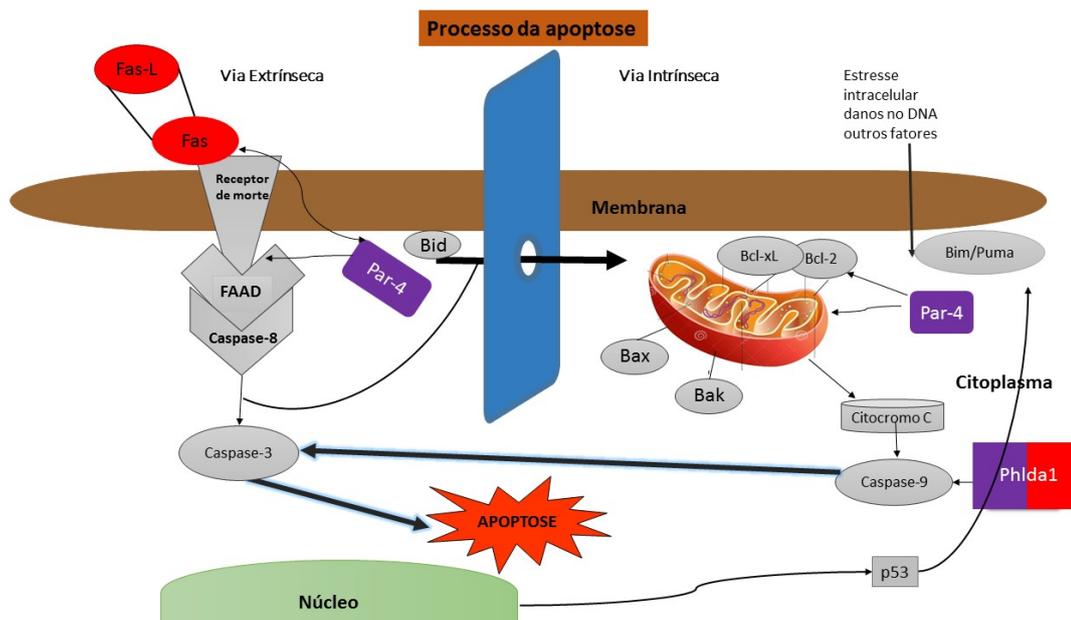
### **1.3 APOPTOSE**

A manutenção da homeostasia tecidual nos organismos multicelulares é assegurada por diferentes mecanismos biológicos regulatórios, entre os quais figura a apoptose. Organismos multicelulares são capazes de induzir a morte celular programada como resposta a estímulos intracelulares ou extracelulares (HENGARTNER 2000). Os processos de morte celular podem ser classificados de acordo com suas características morfológicas e bioquímicas em: apoptose, autofagia, necrose, mitose catastrófica e senescência (OKADA e MAK 2004; CASTEDO et al. 2004). Alterações na coordenação desses tipos de morte celular estão implicadas na tumorigênese, progressão de tumores e resistência de células tumorais à quimioterapia (FERREIRA et al. 2001; RAMP et al. 2004; RICCI e ZENG 2006; BAGULKAR et al. 2015).

A apoptose pode ser reconhecida por características morfológicas muito marcantes e coordenadas. De um modo geral, a apoptose é um fenômeno bastante rápido: ocorre uma retração da célula que causa perda da aderência com a matriz extracelular e células vizinhas (ZIEGLER e GROSCURTH 2004). Sob circunstâncias normais, as células em apoptose

são reconhecidas e fagocitadas pelos macrófagos ou células vizinhas. A ativação da apoptose pode ser iniciada de duas diferentes maneiras: pela via extrínseca (citoplasmática) ou pela via intrínseca (mitocondrial) (GRIVICICH et al. 2007) (Figura 1).

A via extrínseca é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de membrana da superfamília dos receptores de fatores de necrose tumoral (BUDIHARDJO et al. 1999; ELMORE 2007). Já a via intrínseca é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes, ocorrendo a liberação de moléculas pró-apoptóticas para o citoplasma (ELMORE 2007; TAYLOR et al. 2008).



**Fonte:** Modificado de PARRINO et al. (2007).

**Figura 1** - Mecanismos de apoptose: proteínas envolvidas nas vias extrínseca e intrínseca. Na via extrínseca a apoptose é desencadeada pela interação entre os receptores de morte e seus ligantes (no caso demonstrado, o Fas e Fas-L). Após essa interação, os receptores formam agregados que se ligam à proteína adaptadora FADD, presente no citoplasma, que tem a capacidade de recrutar a caspase-8 ativando a cascata de caspases. A proteína PAR-4 pode ativar a via extrínseca da apoptose facilitando o tráfego de Fas e FasL na membrana plasmática, e também a via intrínseca, através da inibição da proteína Bcl-2. Já na via intrínseca ocorre a migração de proteínas pró-apoptóticas (Bax e Bid) do citoplasma para a mitocôndria, alterando a permeabilidade da membrana e permitindo a liberação de outras proteínas pró-apoptóticas no citoplasma. O citocromo c é uma dessas proteínas e ativa a pró-caspase-9 desencadeando a cascata de caspases e resultando na apoptose pela via mitocondrial. A proteína PHLDA1 pode atuar como pró ou anti-apoptótica, dependendo do tipo celular.

A demonstração de que a apoptose é um mecanismo de defesa antineoplásica e de que vários agentes quimioterápicos agem através da indução desse tipo de morte celular levou a uma intensa investigação dos mecanismos moleculares da apoptose e sua aplicação no tratamento do câncer (NICHOLSON 2000). Bcl-2, Bcl-xL e Mcl-1 são proteínas antiapoptóticas que são frequentemente observadas em muitos tipos de

tumores e contribuem para a resistência ao tratamento quimioterápico (GRIVICICH et al. 2007). Por outro lado, Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (HENGARTNER 2000).

Estudo prévio de nosso grupo (dados não publicados) demonstrou a ocorrência de sinalização anti-apoptótica nos tumores de glândula salivar: alta expressão de survivina em amostras de carcinoma mucoepidermóide e áreas sólidas do adenoma pleomórfico. Expressão de Bcl-2 foi observada no carcinoma mucoepidermóide e também em áreas periféricas do adenoma pleomórfico. Contudo, expressão de caspase-3 foi observada em cerca de 50% das amostras de carcinoma mucoepidermóide e adenoma pleomórfico, sugerindo que outros mecanismos apoptóticos e proliferativos possam estar ativos nesses tumores. Dessa forma, para um melhor entendimento da tumorigênese da glândula salivar, torna-se necessária a investigação de um painel de marcadores associados à regulação da apoptose e proliferação celular:

✓ **PAR-4**

O gene PAR-4 (do inglês: *prostate apoptosis response-4*, também conhecido como PAWR, do inglês: *PKC apoptosis WT1 regulator*) foi identificado pela primeira vez por meio da técnica de hibridação diferencial como um gene relacionado à apoptose em células de câncer da próstata (SELLS et al. 1994). PAR-4 é expressa em células normais e tumorais (FRANCHITTO et al. 2010), apresentando função pró-apoptótica (SHRESTHA-BHATTARAI e RANGNEKAR et al. 2010; IRBY et al. 2013).

Esta proteína é essencial para a sensibilização das células para diversos estímulos apoptóticos (DIAZ-MECO et al. 1999), ativando a via extrínseca da apoptose, facilitando o tráfego de Fas e FasL na membrana plasmática, e também a via intrínseca, através da inibição de Bcl-2 (ZHAO e RANGNEKAR 2008). PAR-4 é silenciada ou reprimida em vários tipos de câncer, incluindo gliomas, carcinoma de células renais, neuroblastoma, carcinoma de endométrio, câncer de mama entre outros (COOK et al. 1999; QIU et al. 1999; ZHAO e RANGNEKAR 2008; NAGAI et al. 2010).

Estudos têm sugerido que PAR-4 é amplamente expressa em tecidos normais e linhagens celulares, primariamente no citoplasma, e não induz a apoptose a menos que haja um segundo estímulo. Já em células tumorais, a proteína PAR-4 é expressa no citoplasma e no núcleo, sendo a atividade indutora de apoptose associada à translocação nuclear (GOSWAMI et al. 2006; ZHAO e RANGNEKAR 2008; SHRESTHA-BHATTARAI e RANGNEKAR 2010). Em carcinoma epidermóide oral, foi observada forte expressão nuclear e citoplasmática de PAR-4, sendo expressão nuclear associada a um bom prognóstico enquanto que a expressão citoplasmática foi associada à presença de invasão vascular e presença de metástase em linfonodo (COUTINHO-CAMILLO et al. 2013).

✓ **PHLDA1**

PHLDA1 (do inglês: *pleckstrin homology-like domain family A member 1*; também conhecido como TDAG51) está localizado no cromossomo 12q15. A expressão de PHLDA1 foi inicialmente associada com a

restauração da apoptose induzida por ativação do receptor de células T (PARK et al. 1996; MURATA et al. 2014). Diversas evidências experimentais têm sugerido que PHLDA1 esteja envolvida nas vias extrínseca e intrínseca da apoptose. Contudo os mecanismos envolvidos ainda precisam ser elucidados (NAGAI 2016). Expressão de PHLDA1 associada a aumento da expressão de caspase 9 e PARP clivada sugere que essa proteína possa ativar a via intrínseca da apoptose (NEEF et al. 2002). Contudo, diversos estudos têm demonstrado que PHLDA1 pode apresentar funções opostas (pró- ou anti-apoptóticas) dependendo do tipo celular (PARK et al. 1996; GOMES et al. 1999; HOSSAIN et al. 2003; TOYOSHIMA et al. 2004; HAYASHIDA et al. 2006; JOO et al. 2007; MURATA et al. 2014).

Perda da expressão de PHLDA1 tem sido associada à progressão em tumores de mama e melanoma (NEEF et al. 2002; NAGAI et al. 2007). Por outro lado, perda da expressão de PHLDA1 em carcinoma epidermóide oral foi associada a estádios precoces da doença (COUTINHO-CAMILLO et al. 2013).

#### ✓ **MUC-1**

As mucinas são glicoproteínas produzidas por células epiteliais, componentes do muco e conhecidas por desempenhar um papel de proteção em tecidos epiteliais (MONIAUX et al. 2001; GONÇALVES et al. 2011). MUC-1 pode sofrer glicosilação aberrante e tem sua expressão aumentada em diversos tipos de tumores, sendo importante para a

progressão da doença (HORM e SCHROEDER 2013; NATH e MUKHERJEE 2014).

MUC-1 é uma das proteínas mais estudadas em tumores das glândulas salivares (SOARES et al. 2011). Os anticorpos anti-mucina têm sido utilizados com o objetivo de estabelecer a relação entre a presença de atividade mucosecretora e o prognóstico do carcinoma mucoepidermóide (LIU et al. 2014; SIYI et al. 2014). Estudos em modelo animal e *in vitro* demonstraram um papel importante da MUC1 nos processos de regulação da proliferação, angiogênese, invasão, metástase e também na evasão da apoptose, impedindo a ativação da via intrínseca da apoptose (NATH e MUKHERJEE 2014).

Nosso grupo avaliou a expressão de diversas mucinas durante o desenvolvimento das glândulas salivares humanas e observou que as mucinas MUC-1, -3, -4, -5B e -16 são expressas durante o desenvolvimento e também em glândulas adultas, sugerindo um papel importante na maturação e manutenção da rede de ductos glandulares (TESHIMA et al. 2011).

#### ✓ **SPARC**

SPARC (do inglês: *secreted protein acidic and rich in cysteine*) ou osteonectina é uma proteína da matriz extracelular, que possui um papel significativo na manutenção da estabilidade e da homeostase tecidual. É altamente expressa em uma variedade de células e está associada à remodelagem de tecidos (MCCURDY et al. 2010). Sua função é de modular

as interações célula-célula e célula-matriz (BORNSTEIN e SAGE 2002), atuando como reguladora chave dos processos de proliferação, sobrevivência e migração celular (BREKKEN e SAGE 2001). SPARC é expressa de forma diferente em vários tipos de câncer e no estroma circundante em comparação com tecidos normais, e o seu padrão de expressão é variável e altamente dependente do tipo de câncer (AQUINO et al. 2013).

SPARC é conhecida por interferir com a ligação de fatores pró-angiogênicos aos seus receptores em células endoteliais resultando na inibição da proliferação e na angiogênese. Em alguns tipos de câncer, a expressão SPARC tem sido associada à progressão e pior prognóstico, como, por exemplo, em tumores astrocíticos, câncer de mama, melanoma maligno, nos quais SPARC é considerado um marcador de comportamento tumoral agressivo (NAGAI et al. 2011; GORANTLA et al. 2012; EBRAHIMI et al. 2013).

✓ **Ki-67**

Ki-67 é um antígeno de proliferação celular, que está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e M), mas não na fase G0. Sua expressão aumenta com a progressão do ciclo celular e atinge o seu pico durante a fase G2 e M tornando-se uma ferramenta importante para a determinação da fração de crescimento em uma determinada população celular (VARGAS et al. 2008; BAGULKAR et al. 2015).

Alguns estudos têm demonstrado que alta expressão do Ki-67 está correlacionada com um pior prognóstico em tumores de cabeça e pescoço, enquanto outros não mostram nenhuma associação ou resultado oposto (PICH et al. 2004; HWA et al. 2015). Diversos autores têm avaliado a atividade de proliferação celular em tumores de glândulas salivares por imunohistoquímica utilizando o Ki-67, tanto para diferenciar entre neoplasias benignas e malignas como também para avaliar as características prognósticas de neoplasias malignas, sendo que o Ki-67 foi identificado em tumores malignos de glândulas salivares principalmente de alto grau (ALVES et al. 2004; PEREZ et al. 2004; LUUKKAA et al. 2006; DO PRADO et al. 2011).

#### ✓ **FAS e FAS-L**

Fas (também conhecido por CD95 ou TNFRSF6) é um membro da família de receptores de morte celular. Os membros da superfamília do fator de necrose tumoral (TNF), incluindo Fas Ligante (FAS-L), desempenham papéis críticos na tumorigênese, proliferação, apoptose e processos imunes (ZHANG et al. 2015). A interação de FAS com o seu ligante FAS-L (CD95L, CD178) leva à indução da apoptose. A apoptose induzida por FAS está envolvida na atividade citotóxica de células T e células NK (DAVIDSON et al. 2002), tolerância de células B periféricas e eliminação de células T auto-reativas (JU et al. 1995; STRANGES et al. 2007). Fas também pode induzir a sinalização não apoptótica, resultando na proliferação celular,

angiogênese, inflamação e no processo de fibrose (RAMASWAMY et al. 2009; MOCELLIN 2010).

#### **1.4 JUSTIFICATIVA**

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. A compreensão dos mecanismos envolvidos na tumorigênese desse grupo de lesões é essencial e o processo de apoptose parece desempenhar um importante papel na formação das estruturas glandulares, incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares e tumores. Contudo, poucos estudos têm avaliado o papel da apoptose no desenvolvimento de tumores de glândula salivar. Esses estudos avaliaram a expressão de poucas moléculas por imunistoquímica e expressão gênica, especialmente o papel do Bcl-2 e da survivina e os resultados observados são contraditórios (SOINI et al. 1998; AOKI et al. 2004; STENNER et al. 2010; FERREIRA et al. 2014; ACASIGUA et al. 2015). Dessa forma, a avaliação de um painel de proteínas relacionadas à regulação dos processos de apoptose e proliferação celular pode trazer um melhor entendimento dos mecanismos de desenvolvimento/progressão dos tumores de glândula salivar.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVOS GERAIS**

Investigar a presença de marcadores de apoptose e proliferação celular em amostras de adenoma pleomórfico e de carcinoma mucoepidermóide

### **2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Avaliar e quantificar a expressão das proteínas PAR-4, PHLDA1, MUC-1, SPARC, Ki-67, FAS e FAS-L em amostras de adenoma pleomórfico e amostras de carcinoma mucoepidermóide por imunohistoquímica
- Verificar se existe diferença na expressão das proteínas PAR-4, PHLDA1, MUC-1, SPARC, Ki-67, FAS e FAS-L entre as amostras de adenoma pleomórfico e de carcinoma mucoepidermóide
- Verificar se existe associação entre a expressão das proteínas PAR-4, PHLDA1, MUC-1, SPARC, Ki-67, FAS e FAS-L e características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico e amostras de carcinoma mucoepidermóide
- Verificar se existe associação entre a expressão das proteínas PAR-4, PHLDA1, MUC-1, SPARC, Ki-67, FAS e FAS-L e taxas de sobrevida global e câncer específica em pacientes com carcinoma mucoepidermóide

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 CASUISTICA**

Foram selecionadas 49 amostras de adenoma pleomórfico e 40 amostras de carcinoma mucoepidermóide, provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center. Os pacientes foram submetidos à cirurgia no período de 1984 a 2004. As lâminas coradas em hematoxilina e eosina de cada caso foram analisadas, com o auxílio de um patologista, para checagem das estruturas glandulares presentes e seleção do material a ser utilizado na pesquisa. Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada caso, incluindo informações sobre metástase, invasão perineural e invasão vascular, foram estudados nos prontuários arquivados no SAME do AC Camargo Cancer Center. Foram incluídos no estudo pacientes que dispunham de material parafinado para a realização da imunohistoquímica e que não realizaram tratamento neoadjuvante.

Dez espécimes de glândulas salivares sem evidência de neoplasia e provenientes de margens cirúrgicas também foram incluídos no estudo. Essas glândulas salivares compreendem glândulas mucosas (menores) de várias regiões da cavidade oral, e glândulas salivares maiores - parótida, submandibular e sublingual.

Após a escolha dos fragmentos a serem utilizados na pesquisa, os blocos de parafina foram separados e cortes histológicos desse material, com 3µm de espessura, foram utilizados para a realização da técnica de imunohistoquímica.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (protocolo número: 1578/11D) (Anexo 1).

### **3.2 IMUNOISTOQUÍMICA**

As lâminas preparadas foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi re-hidratado em etanol e as lâminas lavadas em água.

A recuperação antigênica é um processo que aumenta a reatividade e foi realizada por tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou solução Trilogy (Cell Marque), utilizando-se panela de pressão, de acordo com a padronização de cada anticorpo. A lista dos anticorpos que foram utilizados encontra-se no Quadro 1. Após a recuperação antigênica foi feito o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio em 3 banhos de 5 minutos.

Em seguida foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *Protein Block* (Dako) por 20 minutos. As lâminas foram então incubadas por 16 horas a 4°C com o anticorpo específico.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção *Advance* (Dako). A revelação foi feita utilizando-se como substrato

cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (*DAB*) e a contra-coloração foi feita utilizando-se a hematoxilina. Todas as reações foram acompanhadas de um controle, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado. As reações foram analisadas em microscópio convencional e os dados estudados de forma descritiva e semi-quantitativa. Na análise semi-quantitativa foi considerado o seguinte escore, baseado no número de células e intensidade de marcação: 0, negativo (quando até 10% das células estão marcadas); 1, positivo (mais de 10% das células marcadas). Para a análise da proteína Ki-67 a positividade nuclear foi avaliada no número de células positivas em 10 áreas em campo de grande aumento. Na análise descritiva foi avaliada a localização da marcação (núcleo, citoplasma, membrana) e o padrão de marcação (difuso, focal). A análise foi feita por dois avaliadores que avaliaram consensualmente os padrões de marcação.

**Quadro 1** - Anticorpos primários, clones, procedência, diluição, recuperação antigênica e padrão de marcação

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição de uso	Recuperação antigênica	Padrão de Marcação
<b>PAR4</b>	A-10	Santa Cruz	1:100	Panela de pressão, citrato pH 6.0	Nuclear e/ou citoplasmático
<b>PHLDA1</b>	M-20	Santa Cruz	1:100	Panela de pressão, Trilogy*	Nuclear e/ou citoplasmático
<b>MUC-1</b>	Ma552	Novocastra	1:500	Panela de pressão, citrato pH6.0	Citoplasmático
<b>SPARC</b>	Policlonal	Chemicon	1:6000	Panela de pressão, Trilogy	Citoplasmático
<b>Ki-67</b>	MIB	Dako	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana)	Nuclear
<b>FAZ</b>	EPR5700	LSBio	1:1000	Panela de pressão, Trilogy	Membrana
<b>FAS-L</b>	Policlonal	LSBio	1:500	Panela de pressão, Trilogy	Membrana

\*, Trilogy, solução disponível comercialmente que permite a desparafinização e recuperação antigênica em uma única etapa

### **3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

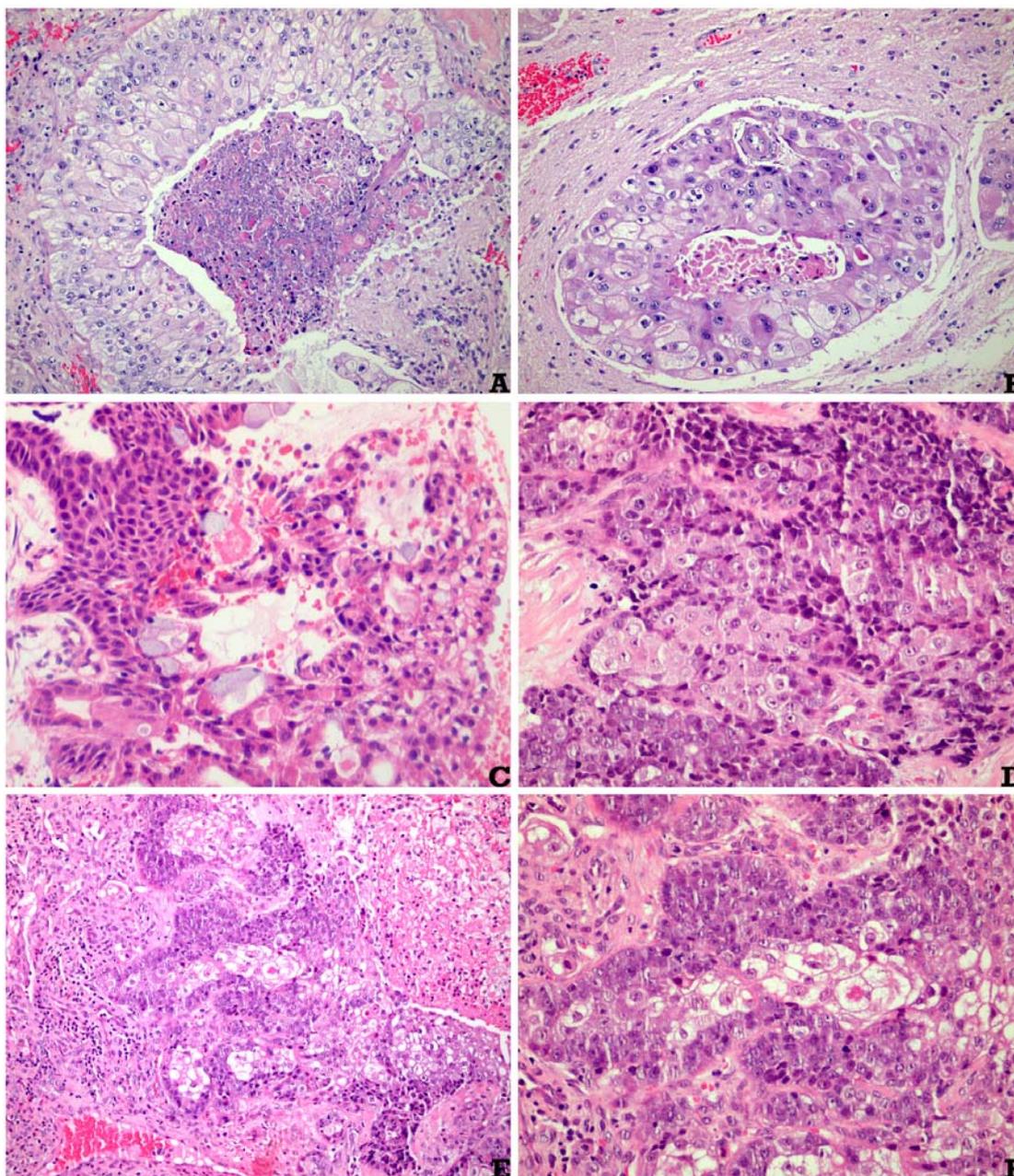
A análise de associação das variáveis qualitativas foi avaliada pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher quando apropriado. Para comparação de grupos em relação à variáveis quantitativas foram utilizados os testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis.

As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi avaliada pelo teste de log-rank. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS (versão 20).

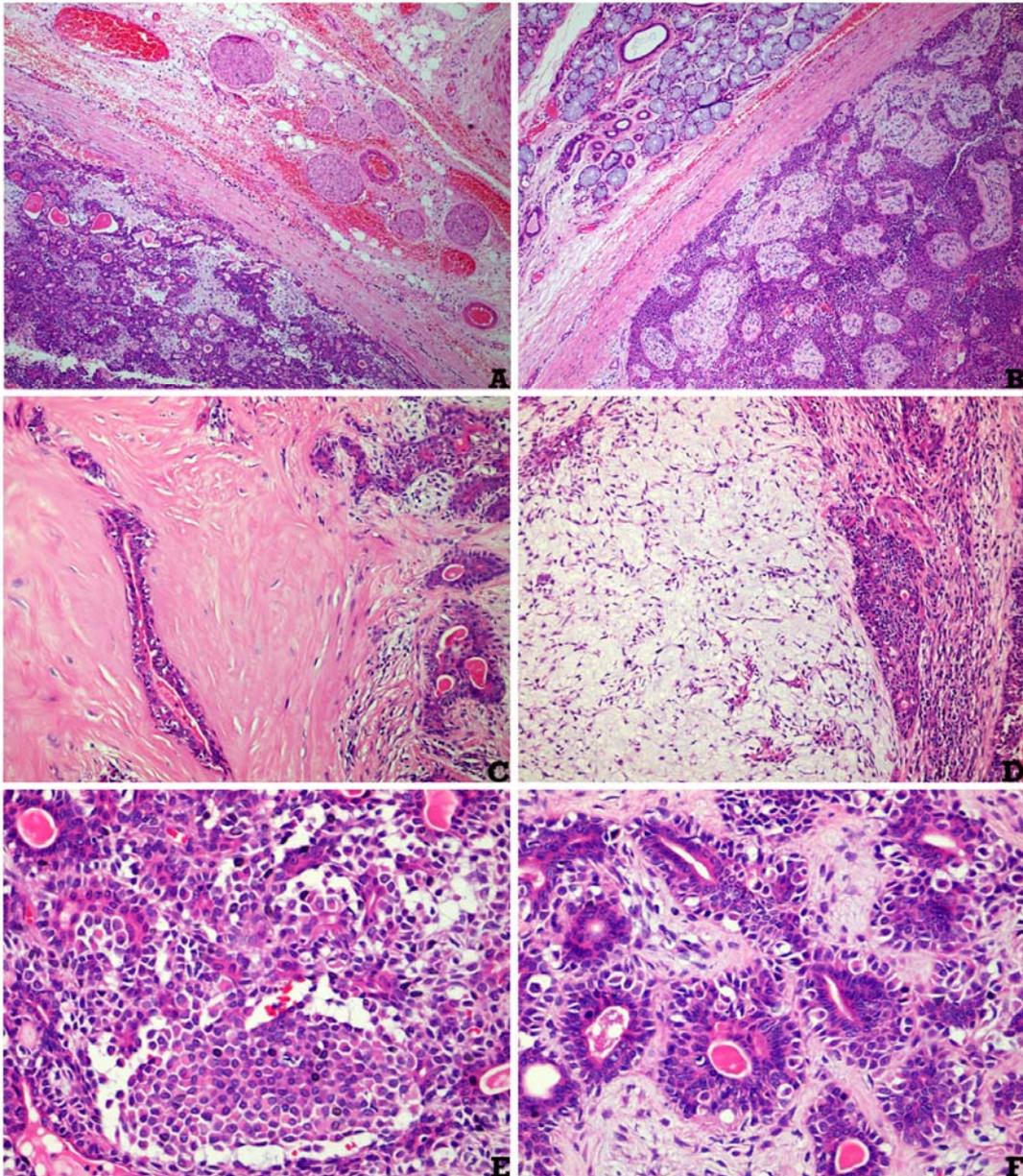
## **4 RESULTADOS**

### **4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS**

Foram selecionadas 49 amostras de adenoma pleomórfico e 40 amostras de carcinoma mucoepidermóide. Imagens representativas de alguns casos selecionados podem ser observadas nas Figuras 2 e 3.



**Figura 2** - Aspectos histopatológicos do carcinoma mucoepidermóide. A e B, células mucosas do carcinoma mucoepidermóide, com aspecto claro e de citoplasma amplo circundando cavidade preenchida por material eosinofílico (aumento original x250 e x400, respectivamente); C e D, área do carcinoma mucoepidermóide mostrando mistura de células mucosas com células intermediárias de aspecto basalóide (aumento original x250); E e F, áreas do carcinoma mucoepidermóide permeadas pelo infiltrado inflamatório e necrose (aumento original x100 e x250, respectivamente).



**Figura 3** - Aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico. A e B, adenoma pleomórfico: relação da neoplasia com a pseudocápsula e sua proximidade com as glândulas salivares (em B) (aumento original x100); D e E, exemplos de estroma que compõem o adenoma pleomórfico. Em C estroma hialino e em D estroma mixóide (aumento original x100); E e F, celularidade do adenoma pleomórfico: em E células mioepiteliais de fenótipo plasmocitóide e em F estruturas ductiformes circundadas por células claras mioepiteliais em meio a estroma hialino (aumento original x250).

## 4.2 DADOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E DEMOGRÁFICOS

Os dados clínicos, patológicos e demográficos dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico foram coletados. Das informações disponíveis temos que 32 eram mulheres e 17 homens e as idades variaram entre 13 e 80 anos de idade (média das idades = 43,21 anos). O local mais frequentemente acometido foi a parótida com 30 pacientes (Tabela 1).

**Tabela 1** - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com adenoma pleomórfico

<b>Características</b>	<b>Categorias</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Idade</b>	<= 40	22 (45,0)
	> 40	27 (55,0)
<b>Gênero</b>	Feminino	32 (65,0)
	Masculino	17 (35,0)
<b>Raça</b>	Branca	40 (82,0)
	Não branca	7 (14,0)
	n/d*	2 (4,0)
<b>Local do tumor</b>	Parótida	30 (61,0)
	Submandibular	11 (23,0)
<b>Recidiva</b>	Sim	4 (8,0)
	Não	45 (92,0)

\*, n/d informação não disponível

Os dados clínicos, patológicos e demográficos dos pacientes portadores de carcinoma mucoepidermóide foram coletados. Das informações disponíveis temos que 19 eram mulheres e 21 homens e as idades variaram entre 8 e 81 anos de idade (média das idades = 43,13 anos). O local mais frequentemente acometido foram as glândulas salivares menores com 22 pacientes (Tabela 2).

**Tabela 2** - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide

<b>Características</b>	<b>Categorias</b>	<b>Número de pacientes (%)</b>
<b>Idade</b>	<= 40	16 (40,0)
	> 40	24 (60,0)
<b>Gênero</b>	Feminino	19 (47,5)
	Masculino	21 (52,5)
<b>Raça</b>	Branca	38 (95,0)
	Não branca	2 (5,0)
<b>Grau histológico</b>	Baixo	14 (35,0)
	Intermediário	11 (28,0)
	Alto	14 (35,0)
	n/d*	1 (2,0)
<b>Local do tumor</b>	Parótida	16 (40,0)
	Sublingual	1 (2,5)
	Submandibular	1 (2,5)
	Glândulas menores	22 (55,0)
<b>Linfonodo comprometido</b>	Sim	17 (43,0)
	Não	11 (27,0)
	n/d	12 (30,0)
<b>Invasão perineural</b>	Sim	19 (48,0)
	Não	14 (35,0)
	n/d	7 (17,0)
<b>Invasão vascular</b>	Sim	7 (17,0)
	Não	25 (63,0)
	n/d	8 (20,0)

\* , n/d informação não disponível

### 4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas para os 40 casos de carcinoma mucoepidermóide, 49 casos de adenoma pleomórfico e 10 casos de glândulas salivares sem evidência de neoplasia para avaliação das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, PHLDA1, SPARC, FAS e FAS-L. As

lâminas foram avaliadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa e semiquantitativa (Anexo 2).

A proteína PAR-4 foi expressa em 48 dos 49 (98,0%) casos de adenoma pleomórfico e nos 40 (100,0%) casos de carcinoma mucoepidermóide. A positividade foi nuclear e/ou citoplasmática. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade nuclear foi observada nas células epiteliais e mioepiteliais. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide foi observada positividade nuclear nas células intermediárias e positividade citoplasmática nas células mucosas e epidermóides (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

A proteína MUC-1 foi expressa em 47 dos 49 (96,0%) casos de adenoma pleomórfico e em 37 dos 39 (94,9%) casos avaliáveis de carcinoma mucoepidermóide. MUC-1 apresentou um padrão citoplasmático de expressão. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas estruturas luminais. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células mucosas e intermediárias (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

A proteína Ki-67 foi expressa em média em 5,7 (variando de 0 a 54,3 células) células por 10 campos de grande aumento nos 45 casos de adenoma pleomórfico avaliáveis. Também foi expressa em média em 29,8 (variando de 0 a 146,9 células) células por 10 campos de grande aumento nos 33 casos de carcinoma mucoepidermóide avaliáveis. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células

intermediárias e epidermóides. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas células mioepiteliais (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

A proteína SPARC foi expressa em 35 dos 44 (79,5%) casos avaliáveis de adenoma pleomórfico e em 15 dos 33 (45,5%) casos avaliáveis de carcinoma mucoepidermóide. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células de suporte do tumor. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas células mioepiteliais (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

A proteína PHLDA1 foi expressa nos 47 (100,0%) casos avaliáveis de adenoma pleomórfico e em 29 dos 36 (80,6%) casos avaliáveis de carcinoma mucoepidermóide. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células intermediárias e epidermóides. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas células epiteliais (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

A proteína FAS foi expressa focalmente em 31 dos 35 (88,6%) casos avaliáveis de adenoma pleomórfico e em 22 dos 33 (66,7%) casos avaliáveis de carcinoma mucoepidermóide. Nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células intermediárias e epidermóides. Nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas células mioepiteliais e epiteliais (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

A proteína FAS-L foi expressa em 5 dos 48 (10,4%) casos avaliáveis de adenoma pleomórfico e em 5 dos 39 (12,8%) casos avaliáveis de carcinoma mucoepidermóide. Em ambos os tumores a positividade foi observada em raras células (Tabela 3, Figuras 4 e 5).

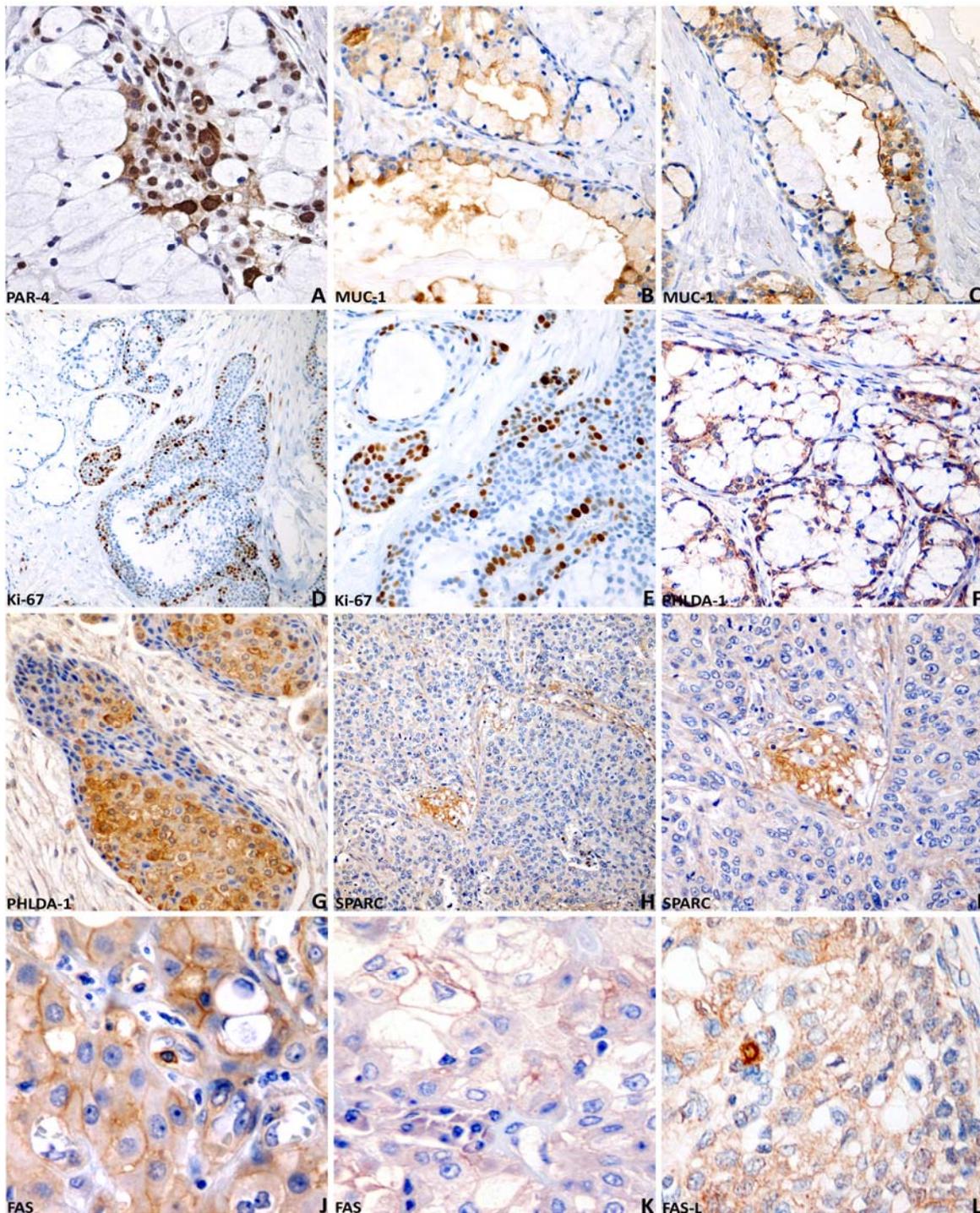
Nas glândulas salivares sem evidência de neoplasia as proteínas PAR-4 e FAS foram focalmente expressas. As proteínas MUC-1 e SPARC foram amplamente expressas e as proteínas PHLDA1 FAS-L não foi expressa (Figura 6).

**Tabela 3** - Análise da imuno-expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, SPARC, PHLDA1, FAS e FAS-L em amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide

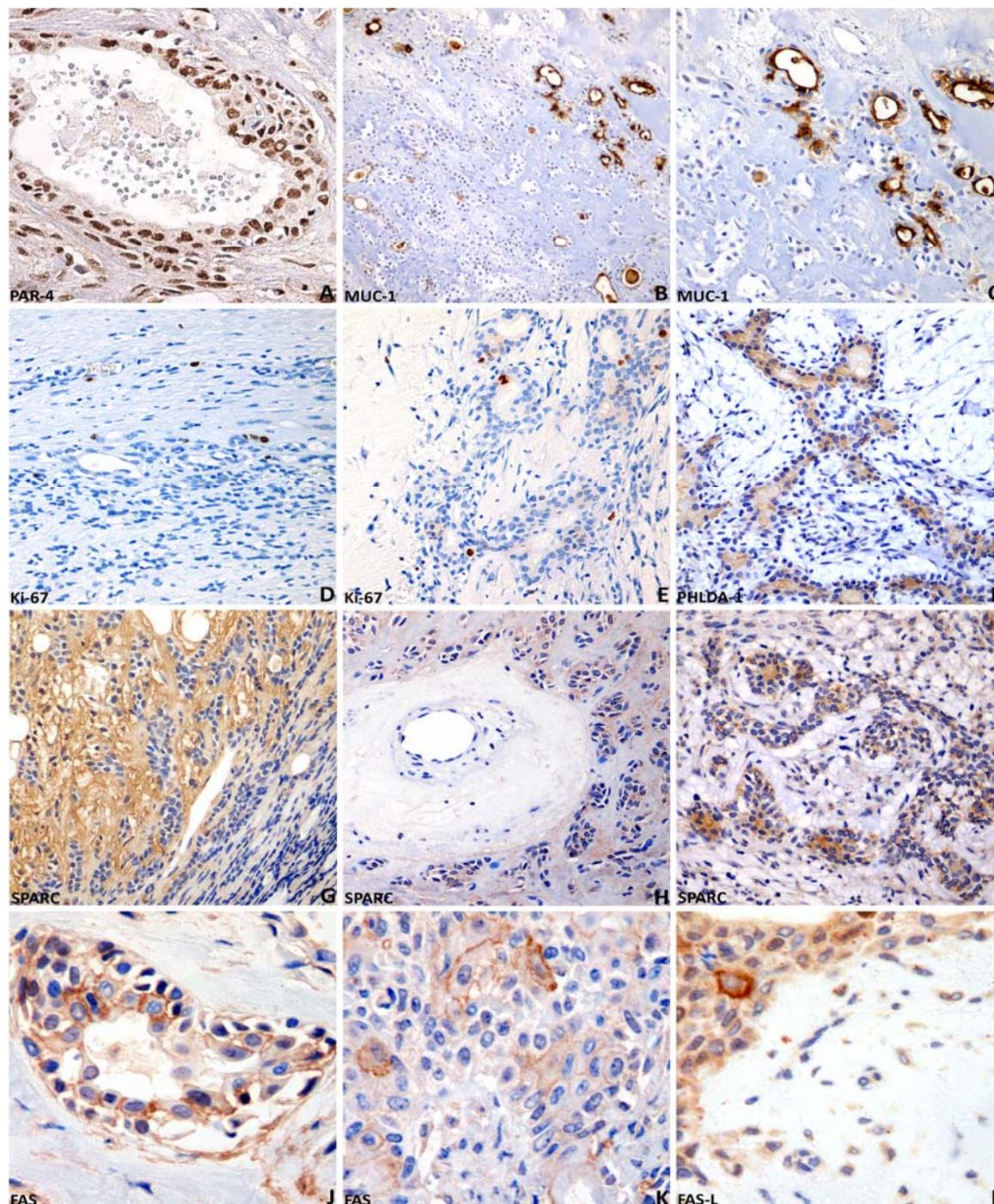
Proteína	Tumor	Positivo (%)	Negativo (%)	Total de casos	p valor
<b>PAR-4</b> (nuclear e/ou citoplasmático)	Adenoma pleomórfico	48 (98,0)	01 (2,0)	49	n/a*
	Carcinoma mucoepidermóide	40 (100,0)	00 (0,0)	40	
<b>MUC-1</b> (citoplasmático)	Adenoma pleomórfico	47 (96,0)	02 (4,0)	49	>0,99
	Carcinoma mucoepidermóide	37 (94,9)	02 (5,1)	39	
<b>Ki-67</b> (nuclear)	Adenoma pleomórfico	5,7 (0 a 54,3)**		45	<b>0,001</b>
	Carcinoma mucoepidermóide	29,8 (0 a 146,9)		33	
<b>SPARC</b> (citoplasmático)	Adenoma pleomórfico	35 (79,5)	9 (20,5)	44	<b>0,003</b>
	Carcinoma mucoepidermóide	15 (45,5)	18 (54,5)	33	
<b>PHLDA1</b> (nuclear e/ou citoplasmático)	Adenoma pleomórfico	47 (100,0)	00 (0,0)	47	<b>0,002</b>
	Carcinoma mucoepidermóide	29 (80,6)	07 (19,4)	36	
<b>FAS</b> (membrana)	Adenoma pleomórfico	31 (88,6)	04 (11,4)	35	<b>0,041</b>
	Carcinoma mucoepidermóide	22 (66,7)	11 (33,3)	33	
<b>FAS-L</b> (membrana)	Adenoma pleomórfico	5 (10,4)	43 (89,6)	48	0,748
	Carcinoma mucoepidermóide	5 (12,8)	34 (87,2)	39	

\*, não avaliável

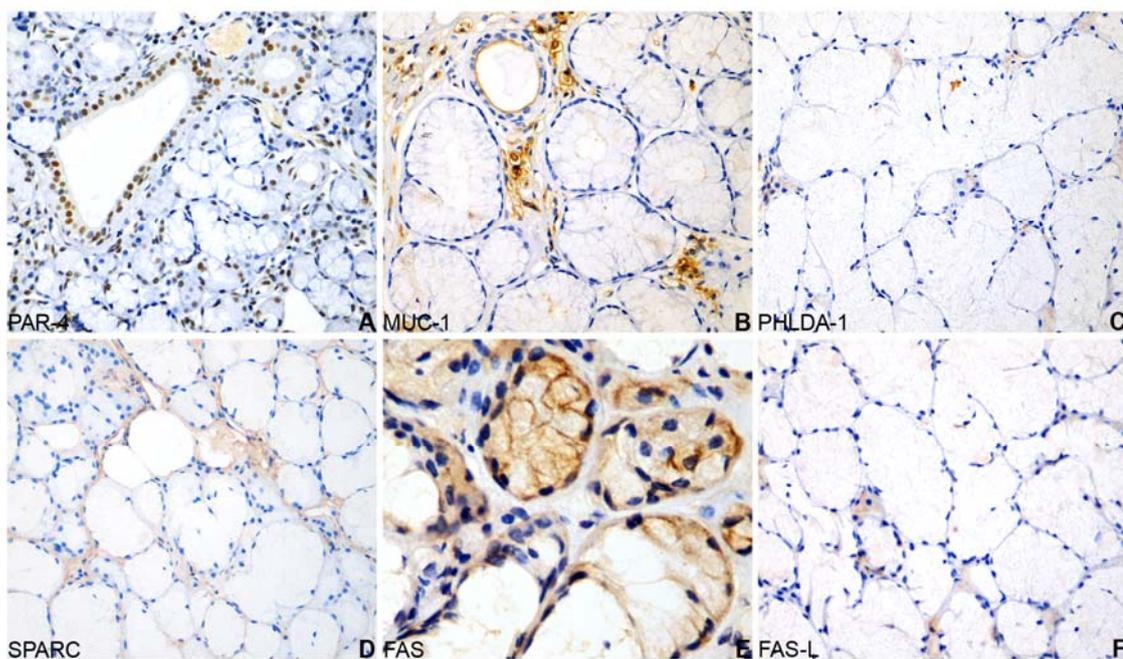
\*\* , número de células positivas contadas em 10 campos de grande aumento



**Figura 4** - Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares. A, expressão nuclear e citoplasmática de PAR-4 em células mucosas; B e C, expressão de MUC-1 em células mucosas e intermediárias; D e E, expressão intensa de Ki-67; F, expressão de PHLDA1 no citoplasma das células intermediárias e mucosas; G, expressão de PHLDA1 nas células epidermóides; H e I, expressão de SPARC na matriz extracelular; J e K, expressão de FAS em padrão de membrana em raras células epidermóides; L, expressão focal de FAS-L.



**Figura 5** - Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, Ki-67, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de adenoma pleomórfico das glândulas salivares. A, expressão nuclear intensa de PAR-4 nas células luminais; B e C, expressão de MUC-1 em estruturas luminais; D e E, baixa expressão de Ki-67; F, expressão citoplasmática de PHLDA1; G, expressão de SPARC na matriz extracelular; H e I, expressão citoplasmática de SPARC; J e K, expressão de FAS em padrão de membrana em células isoladas; L, expressão de FAS-L em padrão de membrana em raras células próximas à matriz condroide.



**Figura 6** - Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de glândula salivar sem evidência de neoplasia.

## **4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

### **4.4.1 Análise da expressão das proteínas nos diferentes tumores**

Comparando-se a expressão das proteínas nos diferentes tumores, foi observada uma maior expressão das proteínas SPARC e FAS nos casos de adenoma pleomórfico ( $p=0,003$  e  $p=0,041$ , respectivamente). A expressão da proteína PHLDA1 também foi menor nos casos de carcinoma mucoepidermóide. Contudo, esse resultado deve ser analisado com cautela pois não há casos negativos para adenoma pleomórfico ( $p=0,002$ ). Com relação à proteína Ki-67, foi observada uma maior expressão nos casos de carcinoma mucoepidermóide ( $p=0,001$ ). Esses resultados estão descritos na Tabela 3.

### **4.4.2 Análise da associação da expressão das proteínas e características clínicas, demográficas e patológicas**

Na análise de associação entre a expressão proteica e características clínicas, demográficas e patológicas do tumor foi observado que a expressão de SPARC está associada a baixo grau histológico em carcinoma mucoepidermóide ( $p=0,006$ ) (Tabela 4). Considerando-se a expressão dessa proteína em adenoma pleomórfico não houve associação estatisticamente significativa com nenhuma das características avaliadas (Tabela 5). A expressão da proteína Ki-67 está associada com a presença de metástase em linfonodo nas amostras de carcinoma mucoepidermóide ( $p=0,036$ ) (Tabela 6). Considerando-se a expressão dessa proteína em adenoma

pleomórfico não houve associação estatisticamente significativa com nenhuma das características avaliadas (Tabela 7).

**Tabela 4** - Associação da expressão da proteína SPARC com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide

Variável	Categoria	SPARC		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	11 (61,0)	7 (39,0)	18	0,407
	Feminino	7 (46,5)	8 (53,5)	15	
<b>Raça</b>	Branca	18 (58,0)	13 (42,0)	31	0,199
	Não branca	0 (0,0)	2 (100)	2	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	7 (58,0)	5 (42,0)	12	0,741
	Acima de 40	11 (52,0)	10 (48,0)	21	
	Parótida	7 (52,0)	5 (42,0)	12	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	1 (100)	0 (0,0)	1	0,918
	Sublingual	1 (100)	0 (0,0)	1	
	Glândulas salivares menores	9 (47,0)	10 (53,0)	19	
<b>Grau histológico</b>	Baixo	2 (17,0)	10 (83,0)	12	0,006
	Intermediário	5 (71,5)	2 (28,5)	7	
	Alto	10 (77,0)	3 (23,0)	13	
<b>Invasão vascular</b>	Não	12 (57,0)	9 (43,0)	21	0,635
	Sim	2 (40,0)	3 (60,0)	5	
<b>Invasão perineural</b>	Não	8 (50,0)	8 (50,0)	16	0,696
	Sim	7 (64,0)	4 (36,0)	11	
<b>Linfonodo comprometido</b>	Não	7 (64,0)	4 (36,0)	11	>0,99
	Sim	8 (61,5)	5 (38,5)	13	

**Tabela 5** - Associação da expressão da proteína SPARC com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	SPARC		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	1 (8,0)	12 (92,0)	13	0,242
	Feminino	8 (26,0)	23 (74,0)	31	
<b>Raça</b>	Branca	8 (22,0)	28 (78,0)	36	>0,99
	Não branca	1 (17,0)	5 (83,0)	6	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	3 (15,0)	17 (85,0)	20	0,477
	Acima de 40	6 (25,0)	18 (75,0)	24	
	Parótida	6 (22,0)	21 (78,0)	27	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	9 (100,0)	9	0,134
	Glândulas salivares menores	3 (37,5)	5 (62,5)	8	

**Tabela 6** - Associação da expressão da proteína Ki-67 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide

Variável	Categoria	Ki-67	Total	Valor de p
		(média)		
<b>Gênero</b>	Masculino	34,77	16	0,752
	Feminino	24,86	16	
<b>Raça</b>	Branca	31,53	30	0,488
	Não branca	4,05	2	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	21,09	13	0,570
	Acima de 40	35,78	19	
	Parótida	37,84	13	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	-	0	0,742
	Sublingual	-	0	
	Glândulas salivares menores	26,62	17	
<b>Grau histológico</b>	Baixo	17,34	12	0,266
	Intermediário	28,16	8	
<b>Invasão vascular</b>	Alto	43,38	12	0,157
	Não	31,84	20	
<b>Invasão perineural</b>	Sim	48,07	6	0,323
	Não	35,20	15	
<b>Linfonodo comprometido</b>	Sim	36,86	12	<b>0,036</b>
	Não	23,82	10	
	Sim	49,26	13	

**Tabela 7** - Associação da expressão da proteína Ki-67 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	Ki-67 (média)		Total	Valor de p
<b>Gênero</b>	Masculino	6,01	17	0,505	
	Feminino	5,53	28		
<b>Raça</b>	Branca	5,52	37	0,090	
	Não branca	8,47	6		
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	5,77	20	0,723	
	Acima de 40	5,66	25		
	Parótida	4,64	27		
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	6,35	11	0,073	
	Glândulas salivares menores	8,82	7		

Para as demais proteínas (PAR-4, PHLDA1, FAS, FAS-L e MUC-1) não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa com as características clínicas, demográficas e patológicas nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide (Tabelas 8-17).

**Tabela 8** - Associação da expressão da proteína PAR-4 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	PAR-4		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	0 (0,0)	17 (100,0)	17	n/a*
	Feminino	1 (3,0)	31 (97,0)	32	
<b>Raça</b>	Branca	1 (2,5)	39 (97,5)	40	n/a
	Não branca	0 (0,0)	7 (100,0)	7	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	1 (4,5)	21 (95,5)	22	n/a
	Acima de 40	0 (0,0)	27 (100,0)	27	
	Parótida	1 (3,0)	29 (97,0)	30	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	11 (100,0)	11	>0,99
	Glândulas salivares menores	0 (0,0)	8 (100,0)	8	

\*, n/a não avaliável

**Tabela 9** - Associação da expressão da proteína PAR-4 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide

Variável	Categoria	PAR-4		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	0 (0,0)	21 (100,0)	21	n/a*
	Feminino	0 (0,0)	19 (100,0)	15	
<b>Raça</b>	Branca	0 (0,0)	38 (100,0)	38	n/a
	Não branca	0 (0,0)	2 (100,0)	2	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	0 (0,0)	16 (100,0)	16	n/a
	Acima de 40	0 (0,0)	24 (100,0)	24	
	Parótida	0 (0,0)	16 (100,0)	16	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	1 (100,0)	1	n/a
	Sublingual	0 (0,0)	1 (100,0)	1	
	Glândulas salivares menores	0 (0,0)	22 (100,0)	22	
<b>Grau histológico</b>	Baixo	0 (0,0)	14 (100,0)	14	n/a
	Intermediário	0 (0,0)	11 (100,0)	11	
	Alto	0 (0,0)	14 (100,0)	14	
<b>Invasão vascular</b>	Não	0 (0,0)	25 (100,0)	25	n/a
	Sim	0 (0,0)	7 (100,0)	7	
<b>Invasão perineural</b>	Não	0 (0,0)	19 (100,0)	19	n/a
	Sim	0 (0,0)	14 (100,0)	14	
<b>Linfonodo comprometido</b>	Não	0 (0,0)	11 (100,0)	11	n/a
	Sim	0 (0,0)	17 (100,0)	17	

\*, n/a não avaliável

**Tabela 10** - Associação da expressão da proteína PHLDA1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	PHLDA1		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	0 (0,0)	16 (100,0)	16	n/a*
	Feminino	0 (0,0)	31 (100,0)	31	
<b>Raça</b>	Branca	0 (0,0)	38 (100,0)	38	n/a
	Não branca	0 (0,0)	7 (100,0)	7	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	0 (0,0)	20 (100,0)	20	n/a
	Acima de 40	0 (0,0)	27 (100,0)	27	
	Parótida	0 (0,0)	29 (100,0)	29	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	10 (100,0)	10	n/a
	Glândulas salivares menores	0 (0,0)	8 (100,0)	8	

\*, n/a não avaliável

**Tabela 11** - Associação da expressão da proteína PHLDA1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide

Variável	Categoria	PHLDA1		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
Gênero	Masculino	3 (16,0)	16 (84,0)	19	0,684
	Feminino	4 (23,5)	13 (76,5)	17	
Raça	Branca	7 (20,5)	27 (79,5)	34	>0,99
	Não branca	0 (0,0)	2 (100,0)	2	
Idade	Menor ou igual a 40	1 (7,0)	13 (93,0)	14	0,209
	Acima de 40	6 (27,0)	16 (73,0)	22	
	Parótida	3 (20,0)	12 (80,0)	15	
Local do tumor	Submandibular	0 (0,0)	1 (100,0)	1	>0,99
	Sublingual	0 (0,0)	1 (100,0)	1	
	Glândulas salivares menores	4 (20,0)	16 (80,0)	20	
Grau histológico	Baixo	3 (23,0)	10 (77,0)	13	0,131
	Intermediário	0 (0,0)	11 (100,0)	11	
	Alto	4 (33,0)	8 (67,0)	12	
Invasão vascular	Não	6 (27,0)	16 (73,0)	22	0,646
	Sim	1 (14,0)	6 (86,0)	7	
Invasão perineural	Não	6 (35,0)	11 (65,0)	17	0,104
	Sim	1 (8,0)	12 (92,0)	13	
Linfonodo comprometido	Não	3 (30,0)	7 (70,0)	10	0,644
	Sim	3 (19,0)	13 (81,0)	16	

**Tabela 12** - Associação da expressão da proteína FAS com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	FAS		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
Gênero	Masculino	2 (15,0)	11 (85,0)	13	0,618
	Feminino	2 (9,0)	20 (91,0)	22	
Raça	Branca	3 (11,0)	25 (89,0)	28	0,500
	Não branca	1 (20,0)	4 (80,0)	5	
Idade	Menor ou igual a 40	2 (11,0)	16 (89,0)	18	>0,99
	Acima de 40	2 (12,0)	15 (88,0)	17	
	Parótida	4 (17,0)	19 (83,0)	23	
Local do tumor	Submandibular	0 (0,0)	9 (100,0)	9	0,522
	Glândulas salivares menores	0 (0,0)	3 (100,0)	3	

**Tabela 13** - Associação da expressão da proteína FAS com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide

Variável	Categoria	FAS		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	5 (26,0)	14 (74,0)	19	0,459
	Feminino	6 (43,0)	8 (57,0)	14	
<b>Raça</b>	Branca	10 (32,0)	21 (68,0)	31	>0,99
	Não branca	1 (50,0)	1 (50,0)	2	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	6 (46,0)	7 (54,0)	13	0,270
	Acima de 40	5 (25,0)	15 (75,0)	20	
	Parótida	6 (54,5)	5 (45,5)	11	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	1 (100,0)	1	0,356
	Sublingual	0 (0,0)	1 (100,0)	1	
	Glândulas salivares menores	5 (25,0)	15 (75,0)	20	
<b>Grau histológico</b>	Baixo	2 (17,0)	10 (83,0)	12	0,216
	Intermediário	4 (57,0)	3 (43,0)	7	
	Alto	5 (38,5)	8 (61,5)	13	
<b>Invasão vascular</b>	Não	7 (35,0)	13 (65,0)	20	0,348
	Sim	4 (67,0)	2 (33,0)	6	
<b>Invasão perineural</b>	Não	6 (40,0)	9 (60,0)	15	>0,99
	Sim	5 (42,0)	7 (58,0)	12	
<b>Linfonodo comprometido</b>	Não	8 (67,0)	4 (33,0)	12	0,680
	Sim	6 (54,5)	5 (45,5)	11	

**Tabela 14** - Associação da expressão da proteína FAS-L com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	FAS-L		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
Gênero	Masculino	13 (81,0)	3 (19,0)	16	0,316
	Feminino	30 (94,0)	2 (6,0)	32	
Raça	Branca	36 (90,0)	4 (10,0)	40	0,520
	Não branca	5 (83,0)	1 (17,0)	6	
Idade	Menor ou igual a 40	21 (95,5)	1 (4,5)	22	0,357
	Acima de 40	22 (85,0)	4 (15,0)	26	
	Parótida	26 (87,0)	4 (13,0)	30	
Local do tumor	Submandibular	11 (100,0)	0 (0,0)	11	0,511
	Glândulas salivares menores	6 (86,0)	1 (14,0)	7	

**Tabela 15** - Associação da expressão da proteína FAS-L com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide

Variável	Categoria	FAS-L		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
Gênero	Masculino	18 (86,0)	3 (14,0)	21	>,0,99
	Feminino	16 (89,0)	2 (11,0)	18	
Raça	Branca	32 (86,5)	5 (13,5)	37	>,0,99
	Não branca	2 (100,0)	0 (0,0)	2	
Idade	Menor ou igual a 40	13 (81,0)	3 (19,0)	16	0,631
	Acima de 40	21 (91,0)	2 (9,0)	23	
	Parótida	14 (93,0)	1 (7,0)	15	
Local do tumor	Submandibular	1 (100,0)	0 (0,0)	1	0,719
	Sublingual	1 (100,0)	0 (0,0)	1	
	Glândulas salivares menores	18 (82,0)	4 (18,0)	22	
Grau histológico	Baixo	12 (86,0)	2 (14,0)	14	0,285
	Intermediário	8 (80,0)	2 (20,0)	10	
Alto	Alto	14 (100,0)	0 (0,0)	14	0,550
	Não	20 (83,0)	4 (17,0)	24	
Invasão vascular	Sim	7 (100,0)	0 (0,0)	7	0,128
	Não	15 (79,0)	4 (21,0)	19	
Invasão perineural	Sim	13 (100,0)	0 (0,0)	13	0,056
	Não	8 (73,0)	3 (27,0)	11	
Linfonodo comprometido	Sim	16 (100,0)	0 (0,0)	16	

**Tabela 16** - Associação da expressão da proteína MUC-1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de adenoma pleomórfico

Variável	Categoria	MUC-1		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	1 (6,0)	16 (94,0)	17	>0,99
	Feminino	1 (3,0)	31 (97,0)	32	
<b>Raça</b>	Branca	0 (0,0)	40 (100,0)	40	0,149
	Não branca	1 (14,0)	6 (86,0)	7	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	1 (4,5)	21 (95,5)	22	>0,99
	Acima de 40	1 (4,0)	26 (96,0)	27	
	Parótida	1 (3,0)	29 (97,0)	30	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	11 (100,0)	11	0,349
	Glândulas salivares menores	1 (12,5)	7 (87,5)	8	

**Tabela 17** - Associação da expressão da proteína MUC-1 com características clínicas, demográficas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermoide

Variável	Categoria	MUC-1		Total	Valor de p
		Negativo (%)	Positivo (%)		
<b>Gênero</b>	Masculino	1 (5,0)	19 (95,0)	20	>0,99
	Feminino	1 (5,0)	18 (95,0)	19	
<b>Raça</b>	Branca	1 (3,0)	36 (97,0)	37	0,101
	Não branca	1 (50,0)	1 (50,0)	2	
<b>Idade</b>	Menor ou igual a 40	1 (6,0)	15 (94,0)	16	>0,99
	Acima de 40	1 (4,0)	22 (96,0)	23	
	Parótida	0 (0,0)	16 (100,0)	16	
<b>Local do tumor</b>	Submandibular	0 (0,0)	1 (100,0)	1	0,547
	Sublingual	0 (0,0)	1 (100,0)	1	
	Glândulas salivares menores	2 (9,5)	19 (90,5)	21	
<b>Grau histológico</b>	Baixo	13 (93,0)	1 (7,0)	14	>0,99
	Intermediário	11 (100,0)	0 (0,0)	11	
<b>Invasão vascular</b>	Alto	13 (93,0)	1 (7,0)	14	0,406
	Não	1 (4,0)	23 (96,0)	24	
<b>Invasão perineural</b>	Sim	1 (14,0)	6 (86,0)	7	0,502
	Não	2 (11,0)	17 (89,0)	19	
<b>Linfonodo comprometido</b>	Sim	0 (0,0)	13 (100,0)	13	0,157
	Não	2 (18,0)	9 (82,0)	11	
	Sim	0 (0,0)	16 (100,0)	16	

#### 4.4.3 Análise de sobrevida

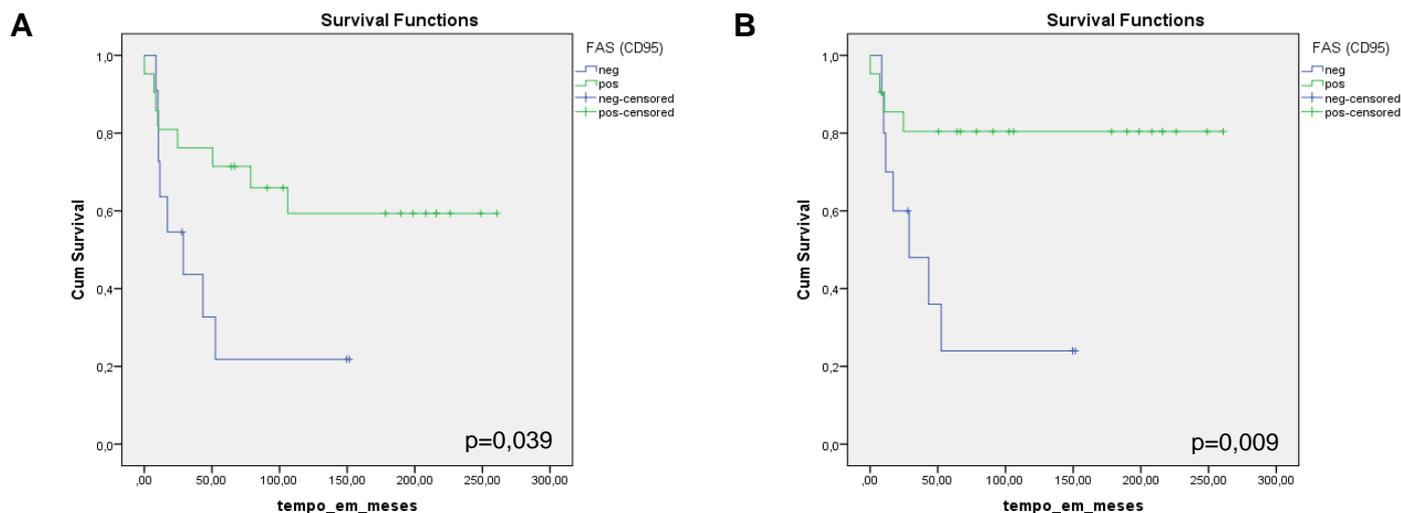
Considerando-se a análise de sobrevida, foi observado que expressão da proteína FAS e menor expressão de Ki-67 estavam associadas a melhores taxas de sobrevida global e câncer específica (Tabela 18; Figuras 7 e 8). Para a proteína PAR-4 não foi possível realizar a análise de sobrevida.

**Tabela 18** - Taxas de sobrevida global e câncer específica em pacientes com carcinoma mucoepidermóide, considerando-se a expressão das proteínas PHLDA1, MUC-1, SPARC, FAS, FAS-L e Ki-67

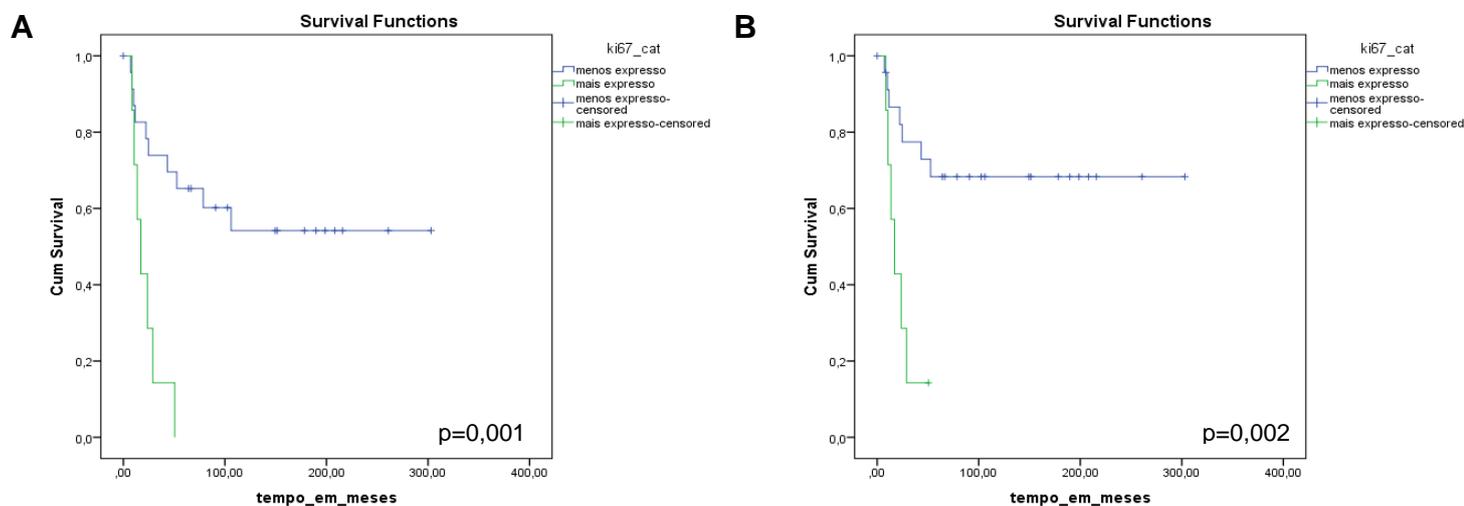
Proteína	Categoria	n	SG (5 anos)*	Valor de p	n	SCE (5 anos)*	Valor de p
<b>PHLDA1</b>	Negativo	7	28%	0,332	7	28%	0,139
	Positivo	28	55%		27	64%	
<b>MUC-1</b>	Negativo	2	50%	0,722	2	50%	0,884
	Positivo	35	53%		34	56%	
<b>SPARC</b>	Negativo	18	45%	0,705	18	51%	0,778
	Positivo	14	57%		13	61%	
<b>FAS (CD95)</b>	Negativo	11	22%	0,039	10	24%	0,009
	Positivo	21	71%		21	80%	
<b>FAS-L</b>	Negativo	32	49%	0,284	31	56%	0,524
	Positivo	5	75%		5	75%	
<b>Ki67**</b>	Menos expresso	24	65%	0,001	31	68%	0,002
	Mais expresso	7	0%		5	0%	

\*SG, sobrevida global; SCE, sobrevida câncer específica

\*\* , categorias de menos e mais expresso definidas pelo ponto de corte de 55,8 células positivas em 10 campos de grande aumento. Escolha do ponto de corte de Ki-67 com base no valor que maximiza a distância entre as curvas de sobrevida, considerando-se o evento morte por câncer



**Figura 7** - Curvas de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para a expressão da proteína FAS. A, sobrevida global: a taxa de sobrevida em 5 anos foi de 22,0% para pacientes negativos para FAS e 71,0% para pacientes positivos para FAS; B, sobrevida câncer específica: a taxa de sobrevida em 5 anos foi de 24,0% para pacientes negativos para FAS e 80,0% para pacientes positivos para FAS.



**Figura 8** - Curvas de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com maior ou menor expressão de Ki-67. A, sobrevida global: a taxa de sobrevida em 5 anos foi 65,0% para pacientes com menor expressão de Ki-67 e 0,0% para pacientes com maior expressão de Ki-67; B, sobrevida câncer específica: a taxa de sobrevida em 5 anos foi de 68,0% para pacientes com menor expressão de Ki-67 0,0% para pacientes com maior expressão de Ki-67.

## 5 DISCUSSÃO

Este estudo avaliou a expressão de marcadores de apoptose e de proliferação celular em tumores de glândula salivar, utilizando a técnica de imunohistoquímica, em casos de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide.

Os tumores de glândula salivar são raros e possuem uma ampla diversidade histológica, o que pode dificultar o diagnóstico dessas lesões. O adenoma pleomórfico e o carcinoma mucoepidermóide são os tumores benignos e malignos mais comuns das glândulas salivares, respectivamente. O manejo desses tumores é diferente sendo necessária a identificação de marcadores diagnósticos e prognósticos e que possam explicar sua diferente capacidade de invasão e comportamento biológico (JAAFARI-ASHKAVANDI et al. 2013; PARDIS et al. 2016).

Os mecanismos de apoptose são altamente complexos e dependem de uma série de eventos moleculares para ocorrerem. Existem duas principais vias de ativação da apoptose: a via do receptor de morte, também conhecida como via extrínseca e a via mitocondrial, também conhecida como via intrínseca, sendo que essas duas vias podem se interligar, ou seja, as moléculas de uma via podem influenciar a outra (IGNEY e KRAMMER 2002; ELMORE 2007).

A proteína **PAR-4** atua como supressora de tumor com funções intracelulares tanto no citoplasma e no núcleo. Estudos têm demonstrado

que a localização celular de PAR-4 determina sua função apoptótica, sendo assim, quando PAR-4 está localizada no citoplasma, não induz a apoptose, enquanto que sua translocação para o núcleo desencadeia a indução da apoptose (BURIKHANOV et al. 2009; HEBBAR et al. 2012; QINAN et al. 2014).

Nossos resultados demonstram que no adenoma pleomórfico a positividade para PAR-4 foi predominantemente nuclear enquanto que no carcinoma mucoepidermóide a marcação foi tanto nuclear como citoplasmática, sendo a marcação citoplasmática observada nas células diferenciadas (mucosas e epidermóides). MEYNIER et al. (2015) avaliou o papel da proteína PAR-4 em ovário, utilizando tecidos normais e tumorais, demonstrando que a expressão de PAR-4 ocorreu principalmente no citoplasma em tecidos normais e tanto no núcleo como no citoplasma em câncer de ovário de alto grau. COUTINHO-CAMILLO et al. (2013), avaliando a expressão de PAR-4 em amostras de carcinoma epidermóide oral, observaram marcação citoplasmática e/ou nuclear na maioria dos casos. Contudo, a expressão citoplasmática de PAR-4 estava associada à estágio clínico avançado, presença de metástase em linfonodo e invasão vascular e as taxas de sobrevida livre de doença eram melhores em pacientes com expressão nuclear de PAR-4.

A proteína **MUC-1** é uma glicoproteína que apresenta um papel importante na maturação das estruturas glandulares. Estudos em modelo animal e *in vitro* demonstraram um papel importante nos processos de regulação da proliferação, angiogênese, invasão, metástase e também na

evasão da apoptose, impedindo a ativação da via intrínseca da apoptose (NATH e MUKHERJEE et al. 2014). Alguns estudos sugerem que MUC-1 possa atuar como inibidor de E-caderina, o que poderia bloquear a necrose induzida por hipóxia e apoptose (WESSELING et al. 1996; YIN et al. 2007).

Nosso estudo demonstrou ampla expressão de MUC-1 tanto no adenoma pleomórfico quanto no carcinoma mucoepidermóide, não sendo observada nenhuma associação com características clínicas, demográficas e patológicas. LIU et al. (2014) avaliaram a expressão da proteína MUC-1 em 357 casos de carcinoma mucoepidermóide e observaram que o aumento da expressão de MUC-1 estava associado ao grau histológico (aumento progressivo da expressão concordante com o aumento do grau), estadió e presença de metástase em linfonodo, sugerindo um papel importante dessa proteína como um fator prognóstico nesses tumores. HAMADA et al. (2004) e SOARES et al. (2011) observaram alta expressão de MUC-1 em adenoma pleomórfico associada à recorrência e transformação maligna enquanto FERREIRA et al. (2014) observaram baixa expressão de MUC1 em adenoma pleomórfico, sugerindo benignidade.

A proteína **Ki-67** é um dos marcadores de proliferação celular mais utilizados. Em nosso estudo, foi observada a expressão de Ki-67 em padrão nuclear: positividade observada nas células intermediárias e epidermóides nos casos de carcinoma mucoepidermóide e positividade observada nas células mioepiteliais nos casos de adenoma pleomórfico. BAGULKAR et al. (2015) demonstraram expressão de Ki-67 em 40% dos tumores benignos e 48% dos tumores malignos das glândulas salivares. A expressão foi

observada tanto nas células epiteliais como células mioepiteliais. FAUR et al. (2015) avaliaram a atividade proliferativa de Ki-67 em tumores de glândulas salivares onde demonstraram que 65% dos tumores benignos foram imunopositivos e 80% dos tumores malignos imunopositivos. DO PRADO et al. (2011) também observaram taxa de proliferação (expressão de Ki-67) maior em tumores malignos quando comparado a tumores benignos. Já MARIANO et al. (2015) observaram que o índice proliferativo de carcinoma ex-adenoma pleomórfico, determinado por Ki-67, é superior ao observado em adenoma pleomórfico e em regiões residuais de adenoma pleomórfico no carcinoma ex-adenoma pleomórfico, sugerindo que o índice proliferativo determinado por Ki-67 é útil para o diagnóstico diferencial de adenoma pleomórfico e carcinoma ex-adenoma pleomórfico.

A expressão de Ki-67 tem sido utilizada como um marcador prognóstico em diversos tipos de tumores como tumores serosos de ovário, carcinoma de pulmão não pequenas-células, carcinoma colorretal, carcinoma do endométrio, e carcinomas epidermóides orais (KHALIFEH et al. 2005). Em nosso estudo foi observada uma maior expressão de Ki-67 em amostras de carcinoma mucoepidermóide, sendo essa expressão associada a presença de metástase em linfonodos. Pacientes com carcinoma mucoepidermóide e alta expressão de Ki-67 também apresentam piores taxas de sobrevida global e câncer específica, sugerindo que a expressão de Ki-67 esteja associada a um comportamento mais agressivo no carcinoma mucoepidermóide.

A proteína **SPARC** interage com proteínas de matriz extracelular, participando de diversas funções celulares (BOZKURT et al. 2009). Alterações na proliferação, migração, sobrevivência das células tumorais, invasão tumoral, metástase, angiogênese e também na inflamação podem ser induzidas por SPARC (CHLENSKI e COHN 2010; BRADSHAW et al. 2012). Em nosso estudo, a proteína SPARC foi mais expressa nos casos de adenoma pleomórfico: nos casos de carcinoma mucoepidermóide a positividade foi observada nas células de suporte do tumor e nos casos de adenoma pleomórfico a positividade foi observada nas células mioepiteliais. Expressão de SPARC também foi associada a carcinoma mucoepidermóide de baixo grau histológico. Em carcinoma epidermóide oral, AQUINO et al. (2013) observaram associação da expressão estromal de SPARC a tumores pouco diferenciados e em tumores cervicais maior expressão de SPARC estava associada com tumores pouco diferenciados, estadio avançado e presença de metástase em linfonodos (SHI et al. 2016).

YIU et al. (2001) demonstraram que a expressão de SPARC pode ser regulada negativamente no câncer de ovário: expressão de SPARC inibiu a proliferação e induziu a apoptose em células de câncer de ovário. Já BHOOPATHI et al. (2010) demonstraram inibição do crescimento tumoral *in vivo* em linhagem de meduloblastoma, sendo esse efeito associado à atividade anti-angiogênica promovida pelo aumento da expressão de SPARC.

A proteína **PHLDA1** é expressa em uma ampla gama de tecidos normais e neoplásicos, sendo que sua função varia conforme o tipo de célula

(NEEF et al. 2002; NAGAI et al. 2007). Muitos estudos relatam que PHLDA1 pode ter um papel pró-apoptótico ou anti-proliferativo (PARK et al. 1996; TOYSHIMA et al. 2004; OBERST et al. 2008; ZHAO et al. 2015). MURATA et al. (2014) demonstraram que PHLDA1 atua como uma proteína supressora da apoptose: experimentos de *knockdown* de PHLDA1 levaram a um aumento de caspase 3 e indução da apoptose em linhagem celular de câncer de língua SCC-25. Outros estudos têm demonstrado aumento da expressão de PHLDA1 durante a apoptose (PARK et al. 1996; HOSSAIN et al. 2003; JOO et al. 2007).

Nosso estudo demonstrou maior expressão de PHLDA em adenoma pleomórfico quando comparado com carcinoma mucoepidemóide. Contudo esse resultado deve ser considerado com cautela devido à ausência de casos de adenoma pleomórfico negativos para essa proteína. COUTINHO-CAMILLO et al. (2013) avaliaram a expressão de PHLDA1 em amostras de carcinoma epidermóide oral e observaram baixa expressão dessa proteína, principalmente nos tumores bem diferenciados. A ausência de expressão de PHLDA1 estava associada a melhores taxas de sobrevida global e livre de doença.

**FAS** e **FAS-L** são proteínas transmembranas que pertencem à família do fator de necrose tumoral, regulando a ativação da morte celular e o microambiente tumoral, incluindo o sistema imune e a matriz extracelular (IGNEY e KRAMMER 2005; ALMENDRO et al. 2009). É sugerido que a diminuição da expressão de FAS protegeria as células tumorais da eliminação pela resposta imune enquanto que o aumento da expressão de

FAS-L poderia aumentar a capacidade das células tumorais em contra-atacar o sistema imune (REICHMANN 2002).

Neste estudo, a expressão da proteína FAS-L foi observada em raras células, em ambos os tumores enquanto FAS foi mais expressa nos casos de adenoma pleomórfico quando comparado com os casos de carcinoma mucoepidermóide. Os pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos para FAS apresentaram melhores taxas de sobrevida global e câncer específica. ASENSIO et al. (2007) também observaram melhores taxas de sobrevida em pacientes com expressão de FAS em carcinoma epidermóide de laringe. SAIGUSA et al. (2015) avaliaram a expressão de FAS e FAS-L em pacientes com carcinoma epidermoide de esôfago, observando uma expressão elevada de FAS-L e diminuição da expressão de FAS, relatando que a alta expressão de FAS-L pode estar associada com mau prognóstico.

De forma geral, quando comparamos nossos resultados com os dados descritos na literatura, observamos alguns resultados contraditórios. Isso pode ser explicado pelo uso de diferentes clones de anticorpos e diferentes formas de avaliação da reação imunoistoquímica. É importante também considerar o número de amostras avaliadas em cada estudo como também a localização dos tumores (glândulas salivares maiores ou menores). Outra questão a ser considerada no caso das proteínas FAS/FAS-L é que consideramos apenas marcação na membrana enquanto alguns estudos também consideram marcação citoplasmática.

Em resumo, as proteínas SPARC e FAS foram mais expressas nas amostras de adenoma pleomórfico enquanto Ki-67 foi mais expressa nas

amostras de carcinoma mucoepidermóide. A associação entre a expressão da proteína SPARC e tumores de baixo grau histológico e expressão da proteína Ki-67 com a presença de metástase em linfonodo em amostras de carcinoma mucoepidermóide bem como a associação entre a expressão da proteína FAS e menor expressão da proteína Ki-67 e melhores taxas de sobrevida global e câncer específica em amostras de carcinoma mucoepidermóide sugerem que essas proteínas possam apresentar um valor prognóstico nesses tumores.

## 6 CONCLUSÕES

- As proteínas PAR-4, PHLDA1, MUC-1, SPARC, Ki-67, FAS e FAS-L foram expressas nas amostras de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermóide
- As proteínas PAR-4 e MUC-1 foram predominantemente positivas em ambos os tumores e a proteína FAS-L foi predominantemente negativa em ambos os tumores. As proteínas SPARC, PHLDA1 e FAS foram estatisticamente mais expressas nas amostras de adenoma pleomórfico e a proteína Ki-67 foi estatisticamente mais expressa nas amostras carcinoma mucoepidermóide
- Foi observada associação entre a expressão da proteína SPARC e tumores de baixo grau histológico e expressão da proteína Ki-67 com a presença de metástase em linfonodo em amostras de carcinoma mucoepidermóide
- Foi observada associação entre a expressão da proteína FAS e menor expressão da proteína Ki-67 e melhores taxas de sobrevida global e câncer específica em amostras de carcinoma mucoepidermóide

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acasigua GA, Warner KA, Nör F, et al. BH3-mimetic small molecule inhibits the growth and recurrence of adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2015; 51:839-47.

Alaizari NA, Tarakji B, Al-Maweri SA, Al-Shamiri HM, Darwish S, Baba F. p53 expression in pleomorphic adenoma of salivary glands: a systematic review and meta-analysis. **Arch Oral Biol** 2015; 60:1437-41.

Almendro V, Ametller E, García-Recio S, et al. The role of MMP7 and its cross-talk with the FAS/FASL system during the acquisition of chemoresistance to oxaliplatin. **PLoS One** 2009; 4:e4728.

Alves FA, Perez DE, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg** 2002; 128:1400-3.

Alves FA, Pires FR, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2004; 33:593-7.

Andrew DJ, Ewald AJ. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. **Dev Biol** 2010; 341:34-55.

Aoki T, Tsukinoki K, Karakida K, Ota Y, Otsuru M, Kaneko A. Expression of cyclooxygenase-2, Bcl-2 and Ki-67 in pleomorphic adenoma with special reference to tumor proliferation and apoptosis. **Oral Oncol** 2004; 40:954-9.

Aquino G, Sabatino R, Cantile M, et al. Expression analysis of SPARC/osteonectin in oral squamous cell carcinoma patients: from saliva to surgical specimen. **Biomed Res Int** 2013; 2013:736438.

Asensio C, Zapata A, García-Ahijado J, Gil B, Salvadores P, Schneider J. Fas expression is associated with a better prognosis in laryngeal squamous cell carcinoma. **Anticancer Res** 2007; 27:4083-6.

Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. **Cancer** 1992; 69:2021-30.

Bagulkar BB, Gawande M, Chaudhary M, Gadbail AR, Patil S, Bagulkar S. XIAP and Ki-67: A correlation between antiapoptotic and proliferative marker expression in benign and malignant tumours of salivary gland: an immunohistochemical study. **J Clin Diagn Res** 2015; 9:EC01-4.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **Pathology and genetics of head and neck tumours: salivary glands**. 3<sup>rd</sup> ed. Lyon: IARC; 2005. (WHO Classification of Tumours, v.9, IARC WHO Classification of Tumours, n<sup>o</sup> 9)

Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Dinh DH, Rao JS, Lakka S. Cathepsin B facilitates autophagy-mediated apoptosis in SPARC overexpressed primitive neuroectodermal tumor cells. **Cell Death Differ** 2010; 17:1529-39.

Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Curr Opin Cell Biol** 2002; 14:608-16.

Bozkurt SU, Ayan E, Bolukbasi F, Elmaci I, Pamir N, Sav A. Immunohistochemical expression of SPARC is correlated with recurrence, survival and malignant potential in meningiomas. **Apmis** 2009; 117:651-9.

Bradshaw AD. Diverse biological functions of the SPARC family of proteins. **Int J Biochem Cell** 2012; 44:480–8.

Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. **Am J Surg Pathol** 2001; 25:835-45.

Brekken RA, Sage EH. SPARC, a matricellular protein: at the crossroads of cell-matrix communication. **Matrix Biol** 2001; 19:816-27.

Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, Luo X, Wang X. Biochemical pathways of caspase activation during apoptosis. **Annu Rev Cell Dev Biol** 1999; 15:269-90.

Burikhanov R, Zhao Y, Goswami A, et al. PAR-4 activates an extrinsic pathway for apoptosis. **Cell** 2009; 138:377-88.

Castedo M, Perfettini JL, Roumier T, Andreau K, Medema R, Kroemer G. Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition. **Oncogene** 2004; 23:2825-37.

Chlenski A, Cohn SL. Modulation of matrix remodeling by SPARC in neoplastic progression. **Semin CellDev Biol** 2010; 21:55-65.

Chung S, Andrew DJ. The formation of epithelial tubes. **J Cell Sci** 2008; 121:3501-4.

Cook J, Krishnan S, Ananth S, Sells SF, Shi Y, et al. Decreased expression of the pro-apoptotic protein Par-4 in renal cell carcinoma. **Oncogene** 1999; 18:1205-208.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nonogaki S, et al. Expression of PAR-4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas. **Virchows Arch** 2013; 463:31-9.

Dale AC. Salivary gland. In: Ten Cate AR, editor. **Oral histology**. 4<sup>th</sup> ed. St. Louis: Mosby; 1994. p.312-33.

Davidson WF, Haudenschild C, Kwon J, Williams MS. T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent. **J Immunol** 2002; 169:6218-30.

Diaz-Meco MT, Lallena MJ, Monjas A, Frutos S, Moscat J. Inactivation of the inhibitory kappaB protein kinase/nuclear factor kappaB pathway by Par-4 expression potentiates tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis. **J Biol Chem** 1999; 274:19606-12.

do Prado RF, da Silva Machado AL, Colombo CE, Carvalho YR. Immunohistochemical study of the expression of fatty acid synthase and Ki-67 in salivary gland tumors. **J Oral Pathol Med** 2011; 40:467-75.

Ebrahimi A, Honegger J, Schluesener H, Schittenhelm J. Osteonectin expression in surrounding stroma of craniopharyngiomas: association with recurrence rate and brain infiltration. **Int J Surg Pathol** 2013; 21:591-8.

Ellis GL, Auclair PL. **Tumors of the salivary gland**. Washington DC: American Registry of Pathology and Armed Forces Institute of Pathology; 2008. The normal salivary gland; p.1-24. (Atlas of Tumor Pathology: Third Series, Fascicle 17 G)

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. **Toxicol Pathol** 2007; 35:495-516.

Faur AC, Sas I, Motoc AG, et al. Ki-67 and p53 immunostaining assessment of proliferative activity in salivary tumors. **Rom J Morphol Embryol** 2015; 56:1429-39.

Ferreira CG, van der Valk P, Span SW, et al. Expression of X-linked inhibitor of apoptosis as a novel prognostic marker in radically resected non-small cell lung cancer patients. **Clin Cancer Res** 2001; 7:2468-74.

Ferreira JC, Morais MO, Elias MR, Batista AC, Leles CR, Mendonça EF. Pleomorphic adenoma of oral minor salivary glands: an investigation of its neoplastic potential based on apoptosis, mucosecretory activity and cellular proliferation. **Arch Oral Biol** 2014; 59:578-85.

Franchitto A, Torrice A, Semeraro R, et al. Prostate apoptosis response-4 is expressed in normal cholangiocytes, is down-regulated in human cholangiocarcinoma, and promotes apoptosis of neoplastic cholangiocytes when induced pharmacologically. **Am J Pathol** 2010; 177:1779-90.

Gomes I, Xiong W, Miki T, Rosner MR. A proline and glutamine-rich protein promotes apoptosis in neuronal cells. **J Neurochem** 1999; 73:612-22.

Gonçalves CF, Morais MO, Alencar Rde C, et al. Expression Of Ki-67 and MUC1 in mucoepidermoid carcinomas of young and adult patients: prognostic implications. **Exp Mol Pathol** 2011; 90:271-5.

Gorantla B, Bhoopathi P, Sailaja GS, et al. SPARC overexpression inhibits cell proliferation in neuroblastoma and is partly mediated by tumor suppressor protein PTEN and AKT. **PLoS One** 2012; 7:e36093.

Goswami A, Ranganathan P, Rangnekar VM. The phosphoinositide 3-kinase/Akt1/Par-4 axis: a cancer-selective therapeutic target. **Cancer Res** 2006; 66:2889-92.

Grivicich I, Regner A, Zanoni C, et al. Hsp70 response to 5-fluorouracil treatment in human colon cancer cell lines. **Int J Colorectal Dis** 2007; 22:1201-8.

Hamada T, Matsukita S, Goto M, et al. Mucin expression in pleomorphic adenoma of salivary gland: a potential role for MUC1 as a marker to predict recurrence. **J Clin Pathol** 2004; 57:813-21.

Hand JS, Whitehill JM. The prevalence of oral mucosal lesions in an elderly population. **J Am Dent Assoc** 1986; 112:73-6.

Hayashida S, Inouye S, Fujimoto M, et al. A novel HSF1-mediated death pathway that is suppressed by heat shock proteins. **EMBO J** 2006; 25:4773-83.

Hebbar CN, Wang C, Rangnekar VM. Mechanisms of apoptosis by the tumor suppressor PAR-4. **J Cell Physiol** 2012; 227:3715-21

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 2000; 407:770-6.

Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. **Oral Oncol** 2000; 36:454-60.

Holmberg KV, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis, and regeneration of salivary glands. **Monogr Oral Sci** 2014; 24:1-13.

Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. **Cell Adh Migr** 2013; 7:187-98.

Hossain GS, van Thienen JV, Werstuck GH, et al. TDAG51 is induced by homocysteine, promotes detachment-mediated pro-programmed cell death, and contributes to the development of atherosclerosis in hyperhomocysteinemia. **J Biol Chem** 2003; 278:30317-27.

Hwa JS, Kwon OJ, Park JJ, et al. The prognostic value of immunohistochemical markers for oral tongue squamous cell carcinoma. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2015; 272:2953-9.

Ianez RC, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Pinto CA, Soares FA, Lourenco SV. CD24 and CD44 in salivary gland pleomorphic adenoma and in human salivary gland morphogenesis: differential markers of glandular structure or stem cell indicators? **Histopathology** 2013; 62:1075-82.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. **Nat Rev Cancer** 2002; 2:277-88.

Igney FH, Krammer PH. Tumor counterattack: fact or fiction? **Cancer Immunol Immunother** 2005; 54:1127-36.

Irby RB, Kline CL. Par-4 as a potential target for cancer therapy. **Expert Opin Ther Targets** 2013; 17:77-87.

Jaafari-Ashkavandi Z, Ashraf MJ, Moshaverinia M. Salivary gland tumors: a clinicopathologic study of 366 cases in southern Iran. **Asian Pac J Cancer Prev** 2013; 14:27-30.

Jaskoll T, Chen H, Zhou YM, Wu D, Melnick M. Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development **BMC Dev Biol** 2001; 1:5.

Joo JH, Liao G, Collins JB, Grissom SF, Jetten AM. Farnesol- induced apoptosis in human lung carcinoma cells is coupled to the endoplasmic reticulum stress response, **Cancer Res** 2007; 67:7929-36.

Ju ST, Panka DJ, Cui H, et al. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. **Nature** 1995; 373:444-8.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 10ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Órgãos associados ao trato digestivo; p.312-5.

Khalifeh I, Munkarah AR, Schimp V, Morris R, Lawrence WD, Ali-Fehmi R. The impact of c-kit and ki-67 expression on patients prognosis in advanced ovarian serous carcinoma. **Int J Gynecol Pathol** 2005; 24:228-34.

Lima RA, Tavares MR, Dias FL, et al. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2005; 133:702-8.

Lingam RK, Dagher AA, Nigar E, Abbas SA, Kumar M. Pleomorphic adenoma (benign mixed tumour) of the salivary glands: its diverse clinical, radiological, and histopathological presentation. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2011; 49:1-20.

Liu S, Ruan M, Li S, Wang L, Yang W. Increased expression of MUC1 predicts poor survival in salivary gland mucoepidermoid carcinoma. **J Craniomaxillofac Surg** 2014; 42:1891-6.

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grénman R. Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. **Acta Oncol** 2006; 45:669-75.

Mariano FV, Costa AF, Gondak RO, Martins AS, Del Negro A, Tincani ÁJ, Altemani A, de Almeida OP, Kowalski LP. Cellular Proliferation Index between Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma and Pleomorphic Adenoma. **Braz Dent J** 2015; 26:416-21.

McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and secreted protein acidic and rich in cysteine (SPARC). **J Mol Cell Cardiol** 2010; 48:544-9.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer** 2012; 118:3928-36.

Melnick M, Jaskoll T. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. **Crit Rev Oral Biol Med** 2000, 11:199-215.

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, et al. Salivary gland pleomorphic adenoma. **Am J Clin Oncol** 2008; 31:95-9.

Meynier S, Kramer M, Ribaux P, Tille JC, Delie F, Petignat P, Cohen M. Role of PAR-4 in ovarian cancer. **Oncotarget** 2015; 6:22641-52.

Mocellin S. Targeting death receptors to fight cancer: from biological rationale to clinical implementation. **Curr Med Chem** 2010; 17:2713-28.

Moniaux N, Escande F, Porchet N. Structural organization and classification of the human mucin genes. **Front Biosci** 2001; 1:1192-206.

Murata T, Sato T, Kamoda T, Moriyama H, Kumazawa Y, Hanada N. Differential susceptibility to hydrogen sulfide-induced apoptosis between PHLDA1-overexpressing oral cancer cell lines and oral keratinocytes: role of PHLDA1 as an apoptosis suppressor. **Exp Cell Res** 2014; 320:247-57.

Nagai MA, Fregnani JH, Netto MM, Brentani MM, Soares FA. Downregulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 106:49-56.

Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, et al. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR-4 is associated with poor prognosis in breast cancer. **Int J Oncol** 2010; 37:41-9.

Nagai MA, Gerhard R, Fregnani JH, et al. Prognostic value of NDRG1 and SPARC protein expression in breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat** 2011; 126:1-14.

Nagai MA. Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. **Biomed Rep** 2016; 4:275-81.

Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. **Trends Mol Med** 2014; 20:332-42.

Neef R, Kuske MA, Pröls E, Johnson JP. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. **Cancer Res** 2002; 62:5920-9.

Nicholson DW. From bench to clinic with apoptosis-based therapeutic agents. **Nature** 2000; 407:810-6.

Oberst MD, Beberman SJ, Zhao L, Yin JJ, Ward Y, Kelly K. TDAG51 is an ERK signaling target that opposes ERK-mediated HME16C mammary epithelial cell transformation. **BMC Cancer** 2008; 8:189.

Ogawa AI, Takemoto LE, Navarro PL, Heshiki RE. Salivary gland neoplasm. **Int Arch Otorhinolaringol** 2008; 12:409-18.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. **Nat Rev Cancer** 2004; 4:592-603.

Pardis S, Zare R, Jaafari-Ashkavandi Z, Ashraf MJ, Khademi B. Twist expression in pleomorphic adenoma, adenoid cystic carcinoma and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. **Turk Patoloji Derg** 2016; 32:15-21.

Park CG, Lee SY, Kandala G, Lee SY, Choi Y. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. **Immunity** 1996; 4:583-91.

Parrino J, Hotchkiss RS, Bray M. Prevention of immune cell apoptosis as potential therapeutic strategy for severe infections. **Emerg Infect Dis** 2007; 13:191-8.

Patel VN, Rebutini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. **Differentiation** 2006; 74:349-64.

Perez DEC, Pires FR, Alves FA, Almeida OP, Kowalski LP. Salivary gland tumors in children and adolescents: a clinicopathologic and immunohistochemical study of fifty three cases. **Int J Pediatr Otorhinolaryngol** 2004; 68:895-902.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. **Ann Oncol** 2004; 15:1319-29.

Pradhan S, Liu C, Zhang C, Jia X, Farach-Carson MC, Witt RL. Lumen formation in three-dimensional cultures of salivary acinar cells. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2010; 142:191-5.

Qinan W, Ling Z, Bing C. PAR-4: a possible new target for age-related disease. **Expert Opin Ther Targets** 2014; 18:917-27.

Qiu G, Ahmed M, Sells SF, et al. Mutually exclusive expression patterns of Bcl-2 and Par-4 in human prostate tumors consistent with down-regulation of Bcl-2 by Par-4. **Oncogene** 1999; 18:623-31.

Ramaswamy M, Cleland SY, Cruz AC, Siegel RM. Many checkpoints on the road to cell death: regulation of Fas–FasL interactions and Fas signaling in peripheral immune responses. **Results Probl Cell Differ** 2009; 49:17-47.

Ramp U, Krieg T, Caliskan E, et al. XIAP expression is an independent prognostic marker in clear-cell renal carcinomas. **Hum Pathol** 2004; 35:1022-8.

Raubenheimer EJ, van Nickerk JP, Hauman CH. Salivary myoepithelium: distribution, structure, functions and pathologic proliferations. **J Dent Assoc S Afr** 1987; 42:631-7.

Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. **Microsc Res Tech** 1994; 27:25-45.

Reichmann E. The biological role of the Fas/FasL system during tumor formation and progression. **Semin Cancer Biol** 2002; 12:309-15.

Ricci MS, Zong WX. Chemotherapeutic approaches for targeting cell death pathways. **Oncologist** 2006; 11:342-57

Saigusa S, Tanaka K, Ohi M, et al. Clinical implications of Fas/Fas ligand expression in patients with esophageal squamous cell carcinoma following neoadjuvant chemoradiotherapy. **Mol Clin Oncol** 2015; 3:151-6.

Sells SF, Wood DP Jr, Joshi-Barve SS, et al. Commonality of the gene programs induced by effectors of apoptosis in androgen-dependent and -independent prostate cells. **Cell Growth Differ** 1994; 5:457-66.

Shi D, Jiang K, Fu Y, Fang R, Liu XI, Chen J. Overexpression of SPARC correlates with poor prognosis in patients with cervical carcinoma and regulates cancer cell epithelial-mesenchymal transition. **Oncol Lett** 2016; 11:3251-8.

Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular Par-4. **Oncogene** 2010; 29:3873-80.

Siyi L, Shengwen L, Min R, Wenjun Y, Lizheng W, Chenping Z. Increased expression of MUC-1 has close relation with patient survivor in high-grade salivary gland mucoepidermoid carcinoma. **J Oral Pathol Med** 2014; 43:579-84.

Soares AB, Demasi AP, Altemani A, de Araújo VC. Increased mucin 1 expression in recurrence and malignant transformation of salivary gland pleomorphic adenoma. **Histopathology** 2011; 58:377-82.

Soini Y, Törmänen U, Pääkkö P. Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not to bax expression in salivary gland tumours. **Histopathology** 1998; 32:28-34.

Stenner M, Weinell A, Ponert T, et al. Cytoplasmic expression of survivin is an independent predictor of poor prognosis in patients with salivary gland cancer. **Histopathology** 2010; 57:699-706.

Stranges PB, Watson J, Cooper CJ, et al. Elimination of antigen-presenting cells and autoreactive T cells by fas contributes to prevention of autoimmunity. **Immunity** 2007; 26:629-41.

Taylor RC, Cullen SP, Martin SJ. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2008; 9:231-41.

Teshima TH, Ianez RF, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Soares FA, Lourenço SV. Development of human minor salivary glands: expression of mucins according to stage of morphogenesis. **J Anat** 2011; 219:410-7.

Tongue CH, Luke DA. Dental anatomy: the salivary glands. **Dent Update** 1984; 11:264-70.

Toyoshima Y, Karas M, Yakar S, Dupont J, Lee Helman, LeRoith D. TDAG51 mediates the effects of insulin-like growth factor I (IGF-I) on cell survival. **J Biol Chem** 2004; 279:25898-904.

Vargas PA, Cheng Y, Barrett AW, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm-2, Ki-67 and geminin in benign and malignant salivary gland tumours. **J Oral Pathol Med** 2008; 37:309-18.

Vasconcelos AC, Wagner VP, Meurer L, et al. Immunoprofile of c-MET/PI3K signaling in human salivary gland tumors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol** 2015; 120:238-47.

Wesseling J, van der Valk SW, Hilkens J. A mechanism for inhibition of e-cadherin-mediated cell-cell adhesion by the membrane associated mucinepsialin/muc1. **Mol Biol Cell** 1996; 7:565-77.

Yin L, Kharbanda S, Kufe D. Mucin 1 oncoprotein blocks hypoxia-inducible factor 1alpha activation in a survival response to hypoxia. **J Biol Chem** 2007; 282:257-66.

Yiu GK, Chan WY, Ng SW, et al. SPARC (secreted protein acidic and rich in cysteine) induces apoptosis in ovarian cancer cells. **Am J Pathol** 2001; 159:609-22.

Zhang Y, Li D, Zhao X, et al. Decoy receptor 3 suppresses FasL-induced apoptosis via ERK1/2 activation in pancreatic cancer cells. **Biochem Biophys Res Commun** 2015; 7:1144-51.

Zhao P, Lu Y, Liu L. Correlation of decreased expression of PHLDA1 protein with malignant phenotype of gastric adenocarcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:5230-5.

Zhao Y, Rangnekar VM. Apoptosis and tumor resistance conferred by Par-4. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:1867-74.

Ziegler U, Groscurth P. Morphological features of cell death. **News Physiol Sci** 2004; 19:124-8.

## Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo  
Cancer Center**

Comitê de Ética em  
Pesquisa - CEP

São Paulo, 07 de agosto de 2013.

A

**Dra. Claudia Malheiros Coutinho Camillo.**

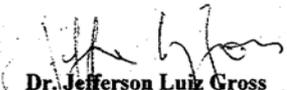
**Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1578/11D**

**“Apoptose nas glândulas salivares humanas: Avaliação de marcadores na morfogênese e no processo de tumorigênese da glândula utilizando como modelos adenoma pleomórfico e o carcinoma mucoepidermóide”.**

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 06/08/2013, **tomaram conhecimento e aprovaram** o seguinte documento:

- Solicitação de dispensa de análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Avaliação de marcadores de apoptose durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas”, registrado no CEP sob nº 1578/11. O presente projeto afiliado será trabalho de Treinamento Técnico Nível III da aluna Gabriela Madureira da Silva.

Atenciosamente,



**Dr. Jefferson Luiz Gross**

**1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**

**Anexo 2 – Expressão das proteínas PAR-4, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L, MUC-1 e Ki-67 em amostras de adenoma pleomórfico (AP) e carcinoma mucoepidermóide (MEC)**

<b>Amostras</b>	<b>PAR-4*</b>	<b>PHLDA1</b>	<b>SPARC</b>	<b>FAS</b>	<b>FAS-L</b>	<b>MUC-1</b>	<b>Ki-67**</b>
AP1	1	1	1		1	1	8,0
AP2	1	1	1	0	0	1	1,8
AP3	1	1	1	1	0	1	14,9
AP4	1	1	1			0	23,9
AP5	1	1	1		0	1	5,0
AP6	0	1	1		0	1	
AP7	1	1		1	0	1	7,9
AP8	1	1	1	1	0	1	1,5
AP9	1	1	1		0	1	3,7
AP10	1	1	0		0	1	7,6
AP11	1	1	1	1	0	1	2,1
AP12	1	1	1	1	0	1	0,9
AP13	1	1	1	1	0	1	1,3
AP14	1		1	1	0	1	8,8
AP15	1	1	1		0	1	19,8
AP16	1	1	1	1	0	1	5,6
AP17	1	1		1	0	1	17,9
AP18	1	1	1	1	0	1	6,8
AP19	1	1	1	1	0	1	3,0
AP20	1	1	1	1	0	1	1,2
AP21	1	1	1	1	0	1	5,3
AP22	1	1	0	1	0	1	1,2
AP23	1	1	1	1	0	1	0,4
AP24	1	1		1	0	1	5,5
AP25	1			1	0	1	0,1
AP26	1	1	1	1	0	1	5,7
AP27	1	1	0	1	0	1	2,4
AP28	1	1	1		0	1	
AP29	1	1	1	1	0	1	
AP30	1	1	1	1	0	1	10,2
AP31	1	1			0	1	0,0
AP32	1	1	0	0	0	1	1,7
AP33	1	1	1	1	1	1	3,8
AP34	1	1	0	1	1	1	0,0
AP35	1	1	1	1	0	0	0,7

Amostras	PAR-4*	PHLDA1	SPARC	FAS	FAS-L	MUC-1	Ki-67**
AP36	1	1	1		0	1	0,9
AP37	1	1	0	1	0	1	4,6
AP38	1	1	1	1	0	1	2,0
AP39	1	1	1	0	0	1	0,1
AP40	1	1	1		0	1	2,1
AP41	1	1	1	1	1	1	0,8
AP42	1	1	0		0	1	9,0
AP43	1	1	0	0	0	1	0,5
AP44	1	1	1		1	1	0,4
AP45	1	1	1	1	0	1	
AP46	1	1	1	1	0	1	2,5
AP47	1	1	0	1	0	1	54,3
AP48	1	1	1	1	0	1	0,2
AP49	1	1	1		0	1	1,0
MEC1	1	1	1	1	1	1	0,7
MEC2	1	1			0	1	16,5
MEC3	1	1		0	0	1	101,2
MEC4	1	0	0		0	1	146,9
MEC5	1	1		1	0	1	41,0
MEC6	1	1			0	1	50,3
MEC7	1	1	0	1	0	1	
MEC8	1	1	1			1	
MEC9	1	1		1	0	1	
MEC10	1	1	1	1	0	1	1,0
MEC11	1				0	1	
MEC12	1	1	1	1	0	1	3,6
MEC13	1		0	1	0	1	5,9
MEC14	1	1	0	1	0		55,8
MEC15	1	1	0	0	0	1	85,5
MEC16	1	1	0	0	0	1	19,3
MEC17	1	1	1	1	0	1	
MEC18	1	1	1	1	0	1	14,9
MEC19	1		0	1	1	1	
MEC20	1	1	0	1	0	1	0,4
MEC21	1	1	1	0	0	0	4,5
MEC22	1	1	0	1	0	1	4,3
MEC23	1	1	1	1	0	1	61,9
MEC24	1	1	1	0	0	1	
MEC25	1	0	1	1	0	1	9,5
MEC26	1	1		1	0	1	26,3

<b>Amostras</b>	<b>PAR-4*</b>	<b>PHLDA1</b>	<b>SPARC</b>	<b>FAS</b>	<b>FAS-L</b>	<b>MUC-1</b>	<b>Ki-67**</b>
<b>MEC27</b>	1	1	1	1	1	1	23,9
<b>MEC28</b>	1	1	0		1	1	2,6
<b>MEC29</b>	1	1	0	0	0	1	
<b>MEC30</b>	1	0	0	1	0	1	0,0
<b>MEC31</b>	1	0	0	0	0	0	38,0
<b>MEC32</b>	1	1	0	0	0	1	4,4
<b>MEC33</b>	1	0	1	1	0	1	0,7
<b>MEC34</b>	1	0	0	1	0	1	40,5
<b>MEC35</b>	1	1	0	1	0	1	3,4
<b>MEC36</b>	1	0	1		0	1	87,5
<b>MEC37</b>	1	1	1	0	1	1	3,2
<b>MEC38</b>	1		0	0	0	1	78,2
<b>MEC39</b>	1	1	0	0	0	1	22,1
<b>MEC40</b>	1	1	1	1	0	1	0,0

\*, 0 negativo; 1 positivo

\*\*, média do número de células positivas em 10 campos de grande aumento