

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Daniela Cotta Ribeiro

**Avaliação da imunoexpressão de
proteínas da apoptose em
neoplasias de glândulas salivares**

Belo Horizonte

2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Daniela Cotta Ribeiro

Avaliação da imunexpressão de proteínas da apoptose
em neoplasias de glândulas salivares

Tese apresentada ao Colegiado de Pós-
graduação em Odontologia da UFMG como
requisito parcial para a obtenção do título de
Doutor em Odontologia.

Área de concentração em Patologia Bucal.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Belo Horizonte

2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Mozart e Mazzarello pela inesgotável fonte de incentivo e amor. Aos meus irmãos e cunhadas Thiago e Luiza, Mateus e Lorena e Leonardo e Daniela pelo apoio sempre constante e ao Francisco, que ainda não sabe, mas já ocupa um lugar muito especial em nossas vidas. Ao Rafael, meu marido, por sempre ter me apoiado, sem nunca reclamar das horas de convívio das quais foi privado em função dos meus estudos.

A eles dedico essa tese!

AGRADECIMENTOS

Ao elaborar esses agradecimentos me recordo de tantas pessoas que passaram por minha vida nesse período e que, de alguma forma, me ajudaram a chegar até aqui. Seria impossível listá-las, mas agradeço a todos que colaboraram na realização deste trabalho.

No entanto, algumas pessoas se tornaram tão presentes, que não posso deixar de citar. Em primeiro lugar, agradeço a Deus, pela oportunidade de concluir mais essa etapa.

À professora Titular da Faculdade de Odontologia, Professora Maria Cássia Ferreira de Aguiar, que tive a honra de ter como Orientadora. Com o passar do tempo, a suas orientações ultrapassaram as paredes do laboratório e me acompanharam pelas várias decisões que tomei e nas experiências que vivi durante o percurso. Agradeço não só pela orientação, mas também por seu apoio e pelo seu exemplo de ética e de profissionalismo, sem nunca perder a ternura.

Aos professores do departamento de Patologia Bucal da faculdade de Odontologia da UFMG, em especial à professora Dorinha, à professora Tarcília, ao professor Ricardo Mesquita e ao professor Wagner, que me ensinaram a importância da disciplina, da metodologia e da perseverança tão necessárias a um pesquisador.

Agradeço à Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG e ao Instituto Alfa de Gastroenterologia HC-UFMG que acreditaram nas nossas ideias e participaram conosco do nosso trabalho, aceitando a nossa parceria.

Às instituições CAPES, CNPq e FAPEMIG que financiaram o projeto, em suas várias ramificações e assim, permitiram o desenvolvimento do estudo.

Aos funcionários do colegiado de pós-graduação que, com muito carinho, nos orientam quanto às nossas atividades acadêmicas.

Aos membros da banca examinadora pela disponibilidade e competência na avaliação dessa tese.

À professora Eliza, com quem tive o primeiro contato, como aluna, na iniciação científica e que despertou em mim o interesse pela pesquisa.

Aos funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica Inês, Domênico e Daniela pelo apoio e ajuda.

Aos meus colegas de doutorado, em especial Patrícia, Giovanna e Janine que compartilharam tantos seminários, alegrias e tristezas. Essa caminhada não teria sido a mesma sem elas.

Aos amigos da Santa Casa de Misericórdia, minha gratidão por me acolherem como membro da equipe do hospital, ainda que, por adversidades de vida, tenha sido por pouco tempo.

Aos colegas da Newton Paiva, pela ajuda e orientação nos meus primeiros passos como professora, frente à sala cheia, provas, trabalhos e diários de classe. Vocês tornaram essa parte da caminhada mais leve.

Aos meus amigos fora da Faculdade de Odontologia, que partilharam comigo cada passo que dei nessa jornada.

À minha avó, tios e primos pela torcida sempre presente. À minha mãe e meu pai que me apoiaram em tantos momentos de fraqueza e não deixaram que as dificuldades me vencessem. Aos meus irmãos, que são os melhores que Deus poderia me dar, que partilharam comigo desenhos de estudo, análises estatísticas e viveram comigo decisões importantes da vida acadêmica e pessoal. Minhas cunhadas, verdadeiras irmãs, que estiveram comigo nessa caminhada.

Ao Rafael, meu marido, por nunca ter se queixado da minha ausência, mesmo em uma fase ainda tão inicial de nossas vidas.

A todos o meu muito obrigada!

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota.”

Madre Teresa de Calcuta

RESUMO:

As neoplasias de glândulas salivares constituem um grupo heterogêneo de lesões de características clínicas e patológicas extremamente diversificadas. O Adenoma Pleomórfico (AP) é a neoplasia mais frequente deste grupo, tanto nas glândulas maiores quanto nas menores. Uma característica comum a esses tumores de glândula salivar é o crescimento lento, independente de sua natureza benigna ou maligna. A apoptose é um evento celular que participa do controle da população tumoral e envolve uma rede complexa de eventos bioquímicos dos quais fazem parte várias proteínas que atuam em cascata e trabalham de forma a fragmentar o DNA, levando à morte celular, sem que haja ruptura da membrana plasmática. O objetivo do trabalho foi avaliar, pela técnica de imunistoquímica, a expressão de proteínas pró e antiapoptóticas em AP, em glândulas salivares normais associadas e não associadas ao tumor e em outras neoplasias glandulares, tais como: adenoma de células basais, cistoadenoma papilar linfomatoso, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, carcinoma adenoide cístico, carcinoma de células acinares, carcinoma de ducto salivar e carcinoma mucoepidermoide. Foram selecionados 31 casos de AP de glândulas salivares menores (AP GSMe), 12 AP de glândulas salivares maiores (AP GSMa), 11 glândulas normais e 11 glândulas adjacentes ao AP GSMa e 10 glândulas adjacentes ao AP GSMe, dentre outras neoplasias de glândulas salivares, todas emblocadas em parafina e submetidas à técnica de imunistoquímica. A análise semi-quantitativa da expressão dessas proteínas foi realizada pelo método "Quickscore". Os dados foram analisados pelo programa estatístico SPSS (versão 20.0, para Windows. Chicago, IL). Foi encontrada uma maior expressão de proteínas antiapoptóticas entre as neoplasias avaliadas quando comparadas às GN. Não foi encontrada associação entre as características clínico-patológicas dos diferentes grupos de lesões e as proteínas avaliadas.

Palavras-chave: neoplasias de glândula salivar, adenoma pleomórfico, bcl-2, bax, survivina, Nf-k β , caspase, apoptose, imunistoquímica.

ABSTRACT:

The salivary gland neoplasms are an heterogeneous group of lesions with extremely diversified clinical pathological features and varied biological behavior. The pleomorphic adenoma (PA) is the most common neoplasm in this group and affects major and minor salivary glands. A common feature of these tumors is the slow growth, regardless of their benign or malignant nature. Apoptosis or programmed cell death is an event that participates in the control of cell population, tumor growth and involves a complex network of biochemical events of which take part several proteins that works on cascade in order to fragment the DNA. The aim of this study was to evaluate, by the immunohistochemistry, the expression of pro and antiapoptotic proteins in salivary gland neoplasms, in special PAs and in normal salivary glands associated and not associated with the tumor and other gland tumors. We selected 31 cases of PA of minor salivary gland, 12 PA of major salivary glands, 11 normal glands and 11 normal glands adjacent to PA of major salivary gland, 10 normal glands adjacent to PA of minor salivary gland and other salivary gland neoplasms, all embedded in paraffin. The immunohistochemistry technique was performed and semi-quantitative analysis of the expression of these proteins was done by "QuickScore" method. Data were analyzed by SPSS (version 19.0 for Windows. Chicago, IL). We found higher expression of antiapoptotic proteins in the tumors evaluated. No association was found between the clinical and pathological characteristics and the proteins evaluated.

Keywords: pleomorphic adenoma, bcl-2, bax, caspases, survivin, Nf-k β , apoptosis, immunohistochemistry

ABREVIATURAS E SIGLAS:

µm – micrômetro

ACPBG- adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

AgNOR – regiões organizadoras de núcleos impregnadas pela prata

AIF - fator de indução de apoptose

AP – adenoma pleomórfico

AP GSMa - adenomas pleomórficos de glândulas salivares maiores

AP GSMe – adenomas pleomórficos de glândulas salivares menores

ATP - trifosfato de adenosina

BCL-2 – família BCL-2

Bcl-2 ou bcl-2 – proteína BCL-2, linfoma de células B2

Ca - carcinoma

CAC – carcinoma adenoide cístico

Cit C -citocromo C

cm - centímetros

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

DAB – diaminobenzidina

DNA – ácido desoxirribonucléico

DR3 - membro da família TNFR

DR5 - membro da família TNFR

DR6 - membro da família TNFR

EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico

ELISA - Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay (Teste imunoenzimático)

ERO – espécies reativas de oxigênio

FADD – proteína associada ao domínio de morte FAS

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

FAS – domínio de morte da proteína FADD

FASL – ligante do domínio de morte FAS

FO – Faculdade de Odontologia

gla adj – glândula salivar adjacente ao tumor

GN – glândula salivar normal não associada ao tumor

HE – hematoxilina e eosina

IAP – proteínas inibidoras da apoptose

LPB – FOUFMG – laboratório de patologia bucomaxilofacial da FOUFMG

NCL – não clivada

NF-kB – Fator nuclear Kappa B

NK – Natural killer

PCNA – antígeno nuclear de proliferação celular

SPSS – pacote estatístico para Ciências Sociais

TNF – fator de necrose tumoral

TNFR - receptor de fator de necrose tumoral

TNFR-1 – receptor do fator de necrose tumoral 1

TRAIL - ligante indutor da apoptose relacionado ao TNF

Trx - tioredoxina

TUNEL - terminal deoxynucleotidil tranferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

XIAP – proteína inibidora da apoptose ligada ao X

Lista de figuras

Figura 1 - Adenoma pleomórfico (Coloração em HE, classificação de Seifert et al.,1976).

Figura 2 – Imunomarcção das glândulas salivares normais para bax, bcl-2, caspase 3 NCL, caspase 8 NCL, survivina, Nf-k β p65, caspase 3 clivada e Trx.

Figura 3 - Imunomarcção para bax, adenoma pleomórfico e glândulas salivares adjacentes à lesão.

Figura 4 – Imunomarcção para bax; outras neoplasias das glândulas salivares.

Figura 5 – Imunoistoquímica bcl-2, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão.

Figura 6 - Imunomarcção para bcl-2; outras neoplasias das glândulas salivares.

Figura 7 - Imunoistoquímica caspase 3 não clivada, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão

Figura 8 - Imunomarcção caspase 3 não clivada, outras neoplasias das glândulas salivares

Figura 9 – Imunoistoquímica caspase 3 clivada, adenomas leomórfico e glândulas salivares adjacentes à lesão

Figura 10 – Imunomarcção caspase 3 clivada, outras neoplasias das glândulas salivares.

Figura 11 – Imunoistoquímica caspase 8, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão

Figura 12 – Imunomarcção caspase 8, outras neoplasias das glândulas salivares.

Figura 13 – Imunoistoquímica Trx, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão

Figura 14 - Imunomarcção Trx, outras neoplasias das glândulas salivares.

Figura 15 - Imunoistoquímica survivina, adenomas pleomórficos e glândulas salivares

Figura 16 - Imunoistoquímica survivina, outras neoplasias de glândulas salivares

Figura 17 – Imunoistoquímica Nf- κ B p65, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão

Figura 18 - Imunoistoquímica Nf- κ B p65, outras neoplasias de glândulas salivares

Figura 19 - Marcação pela técnica do TUNEL em caso de adenoma pleomórfico

Lista de tabelas

Tabela 1 - Anticorpos primários, fabricantes, diluição, método de recuperação e imunomarcação

Tabela 2 - Diagnóstico histopatológico e características clínicas das neoplasias de glândula salivar

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	16
REVISÃO DE LITERATURA	18
<i>Morfologia das glândulas salivares</i>	19
<i>Proliferação celular x neoplasias das glândulas salivares</i>	20
<i>Apoptose</i>	21
<i>Via intrínseca ou mitocondrial</i>	22
<i>Via extrínseca</i>	24
<i>Caspases</i>	24
<i>Proteínas reguladoras da apoptose</i>	26
<i>Bax</i>	26
<i>Bcl-2</i>	26
<i>Survivina</i>	26
<i>Fator Nuclear – $\kappa\beta$ p65 (Nf- $\kappa\beta$ p65)</i>	27
<i>Tioredoxina</i>	28
<i>Neoplasia das glândulas salivares</i>	28
<i>Adenoma Pleomórfico</i>	28
<i>Outras neoplasias das glândulas salivares</i>	30
<i>Apoptose x Neoplasias das glândulas salivares</i>	33
<i>TUNEL</i>	36
OBJETIVOS	37
<i>Objetivo geral</i>	38
<i>Objetivos específicos</i>	38
JUSTIFICATIVA	39
METODOLOGIA	41

<i>Imunoistoquímica</i> -----	44
<i>Técnica do TUNEL</i> -----	46
<i>Análise estatística</i> -----	47
RESULTADOS -----	49
DISCUSSÃO -----	86
CONCLUSÕES -----	97
ATIVIDADES DESENVOLVIDAS -----	100
ANEXOS -----	106
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS -----	111

Introdução

As neoplasias das glândulas salivares, embora incomuns, não são raras e podem acometer tanto glândulas salivares menores quanto maiores, sendo a glândula parótida a mais frequentemente afetada. Considerando-se as glândulas salivares menores, o palato é o local mais frequentemente acometido, tendo o AP como a neoplasia mais comum (Chau e Radden, 1989) e entre os malignos, o carcinoma mucoepidermoide (Yin et al., 2000).

De um modo geral, o crescimento dessas neoplasias é lento, independentemente de comportamento benigno ou maligno das mesmas (Marioni et al., 2003; Yin et al., 2000; da Cruz Perez et al., 2005), sugerindo uma baixa atividade proliferativa dessas lesões (Alves et al., 2002).

A apoptose é um tipo de morte celular programada e tem como importante função o controle do número de células e, conseqüentemente, a manutenção dos tecidos corporais através da eliminação de células, sendo que uma disfunção nesse sistema pode contribuir para o estabelecimento de processos patológicos, como as neoplasias (Vangestel et al., 2009). Dessa forma, a apoptose se caracteriza por um processo complexo, controlado por uma cascata de eventos moleculares e dependente de energia. As alterações morfológicas apresentadas pelas células apoptóticas são resultados de ações de proteases cisteinil aspartato específicas, denominadas Caspases, tanto na via extrínseca, quanto na intrínseca (Burz et al., 2009). Outro componente do processo de apoptose é a família BCL-2, formada por proteínas anti e pró-apoptóticas (Vangestel et al., 2009; Burz et al., 2009).

O mecanismo da progressão das neoplasias de glândula salivar e sua relação com a apoptose são processos que ainda não estão bem esclarecidos. Dessa forma, propusemos, como objetivo do presente trabalho, a investigação da atividade apoptótica em diversas neoplasias de glândulas salivares, avaliando-se, pela imunoistoquímica, proteínas de ação estratégica tanto na indução quanto na inibição da morte celular. Hipotetizamos que as proteínas que atuam na efetivação do processo apoptótico estejam sendo menos expressadas nesses tumores, ou que as proteínas de ação anti-apoptóticas estejam mais expressadas.

Revisão de Literatura

Morfologia das glândulas salivares

As glândulas salivares são órgãos exócrinos associados ao trato digestivo e têm como função a produção de saliva, responsável pela umidificação e lubrificação da mucosa bucal e início da digestão de carboidratos e lipídios. As glândulas salivares são divididas em maiores, compreendendo a glândula submandibular, sublingual e parótida e em glândulas salivares menores, dispersas pela mucosa bucal (Junqueira e Carneiro, 2004; Katchburian e Arana, 1999).

Tais glândulas são formadas por um parênquima que consiste em terminações secretoras, caracterizadas pelos ácinos que podem ser serosos ou mucosos e um sistema de ductos ramificados que conduzem a saliva à cavidade bucal (Junqueira e Carneiro, 2004). As células acinares e ductais compõem a parte luminal glandular, enquanto as células mioepiteliais e basais encontram-se voltadas à membrana basal, na região não luminal (Nagao, et al., 2012). As células mioepiteliais apresentam-se abraçando tanto as terminações secretoras quanto os ductos e têm a função de contração, auxiliando a expulsão da saliva. As semiluas serosas são células serosas encontradas ao fim de túbulos de células mucosas. Já o sistema de ductos é formado por ductos intercalares, em continuidade com a região secretora, formado por células epiteliais cuboides. Os ductos intercalares se unem, formando o ducto estriado. Os diversos ductos estriados se unem formando um ducto maior, denominado excretor, que apresenta na sua porção mais inicial um revestimento epitelial cúbico estratificado, seguido por colunar estratificado e, ao final, desemboca na cavidade bucal, apresentando-se como pavimentoso estratificado não queratinizado (Junqueira e Carneiro, 2004).

Embora sejam poucos os estudos que relacionam as neoplasias de glândulas salivares e glândulas salivares normais, é conhecida a relação entre estruturas normais da glândula e o surgimento de algumas neoplasias. O carcinoma adenoide cístico, por exemplo, origina-se de células do ducto intercalar, enquanto carcinoma do ducto salivar e o carcinoma mucoepidermoide

se originam de células do ducto excretor (Dardick et al., 1990; Locati et al., 2009).

Se por um lado essa relação é conhecida, por outro, os mecanismos envolvidos no desenvolvimento das neoplasias de glândulas salivares necessitam ainda de serem esclarecidos. A proliferação celular, atividade em geral aumentada nos tumores, não parece seguir esta regra nas neoplasias glandulares.

Proliferação celular x Neoplasias das glândulas salivares

Estudos que avaliaram a atividade proliferativa em neoplasias de glândulas salivares também já demonstraram, nesses tumores, uma baixa expressão de proteínas relacionadas à proliferação celular. No estudo realizado por Rivero et al. (2004), os autores observaram, pela dupla marcação imunoistoquímica/histoquímica, que amostras, tanto de AP quanto de carcinoma adenoide cístico, apresentaram uma maior marcação pela prata (AgNOR) nas regiões também positivas para PCNA; entretanto a marcação pela prata sugeriu ser muito mais indicativa da atividade metabólica do que proliferativa das células tumorais. No trabalho realizado por Zhu et al. (2012), os autores encontraram uma baixa expressão de Ki-67 nos casos de AP e não encontraram diferenças significativas dessa proteína entre os subtipos histológicos clássico e celularizado.

No estudo de imunoistoquímica realizado por Alves et al. (2002), em que a proliferação celular em 61 casos de AP de glândulas submandibulares foi avaliada, o resultado encontrado foi considerado negativo para a imunomarcação do Ki-67 e p53 em todos os casos avaliados, embora alguns poucos casos tenham apresentado esparsas células positivas.

Trabalhos que avaliam proteínas que se relacionam de forma indireta com a proliferação celular também apresentam resultados interessantes. Na revisão de literatura sobre o carcinoma adenoide cístico realizada por Dodd e Slevin (2006), os autores concluíram que muitos dos estudos avaliados

apresentavam uma baixa expressão tanto de p53 (gene supressor de tumor, relacionado com a apoptose, dentre outros) quanto de EGFR (receptor do fator de crescimento epitelial), sugerindo uma mínima relação entre esse receptor e o desenvolvimento da lesão.

No trabalho de Vered et al. (2002), numa escala de 0 a 2 para imunomarcação para o EGFR, dos 34 casos de carcinoma adenoide cístico avaliados, 20 apresentaram score entre 0,05 e 0,9, sugerindo uma imunomarcação fraca nesse tumor. Por outro lado, o estudo de Jia et al. (2004), que avalia apoptose em carcinoma adenoide cístico, encontrou uma correlação inversa entre índice apoptótico e a expressão da bcl-2. Embora Jia et al. (2004) não tenham encontrado associação entre sobrevida e as proteínas avaliadas, 20/39 e 25/39 casos mostraram-se positivos para bcl-2 e p53 respectivamente.

Apoptose

A morte celular programada é um tipo de evento celular que compreende diferentes modalidades de morte das células, como, por exemplo, a apoptose e autofagia. A apoptose é o modelo mais estudado desse grupo e, nos vertebrados, mostra-se como um processo frequente de morte celular (Ghiotto et al., 2010). Dessa forma, uma importante função da apoptose é o controle do número de células e, conseqüentemente, a manutenção dos tecidos corporais através da eliminação de células indesejadas ou defeituosas (Vangestel et al., 2009), sendo fundamental no período da embriogênese e homeostase do tecido adulto (Ashkenazi, 2008). Embora muitas vezes fisiológico, esse processo pode ser desencadeado por estresse celular intenso, danos ao DNA ou ao citoesqueleto. Esses danos ao DNA podem, por exemplo, levar à ativação da p53, que se relaciona com a indução da transcrição de proteínas BH3-only que, por sua vez, ativam outras proteínas da família BCL-2, como a bax (Ashkenazi, 2008). Alterações nesse sistema podem, também, contribuir para o estabelecimento de processos patológicos, como as neoplasias, uma vez que as células tumorais podem se tornar resistentes à apoptose, tanto pelo aumento da expressão das proteínas antiapoptóticas quanto pela diminuição

das pró-apoptóticas. Alguns tratamentos quimioterápicos e radioterápicos se baseiam justamente na indução da apoptose nas células tumorais (Vangestel et al., 2009). Estudos com câncer de pâncreas e proteínas da apoptose sugerem que a expressão de bax se mostra como um bom preditor de sobrevida (Stenner e Klausmann, 2009).

A apoptose é um processo complexo, controlado por uma cascata de eventos moleculares e dependente de energia. As alterações morfológicas apresentadas pelas células apoptóticas são resultados de ações de proteases cisteinil aspartato específicas, denominadas Caspases, envolvidas em ambas as vias da apoptose, a extrínseca e a intrínseca (Burz et al., 2009).

As alterações morfológicas das células em apoptose se caracterizam pela contração celular, condensação da cromatina e núcleo picnótico (Burz et al., 2009). Na coloração de hematoxilina e eosina (HE), o que se observa ao microscópio óptico de luz é a formação de uma massa celular densa, redonda ou oval, de citoplasma densamente eosinofílico, vacuolizado e condensação da cromatina (Chowdhury et al., 2006).

Via intrínseca ou mitocondrial

A via intrínseca, também chamada mitocondrial, pode ser desencadeada por vários estímulos como, por exemplo, o estresse celular e danos ao DNA sendo estes processos mediados pela família da BCL-2 e pelo acometimento mitocondrial (Vangestel et al., 2009).

A mitocôndria é uma organela celular, situada no citoplasma, e é responsável pela síntese de trifosfato de adenosina (ATP), moeda energética essencial para o metabolismo celular (Cusimano et al., 2009). Apresenta uma membrana externa e uma membrana interna e o espaço entre ambas denomina-se espaço intermembranas. Nesta região estão presentes várias proteínas relacionadas à indução da apoptose, como o citocromo C (Cit C), o fator de indução de apoptose (AIF), o Smac/Diablo e Omi/HtrA2 (Burz et al., 2009).

A família BCL-2 é constituída por aproximadamente 20 proteínas que apresentam em sua composição um domínio específico, o BH (BH1-BH4). De acordo com a função que exercem, os membros da família são divididos em 3 grupos. O grupo 1 é formado por proteínas antiapoptóticas (Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w, Bcl-xL), todas apresentando os 4 domínios BH (BH1, BH2, BH3 e BH4) e tendo como função a proteção celular. Os grupos 2 e 3 são compostos por proteínas pró-apoptóticas que apresentam os domínios BH1, BH2 e BH3 (ex. Bax, Bak, Bcl-xs) ou apenas BH3, sendo chamadas BH3-only (Bid, Bim) (Vangestel et al., 2009; Burz et al., 2009).

Acredita-se que na célula saudável as proteínas pró-apoptóticas, como a bax, apresentem-se dispersas no citosol na sua forma inativa e que a inativação dessas proteínas pró-apoptóticas se dê pela sua interação com proteínas antiapoptóticas, como a Bcl-2, ou com outros membros antiapoptóticos da família BCL-2. A associação da bax com membros pró-apoptóticos como Bim, BID e PUMA leva à formação de heterodímeros, capazes de se ligar à membrana mitocondrial e desencadear o processo de apoptose. A BH3-only, um subconjunto da família BCL-2, é um grupo de proteínas capaz de promover a ativação da Bax, não só pelo deslocamento de proteínas antiapoptóticas (bcl-2), mas também pela ativação direta da bax. Independentemente da forma, uma vez ativada, a bax se liga à membrana mitocondrial, permeabilizando os poros da mesma, o que permite a liberação de inúmeras substâncias da mitocôndria para o citosol. Dentre essas substâncias liberadas está o Cit C, que, uma vez no citosol, atua como co-fator de ativação da Apaf-1, ligando-se também à pró-caspase 9, formando um apoptossomo. Esse apoptossomo inicia a ativação da pró-caspase 9 em caspase 9, que por sua vez, ativa a caspase 3, culminando na morte celular por clivagem de substratos protéicos necessários ao reparo do DNA nuclear (Autret e Martin, 2009; Wang e Youle, 2009; Broughton e Sobey, 2009).

Outra substância também liberada através dos poros mitocondriais é o Fator de indução apoptótico (AIF). Uma vez liberado, o AIF migra para o núcleo e inicia um processo de apoptose independente das caspases, que induz a

condensação e fragmentação do DNA em partes de 50Kb (Broughton e Sobey, 2009, Burz et al., 2009; Wang e Youle, 2009).

Uma vez liberado no citoplasma o Smac/Diablo parece se ligar ao XIAP, uma proteína antiapoptótica da família das proteínas inibidoras da apoptose (IAP), facilitando a ativação das caspases. A Omi/HtrA2 também pode facilitar o processo de apoptose degradando de forma irreversível alguns tipos de IAPs (Wang e Youle, 2009).

Via extrínseca

A via extrínseca apresenta como ponto principal os receptores presentes na membrana plasmática, conhecidos como “receptores da morte”. Esses receptores pertencem à família Receptor de Fator de Necrose Tumoral (TNFR), sendo conhecidos 6 de seus integrantes: o TNFR-1, Fas, TRAIL, DR3, DR5 e DR6. Quando o receptor do TNF é ativado pelos seus ligantes, a célula pode caminhar para o processo de morte celular. Alguns desses ligantes são as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , INF-gama e FasL, que se ligam a seus receptores específicos, também chamados “receptor da morte”. Uma vez ativado, o receptor da morte inicia uma sinalização em sua parte citoplasmática (domínio de morte), ligando-se a proteínas denominadas “proteínas do domínio de morte”, como por exemplo, as proteínas do domínio de morte Fas (FADD). Essa associação ligante + receptor + FADD é denominada “trimerização”. Esse trímero se liga à pró-caspase 8, formando um complexo denominado “DISC”, que ativa a pró-caspase 8 em caspase 8, separando-se do complexo DISC. Uma vez ativada, a caspase 8 pode ativar proteínas pró-apoptóticas que atuam na via mitocondrial ou pode ativar diretamente a caspase 3 que, por sua vez, atua na clivagem de substratos proteicos, culminando no processo de apoptose (Shultz e Harrington, 2003; Kulkarni et al., 2006; Broughton e Sobey, 2009).

Caspases

As caspases são uma família de cisteínas proteases que agem como moléculas efetoras da morte celular. Essas proteínas são sintetizadas na sua forma inativa, em grande parte das células, como pró-caspases, e se tornam

ativas por oligomerização (Fulda, 2009; Burz et al., 2009; Frank et al., 2011). Além de participarem do processo da apoptose (caspases 2, 3, 6, 7, 8, 9, 10), as caspases 1, 4, 5, 11 e atuam no controle do processo inflamatório (Burz et al., 2009, MacKenzie et al., 2010).

A caspase 8 é uma proteína de 480 aminoácidos que apresenta dois domínios de morte efetores, o N-terminal e o C-terminal. Esses domínios de morte são “plataformas” que têm como função a interação com outras proteínas. Até que a pró-caspase 8 seja clivada e conseqüentemente ativada, ela apresenta-se constituída de 4 subunidades, 2 maiores e 2 menores, sendo essa forma inativa a presente em grande quantidade de células. Diferentes isoformas da caspase 8 já foram identificadas, sendo as mais frequentes as isoformas -8a e -8b. Ambas relacionam-se com a sinalização de morte celular. No entanto existe uma variante, a caspase 8L (long), que apresenta dois domínios de morte N-terminal e nenhum C-terminal. Sendo assim, ela pode ser recrutada ao complexo DISC, mas ainda assim é inativa, bloqueando a cascata da apoptose (Fulda, 2009).

Estudos mais recentes sugerem que a caspase 8 apresenta outras funções além da ação pró-apoptótica. Ela parece estar envolvida no controle da diferenciação e proliferação de Células B, células NK, ativação do Nf- κ B e auxiliam na motilidade, adesão e migração de células cancerosas (Fulda, 2009).

A caspase 3 é o membro mais estudado da família das caspases (MacKenzie et al., 2010), uma vez que tanto a via extrínseca quanto a intrínseca convergem para a ativação da mesma (Resendes et al., 2004; Pirger et al., 2009). A pró-caspase-3 parece estar superexpressada em vários tipos de tumores, sugerindo que a molécula que ativa pró-caspase apresenta seletividade às células tumorais em relação às células normais (Peterson et al., 2010). A caspase 3 é uma caspase efetora, sendo que, uma vez ativada, leva à morte celular pela degradação de proteínas essenciais à célula e ativação de endonucleases, sendo, portanto, considerada um ponto chave do processo de morte celular (Resendes et al., 2004). No entanto a ativação da caspase sem a

concretização da apoptose já foi descrita no trabalho de Alam et al. (1999) no qual a ativação da caspase parece ter se relacionado à maturação de linfócitos T e, não, com o desencadeamento do processo de apoptose.

Proteínas reguladoras da apoptose

Bax

A bax é uma proteína da família BCL-2 envolvida no processo de apoptose, mais especificamente no processo de indução da apoptose. Dessa forma, a superexpressão da bax pode estimular o processo de morte celular pela formação de dímeros (homo ou heterodímeros) com outras proteínas da família (Hasnan et al., 2010). Normalmente localizada no citosol na sua forma inativa, ela migra para a mitocôndria e induz a liberação de Cit C quando ativada (Kotsafti et al., 2010).

Bcl-2

A bcl-2 é uma oncoproteína da família BCL2, inicialmente descrita em um linfoma não-Hodgkin de células B, e que tem como função a inibição da apoptose, favorecendo a sobrevivência da célula (Carlinfante et al., 2005; Kummoona et al., 2008, Hasnan et al., 2010). O gene BCL-2, que codifica a proteína de mesmo nome, está localizado no cromossomo 18q21 (Hockenbery et al., 1990). A proteína é encontrada na superfície da membrana da mitocôndria, na do retículo endoplasmático e na nuclear (Szegezdi et al., 2009), sendo que sua presença na célula parece estar relacionada à resistência celular às drogas anti-neoplásicas (Pommier et al., 2004) e sua superexpressão com o desenvolvimento de malignidades (Cotter, 2009).

Survivina

A survivina é uma proteína antiapoptótica da família IAP. A sua expressão em tecidos adultos normais é baixa, enquanto nas células tumorais apresenta-se normalmente aumentada. A survivina apresenta como funções a

inibição da caspase 9 e do Smac/Diablo, estabilização da XIAP, além de regular a divisão celular. Sendo assim, a expressão nuclear parece estar relacionada ao controle da divisão celular, enquanto a expressão citoplasmática parece relacionar-se com inibição da apoptose (Vangestel et al., 2009). Dessa forma, a survivina surge como uma forte candidata às propostas terapêuticas para as neoplasias (Stenner e Klausmann, 2009).

Fator Nuclear - $\kappa\beta$ -65 (Nf- $\kappa\beta$ -65)

O Fator nuclear – $\kappa\beta$ (Nf- $\kappa\beta$) é uma família de fatores de transcrição, tendo como membros o RELA (p65), RELB, REL (cRel), Nf- $\kappa\beta$ 1 (p50) e o Nf- $\kappa\beta$ 2 (p52). Na maior parte das células, as subunidades p50 e p65 se mostram como homodímeros ou heterodímeros, apresentando-se na forma Nf- $\kappa\beta$, dispersos no citosol de forma inativa, associados a proteínas inibitórias. A ativação desse fator, tanto pela degradação do inibidor citoplasmático quanto pela clivagem proteolítica, gera um dímero livre que se transloca para o núcleo, passando a exercer diversas funções (Zhang et al., 2005). Dentre as funções mais conhecidas dessa proteína estão a inibição da apoptose e manutenção celular (Tokunaga e Iwai, 2012). O Nf- $\kappa\beta$ pode ser ativado de várias formas como por citocinas pró-inflamatórias e estresse oxidativo. Quando ativado, a sua translocação intranuclear induz a expressão de genes associados à resposta inflamatória, adesão celular e antiapoptótica (Tokunaga e Iwai, 2012). Dessa forma, esse fator parece estar envolvido tanto com reações de oxidação quanto com a indução do estresse oxidativo, modulação de vias de proliferação e degenerações celulares por inibição de proteínas citoplasmáticas como a I kappa B (Jiang et al., 2012).

A forma inativa do Nf- $\kappa\beta$ é encontrada no citoplasma celular associada a proteínas inibidoras de Nf- $\kappa\beta$ (I- Nf- $\kappa\beta$). Uma vez clivada, a proteína é ativada e o dímero livre do Nf- $\kappa\beta$ se transloca para o núcleo (Zhang et al., 2005). Uma vez no núcleo, o Nf- $\kappa\beta$ se liga ao DNA e conduz a transcrição de genes relacionados à tumorigênese, como genes antiapoptóticos, reguladores

positivos da proliferação, entre outros (Chattopadhyay et al., 2012) e também relacionados à angiogênese (Zhang et al., 2005).

Tioredoxina (Trx)

As espécies reativas de oxigênio (ERO), que incluem o superóxido ($O^{\cdot-}$), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}), são produzidas nas condições fisiológicas e participam da sinalização e controle metabólicos. Frente a alguns estímulos como a isquemia, ocorre um aumento no nível de ERO (Broughton et al., 2009).

A tioredoxina (Trx) é uma proteína ubíqua, que possui ação antioxidante frente à produção celular de ERO. Além disso, ela atua na regulação da apoptose tendo como ponto principal a quinase 1, que é ativada pela produção de radicais livres (Kurimoto et al., 2007).

Wu et al. (2008), avaliando a ação da Trx em células do miocárdio submetidas a isquemia, encontraram que, frente a uma reperfusão, a Trx exerceu um efeito negativo sobre a apoptose dos miocardiócitos sugerido pelas poucas células positivas no TUNEL e, indiretamente, pela baixa expressão de mRNA da caspase 3 e pela pouca expressão da caspase 3 no western blotting.

Neoplasia das glândulas salivares

Adenoma Pleomórfico

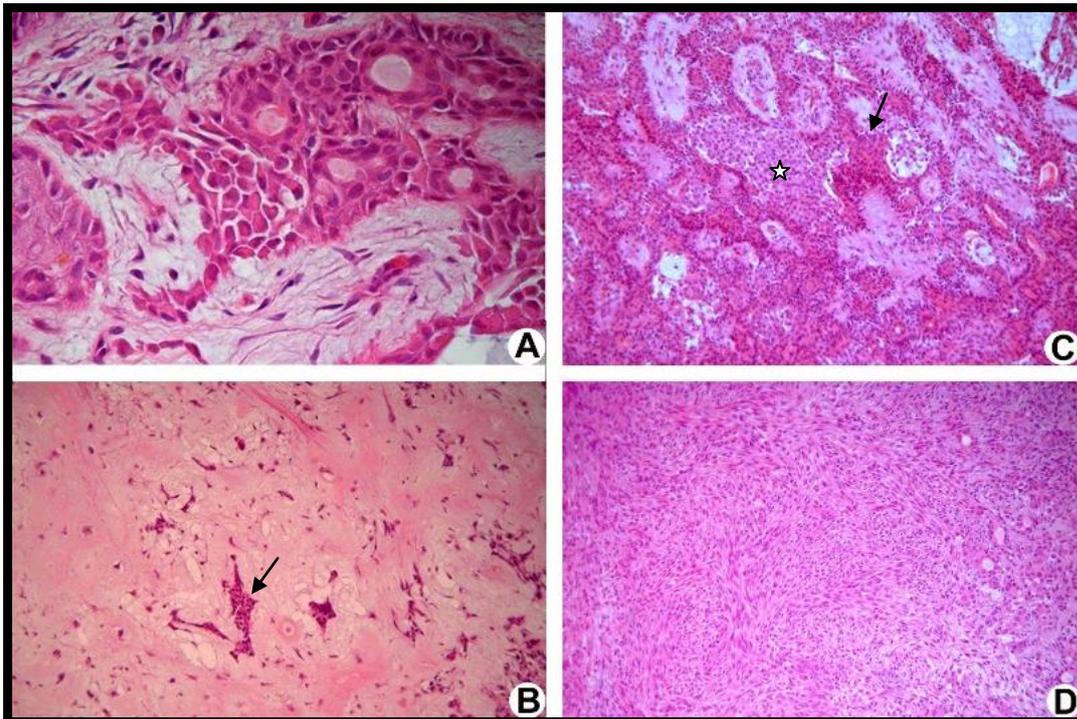
O AP (figura 1), também conhecido como tumor misto benigno, é um tumor benigno de origem epitelial glandular, derivado de elementos ductais e mioepiteliais, sendo a neoplasia a mais frequente das glândulas salivares (Poetsch et al., 2005; Do Prado et al., 2006; Ochicha et al., 2009). Clinicamente apresenta-se como uma massa firme, de crescimento lento e assintomático, apresentando leve predileção pelo gênero feminino, com média de idade entre 30 e 50 anos, e predileção pela glândula parótida, nas glândulas maiores, e

pelo palato, nas glândulas menores (Marioni et al., 2003; Chau e Radden., 1989; Barnes et al., 2009).

Histologicamente, o AP apresenta uma grande variedade de apresentações arquiteturais, frequentemente apresentando formações ductais e císticas, em meio a um estroma mixoide, mucoide ou condroide. Observam-se ainda presença de células epiteliais e mioepiteliais (Poetsch et al., 2005, Do Prado et al., 2006; Barnes et al., 2009). Em função da grande diversidade morfológica apresentada pelo AP, já foram propostas classificações histológicas de acordo com a quantidade de estroma apresentada pela lesão. Dessa forma, Chau e Radden (1989) realizaram um estudo, seguindo a classificação histológica proposta por Seifert et al. (1976). Dessa forma, os APs são agrupados em: tipo I (Clássico, tendo de 30% a 50% do tumor constituído por estroma, contendo uma quantidade equilibrada entre estroma e células epiteliais), tipo II (Mixoide, com 80% do tumor constituído por estroma), tipo III (Celular, com menos de 30% do tumor constituído por estroma) e tipo IV (Celularizado monomórfico, menos de 30% do tumor constituído por estroma, com o componente celular epitelial monomórfico, de aparência plasmocitoide ou hialina). No estudo, Chau e Radden (1989) encontraram, entre outros resultados, uma relação entre subtipo histológico e tamanho da lesão.

A patogênese do AP ainda é incerta, mas acredita-se que o desenvolvimento e progressão da lesão se deem por translocações cromossômicas nas regiões 3 (3p), 8 (8q12), 12 (12q15) e 6 (6p21). O papel das células mioepiteliais dando início à transformação neoplásica e contribuindo para a transformação maligna em carcinomas ex-adenomas pleomórficos tem sido explorado em alguns trabalhos (Araújo et al., 2006). De acordo com Cheuk e Chan (2007), 70% das alterações genéticas referentes ao APs se encontram relacionadas a rearranjos nas regiões 8q12 (39%), 12q13-15 (8%) e a mutações esporádicas não relacionadas a esses cromossomos (23%).

Figura 1 - Adenoma pleomórfico (Coloração em HE, classificação de Seifert et al.,1976).



- A) AP (40x), tipo clássico (tipo I); pode ser observado um padrão de proliferação em ninhos de células epiteliais, exibindo proporção com a porção estromal.
- B) AP (20x), tipo mixoide (tipo II); pode ser observado um padrão celular mais difuso, sendo, por vezes, observada proliferação em ninhos (seta)
- C) AP (20x), tipo celularizado (tipo III); pode ser observado um padrão de proliferação epitelial em ductos (seta), ninhos e lençóis e focalmente podem-se observar células com diferenciação plasmocitoide (estrela).
- D) AP (10x), tipo celularizado monomórfico (tipo IV); pode ser observado um padrão de proliferação em lençol, exibindo células monomórficas.

Outras neoplasias das glândulas salivares

O *adenoma de células basais* é uma neoplasia salivar benigna rara que acomete principalmente a glândula parótida sendo, normalmente, uma lesão nodular, solitária e bem definida. Histologicamente a lesão é caracterizada por proliferação de células basaloides, de citoplasma eosinofílico, limites celulares imprecisos, disposto em padrão sólido de crescimento ou trabecular. O padrão sólido frequentemente apresenta ilhotas celulares de tamanhos variáveis,

exibindo perifericamente células dispostas em paliçada, enquanto o tipo trabecular caracteriza-se por cordões de células basaloídes (Jung et al., 2013; Barnes et al., 2009).

O *cistoadenoma papilífero linfomatoso*, também denominado Tumor de Warthin, é uma neoplasia benigna das glândulas salivares, apresentando-se quase exclusivamente na glândula parótida, sendo a patogênese desse tumor ainda incerta, embora aparentemente se relacione com fragmentos ectópicos de glândula parótida em meio aos nódulos linfáticos. Apresenta leve predilação por homens adultos e seu desenvolvimento sugere uma relação com o consumo de tabaco. Clinicamente essa neoplasia se caracteriza por um nódulo de crescimento lento e assintomático, firme ou flutuante à palpação. Histologicamente exibe uma proliferação de epitélio ductal disposto em cordões circundados por espaços císticos, onde se projetam múltiplas reentrâncias papilares de células epiteliais, em meio a um estroma linfoide (Fodor et al., 2010).

O *carcinoma adenoide cístico* foi inicialmente denominado “cilindroma” por Billroth em 1859 devido à deposição de material hialino cilíndrico circundado por células epiteliais. Em 1952, Reid introduziu o termo “cisto-adenoide” (Carlinfante et al., 2005): um tumor relativamente frequente entre as neoplasias malignas de glândula e comumente apresenta invasão perineural, recorrência local e metástase à distância (Jia et al., 2004). O carcinoma adenoide cístico corresponde a cerca de 10% das neoplasias das glândulas salivares, sendo as glândulas salivares menores o local mais frequentemente acometido (Dodd e Slevin, 2006). O tratamento cirúrgico ainda é o mais comum, no entanto, mesmo com um tratamento local agressivo, cerca de 40-60% dos casos apresentam metástase para pulmões, ossos e tecidos moles (Patel et al., 2006), sendo muitas vezes o tratamento cirúrgico seguido por radioterapia (Dodd e Slevin, 2006). Dentre os 3 subtipos histológicos, têm-se o cribiforme, o tubular e o sólido (Jia et al., 2004; Carlinfante et al., 2005; Dodd e Slevin, 2006).

O *carcinoma mucoepidermoide* é a neoplasia maligna de glândula salivar mais comum, podendo ser encontrado tanto em glândulas salivares maiores quanto em glândulas salivares menores, sendo que, nas menores, frequentemente apresenta uma progressão mais agressiva (Yin et al., 2000). A sua localização mais comum é a parótida, seguida do palato (Cardoso et al., 2000). Histologicamente compreende uma mistura de células mucosas, células intermediárias e células escamosas, podendo apresentar ainda células claras, oncócíticas ou colunares. De acordo com a variação histológica, eles podem ser classificados em graus baixo, intermediário ou alto de malignidade, o que se correlaciona diretamente com o tipo de tratamento empregado e a sobrevida do paciente (Seethala, 2009).

O *adenocarcinoma polimorfo de baixo grau* (ACPBG) é uma neoplasia maligna praticamente exclusiva das glândulas salivares menores do palato, com predileção pelo gênero feminino entre sexta e oitava décadas de vida (Araújo et al., 2013). Histologicamente pode apresentar uma variação morfológica, exibindo células palidamente coradas, com proliferação em lençol, cordões, em formações ductais ou em formações císticas que lembram o carcinoma adenoide cístico. Comumente são observadas células periféricas exibindo infiltração do tecido adjacente em cordões de camada de células e invasão perineural (Barnes et al., 2009; Araújo et al., 2013).

O *carcinoma de células acinares* é uma neoplasia epitelial glandular maligna que se caracteriza pela diferenciação serosa e acinar das células neoplásicas. Essa lesão acomete uma ampla faixa etária, estendendo-se desde a 2ª década de vida até a 7ª, com ligeira predileção pelo gênero feminino e tendo a glândula parótida como principal local de acometimento. Clinicamente apresenta-se como uma massa sólida, de crescimento lento e cerca de um terço dos pacientes apresenta queixa de dor, sendo a metástase frequentemente diagnosticada nos pulmões (Barnes et al., 2009; Munteanu et al., 2012). Histologicamente, o carcinoma de células acinares pode apresentar diversos padrões, podendo exibir proliferação acinar, ductal intercalado, vacuolizado, granular não específico, sólido, microcístico, papilar-cístico e folicular. Nos carcinomas de células acinares que exibem proliferação de

células acinares, as mesmas mostram-se volumosas, poligonais, de citoplasma amplo e granuloso e núcleo excêntrico e PAS-com diastase positivos. Já as células vacuolizadas apresentam vacúolos PAS-negativos, que variam em volume e número. As células granulares não específicas apresentam-se ora ovais, ora poligonais, de núcleo arredondado e limite celular impreciso. Já as células do ducto intercalado são cuboidais e de núcleo central. Embora possa haver uma predominância de um tipo celular, frequentemente observa-se a presença de vários tipos celulares e de padrões histológicos (Barnes et al., 2009; Sams e Gnepp, 2012; Lei e Chiosea, 2012).

O *carcinoma do ducto salivar* é uma neoplasia glandular rara, inicialmente descrita por Kleinsassar *et al.* em 1968, mas reconhecida pela Organização Mundial de Saúde apenas em 1992 (Kallianpur et al, 2012). Acomete principalmente a parótida, mais comum em homens do que em mulheres (4:1), sendo observado em uma ampla faixa etária, de 23 a 80 anos. Clinicamente apresenta-se como uma massa de crescimento rápido, de sintomatologia dolorosa, com envolvimento do nervo facial em 25 – 60% dos casos, podendo também levar à metástases à distância (Pont et al, 2011). Microscopicamente apresenta uma proliferação intraductal de disposição papilar, sólida ou cribiforme com áreas de comedonecrose, invasão perineural e êmbolos tumorais intravasculares (Ponniiah et al., 2005; Barnes et al., 2009).

Apoptose x Neoplasias das glândulas salivares

Estudos utilizando a técnica de imunistoquímica mostraram a relação entre diversas neoplasias de glândulas salivares, como o AP (Aoki et al., 2004) e carcinomas adenoides císticos (Jia et al., 2004) com a bcl-2. Num estudo realizado com 24 neoplasias epiteliais glandulares benignas, sendo 23 AP e um mioepitelioma e 20 neoplasias epiteliais glandulares malignas, 21 casos (87%) das neoplasias benignas mostraram-se positivas para a bcl-2 e dentre as malignas 50% foram positivas para esta proteína (da Cruz Perez et al., 2004). Relação entre a proteína e casos de recorrência, metástases ou taxa de sobrevida não foram encontradas. Dados similares foram relatados por

Carlinfante et al. (2005) que encontraram em seu estudo cerca de 90% dos casos de carcinoma adenoide cístico positivos para bcl-2, mas também sem relação da mesma com subtipo histológico, estágio clínico, recorrência, metástase ou sobrevida, sugerindo um envolvimento precoce da bcl-2 com o desenvolvimento do tumor. No trabalho de Viana et al. (2013), os autores avaliaram, pela imunistoquímica, a expressão da bcl-2 em AP, encontrando positividade em 27 dos 35 casos avaliados, enquanto as glândulas normais adjacentes ao tumor mostraram-se negativas para a proteína. No entanto, as glândulas normais não relacionadas ao tumor apresentaram intensa positividade focal nas células basais dos ductos. No estudo realizado por Yin et al. em 2000, dos 71 casos de carcinoma mucoepidermoide analisados, 41 casos foram positivos para bcl-2, sendo que a imunopositividade mostrou-se evidente nas células colunares, intermediárias e epidermoides. As células mucosas e células claras mostraram-se negativas. Tanto o subtipo sólido quanto o cístico apresentaram uma imunopositividade mais intensa na periferia das ilhas tumorais. Curiosamente a imunoexpressão para bax mostrou-se positiva em 69 dos 71 casos sendo observada a imunopositividade também nas células colunares, intermediárias e epidermoides, enquanto as células claras e mucosas mostraram-se negativas. Os dois casos negativos para o bax evoluíram para óbito.

A bax também é uma importante proteína do processo de apoptose (Kotsafti et al., 2010), já tendo sido demonstrado em um estudo que 97% dos casos de carcinomas mucoepidermoides de glândulas salivares menores avaliados apresentaram-se positivos para bax e que os dois casos negativos evoluíram para óbito (Yin et al., 2000). Outro trabalho que avaliou a imunoexpressão da bax em glândulas salivares de ratos encontrou que as glândulas previamente atrofiadas apresentavam um aumento progressivo da expressão da bax (Takahashi et al., 2008).

A caspase 8 é um dos pontos fundamentais no desenvolvimento da apoptose (Lisi et al., 2009) uma vez que pode participar do processo de morte celular tanto da via extrínseca, pela sua ativação no domínio de morte (Fulda, 2009), quanto da intrínseca ou mitocondrial (Raguénez et al., 2009). No

trabalho de Koschny et al. (2013), os autores avaliaram, pela imunistoquímica, a expressão da caspase 8 em hepatocarcinoma celular e encontraram diferenças na expressão citoplasmática e nuclear em relação à sobrevida do paciente. A imunexpressão nuclear apresentou uma associação com menor sobrevida. Já a imunomarcagem citoplasmática apresentou associação com maior sobrevida do paciente, independentemente da graduação tumoral.

A caspase 3 é considerada o ponto chave da apoptose (Xiang et al., 2008), já tendo sido estudada em diversas lesões como na hiperplasia benigna de próstata (Bozec et al., 2010). Neste trabalho os autores avaliaram a imunexpressão da pró-caspase 3 e da caspase 3 clivada na hiperplasia benigna de próstata, tendo encontrado diferenças na expressão das duas formas dessa proteína. Enquanto a pró-caspase foi observada em células basais, epiteliais secretoras e estromais, a caspase clivada foi observada focalmente nas hiperplasias de próstata.

A survivina é uma IAP (Seol et al., 2005; Spaulding et al., 2006) e apresenta um ou mais domínios BIR (baculovirus IAP repeat) responsáveis pela sua ligação com as caspases (Kobayashi et al., 1999; Liao et al., 2009). Embora já se conheça sua relação com a apoptose, a survivina também parece se relacionar com a proliferação celular, já tendo sido observada sua expressão tanto em tecidos em desenvolvimento quanto em alguns tecidos adultos como timo, endométrio e medula óssea (Jaskoll et al., 2001; Spaulding et al., 2006).

Um trabalho que avaliou a survivina em AP e carcinomas adenoides císticos de glândulas lacrimais encontrou diferenças na expressão da proteína nas lesões malignas e benignas. Além disso, dentre as lesões benignas, foi encontrada maior expressão de survivina dentre as recidivas do que dentre as lesões primárias e, quando avaliados os tumores malignos, foi encontrada uma menor expressão entre os tumores em fase inicial e maior em fases mais avançadas (Liao et al., 2009).

Apesar de a NF- κ B ser frequentemente avaliada em diversas neoplasias malignas, estudos sobre a sua expressão em neoplasias de glândula salivar são raros e relacionados à patogênese tumoral (Fukuda et al., 2008). Em um estudo realizado em modelo animal, os autores encontraram que o uso de uma

derivação da aspirina (HS-ASA) em células de neoplasia de mama levou a uma inibição da expressão de NF- κ B p65 e, conseqüentemente, a uma inibição da proliferação celular (Chattopadhyay et al., 2012).

A Trx é uma proteína endógena, pertencente ao sistema Trx, de ação antioxidante e de regulação da transcrição de NF- κ B (Al-Gayyar, et al., 2011). Ainda não são muitos os artigos que investigam a relação dessa proteína com o desenvolvimento e prognóstico de patologias. Na literatura são encontrados artigos relacionando a expressão do Trx com disfunção mitocondrial de células tumorais (Zhang et al., 2011) em glândulas salivares de pacientes com Síndrome de Sjögren (Kurimoto et al., 2007), mas parece que a literatura ainda não traz estudos que investiguem a ação dessa proteína com neoplasias de glândulas salivares.

TUNEL

A técnica do TUNEL (terminal deoxynucleotidil transferase-mediated deoxyuridine triphosphate biotin nick end-labeling) é uma das formas de detecção de células apoptóticas em cortes de tecidos em lâminas de histologia desenvolvido por Gavrieli et al. (1992), que visa a marcação da fragmentação do DNA no núcleo. Para isso, utiliza a enzima transferase deoxynucleotidil terminal para adicionar nucleotídeos aos fragmentos das fitas de DNA das células apoptóticas (Tilly, 1996).

Embora seja uma técnica sensível e extremamente difundida, é uma técnica de difícil execução e apresenta algumas falhas, como a marcação inespecífica de núcleos de células em fase de transcrição e em áreas de necrose, podendo facilmente gerar resultados falso-positivos (Duan et al., 2003; Resendes et al., 2004).

Objetivos

Objetivo Geral

O objetivo desse trabalho foi avaliar comparativamente a imunexpressão das proteínas associadas à apoptose em tumores de glândulas salivares, glândulas salivares normais e glândulas normais adjacentes aos tumores.

Objetivos Específicos

- 1) Descrever morfológicamente os padrões de imunexpressão das proteínas bcl-2, bax, caspase 8, caspase 3 NCL, caspase 3 clivada, Trx, survivina e NF- κ p65 em neoplasias de glândulas salivares, glândulas salivares normais e glândulas normais adjacentes aos tumores.
- 2) Verificar se há diferenças na expressão dessas proteínas entre os diversos grupos avaliados.
- 3) Verificar a relação entre a imunexpressão das proteínas e dados clínicos (idade dos pacientes, tamanho das lesões) e subtipo histológico nos casos de AP.
- 4) Descrever o padrão de marcação apresentado pelo TUNEL, nos AP GSMa e GN.

Justificativa

Acredita-se que a atividade apoptótica possa estar diminuída nas neoplasias de glândulas salivares, estando associada ao crescimento lento e ao comportamento desses tumores. Dessa forma, espera-se que os casos do trabalho avaliados com menor expressão de proteínas pró-apoptóticas estejam relacionados a determinados grupos etários, subtipos histológicos, maior diâmetro da lesão e maior expressão das proteínas antiapoptóticas. Uma vez que são escassos os artigos que abordam este tema, nosso estudo com caracterização da apoptose nestas neoplasias poderá contribuir para o maior entendimento da patogênese dessas lesões e fornecer subsídios para novas modalidades terapêuticas.

Metodologia

Para a realização do trabalho, o mesmo foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e aprovado sob o parecer número 0512.0.203.000-11 (Anexo).

Todos os casos incluídos no trabalho foram submetidos à coloração de hematoxilina e eosina (HE) e avaliados quanto ao diagnóstico histológico. A classificação histológica foi realizada apenas nos casos diagnosticados como AP.

Foram selecionados casos de neoplasias de glândulas salivares menores, maiores e glândulas salivares normais de dois centros de referência, sendo um o Laboratório de Patologia Bucocomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG (LPB - FOUFMG) e do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG. Do arquivo de lâminas do LPB – FOUFMG foram selecionados 31 casos de AP, todos de glândulas salivares menores (AP GSMe), 5 casos de ACPBG e 11 glândulas salivares normais, provenientes de biópsias de hiperplasia fibrosa com pouca inflamação próxima à área glandular. Do arquivo de lâminas do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina foram selecionados 12 casos de AP, todos de glândulas salivares maiores (AP GSMa), 1 adenoma de células basais, 1 cistoadenoma papilar linfomatoso, 1 ACPBG, 1 carcinoma adenoide cístico, 1 carcinoma de células acinares, 1 carcinoma de ducto salivar e 1 carcinoma mucoepidermoide. Todos os casos da Faculdade de Medicina foram provenientes de biópsia excisional ou enucleação, possibilitando a visualização de toda a peça cirúrgica em todos os casos, com revisão das lâminas coradas em HE (hematoxilina e eosina). A amostra foi de conveniência, sendo selecionados os casos que apresentavam material suficiente para análise e com diagnóstico histológico compatível com o estudo. Quantidades insuficientes de material para adequada avaliação, blocos de inclusão em parafina ausentes, pacientes que se recusaram a participar do estudo ou casos cuja localização não foi em glândula salivar foram excluídos da amostra. Não foram adotados critérios de exclusão relativos a gênero, cor, idade, nacionalidade, procedência, profissão ou outros.

Os dados clínicos coletados das fichas de biópsia constaram de gênero, idade, localização da lesão e nos casos das enucleações e biópsias excisionais também foram coletados dados referentes ao tamanho da lesão. Não foi possível coletar dados referentes a recidivas ou sobrevida.

Quanto à classificação histológica, os casos de AP foram classificados como tipo clássico (tipo I), sendo aqueles que apresentavam cerca de 50% estroma e 50% células; tipo estromal (tipo II), compreendendo os casos de predominância de estroma; tipo celularizado (tipo III), correspondendo às lâminas com predominância celular, e tipo monomórfico (tipo IV) sendo os casos celularizados, porém com padrão monomórfico das células, de acordo com Seifert et al. (1976). Após a classificação, a amostra foi dicotomizada, sendo o grupo A composto pelos tipos I e II e o grupo B composto pelos tipos III e IV, de acordo com Viana et al. (2013).

Para as análises das proteínas *versus* idade no AP foram avaliadas 3 faixas etárias, considerando que o pico de ocorrência dessa neoplasia ocorre entre 30 e 50 anos (Marioni et al., 2003; Barnes et al., 2009). Sendo assim, o primeiro grupo consiste nas idades antes do pico, o segundo consiste da faixa de maior incidência e o terceiro grupo consta dos pacientes com idade acima de 50 anos.

As glândulas salivares normais adjacentes aos tumores foram selecionadas a partir dos tumores já incluídos na amostra, tendo sido encontradas em 10 casos de AP GSMe, 11 casos de AP GSMa e 4 casos de ACPBG. Nas demais neoplasias, as glândulas adjacentes foram observadas eventualmente sendo que, apenas após a realização da imunoistoquímica, é que foi possível observar se o corte apresentava a glândula adjacente. O critério de seleção foi presença ou ausência da glândula normal adjacente ao tumor.

Todos os casos foram submetidos à técnica imunoistoquímica para os anticorpos anti-bcl-2, anti-bax, anti-caspase 3 NCL, anti-caspase 8, anti-caspase 3 clivado, anti-Trx, anti-survivina e anti- Nf-k β -p65. Um caso de cada subtipo histológico de AP GSMe foi submetido à técnica do TUNEL.

Imunoistoquímica

Para a realização da técnica de imunoistoquímica, os cortes histológicos foram cortados com espessura de 4 μ m e montados em lâminas de vidro com carga (StarFrost Knittel). Segue abaixo a sequência do protocolo utilizado para todos os anticorpos:

1. Banho em xilol I por 15 minutos em temperatura ambiente;
2. Banho em xilol II por 15 minutos em temperatura ambiente;
3. Recuperação dos epitopos antigênicos pesquisados em Steamer, sendo 2 banhos de 20 minutos em solução Trilogy® (Cell Marque)
4. Após o resfriamento, alcançando equilíbrio térmico com o meio ambiente, lavagem em cinco banhos de água destilada;
5. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
6. Procede-se ao bloqueio da peroxidase endógena por incubação dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 10% (v/v) em dois banhos de 15 minutos;
7. Incubação com os anticorpos primários monoclonais (Tabela 1);
8. Lavagem em solução em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
9. Incubação em anticorpo secundário livre de biotina (Advance, DAKO, Carpinteria, EUA), por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido;
10. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
11. Incubação em solução de complexo terciário livre de biotina (Sistema Advance, DAKO, Carpinteria, EUA), por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido;
12. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
13. Incubação com tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina (DAKO, Carpinteria, EUA) líquida por 3 minutos;
14. Lavagem em 5 banhos de água destilada;
15. Contracoloração com hematoxilina de Mayer por 20 segundos;
16. Lavagem em 5 banhos de água destilada;

17. Desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanização em dois banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permunt (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Tabela 1 - Anticorpos primários, fabricantes, diluição, método de recuperação e imunomarcação

Proteína	Clone	Fabricante	Diluição	Tratamento	Incubação	Imunomarcação
Bcl-2	124	Dako	1:100	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Citoplasmática
Bax	Ab-1(2D2)	Neo Markers	1:100	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Citoplasmática
Caspase 3	NCL-CPP 32	Leica	1:100	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Citoplasmática
Caspase 3	3CSPO3	Biogen	1:100	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Citoplasmática
Caspase 8	NCL-Casp8	Leica	1:100	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Citoplasmática
Survivina	N/A	Spring	1:50	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Nuclear e citoplasmática
Trx	FL-105	Santa Cruz	1:100	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Nuclear e citoplasmática
NF-kBp65	SC-109	Santa Cruz	1:700	Trilogy / Steamer	1 hora / TA	Nuclear

Controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário. Como controle positivo, foram utilizados cortes de hiperplasia fibrosa sabidamente positivos para bcl-2, carcinoma de células escamosas para survivina e de tonsila para os demais anticorpos.

A análise da imunomarcação foi feita de forma semi-quantitativa pelo método "Quickscore" (Detre et al., 1995) avaliando-se tanto a intensidade quanto a área de marcação, de acordo com o método utilizado nos trabalhos de Ko et al., (2010) e Nikitakis et al., (2009), conforme o descrito abaixo:

Avaliação da área de marcação:

0% de marcação – score 0;

até 20% de marcação – score 1;

acima de 20 até 50% de marcação – score 2;

acima de 50% de marcação – score 3.

Avaliação em relação à intensidade de marcação:

marcação ausente – score 0;

marcação fraca – score 1;

marcação moderada – score 2;

marcação forte – score 3.

Após a análise da intensidade da marcação e da área marcada, os dois índices foram multiplicados estabelecendo-se um índice final para cada lâmina. O resultado final foi dicotomizado, sendo consideradas negativas as lâminas com índices finais de 1, 2 e 3 e positivas aquelas de índice entre 4 e 9 (Ko et al., 2010 e Nikitakis et al., 2009).

Para todas as proteínas avaliadas foi considerado o padrão de marcação citoplasmático, com exceção do Nf- κ B-65 e survivina. A análise da survivina foi feita considerando-se juntamente a marcação nuclear e citoplasmática. Já a análise do Nf- κ B-p65, apesar de a expressão ter sido observada tanto em núcleo quanto em citoplasma, considerou-se como marcação apenas o padrão nuclear. Os mesmos índices foram aplicados para a análise de todas as proteínas.

Para a avaliação da imunoistoquímica foi realizada uma calibração dos dois observadores (MCFA, DCR). Em sequência cada examinador avaliou as lâminas separadamente e, em seguida, os resultados foram tabulados e submetidos ao teste de *Kappa*, sendo o valor do mesmo de 0,7 ($p=0,002$) (<http://lee.dante.br/kappa/Kappa>).

Técnica do TUNEL

Para a realização da técnica do TUNEL, cortes de 4 μ m foram montados em lâminas carregadas eletrostaticamente (Start Frost- Knittel) e o protocolo seguido foi o do Kit Calbiochem, (San Diego, CA, USA) protocolo QIA33.

1. Desparafinização das lâminas de xilol I por 15' e xilol II por 15';
2. Lavagem em tampão TBS;

3. Hidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 100%, 90%, 80% e 70%), 5' cada;
3. Digestão enzimática (proteínase K) a temperatura ambiente por 20';
4. Lavagem em tampão TBS;
5. Inativação da peroxidase endógena;
6. Lavagem em tampão TBS;
7. Estabilização do pH (equilibration buffer), a temperatura ambiente por 30';
8. Incubação TdT (terminal deoxinucleotidil transferase), a 37°, por 1,5h;
9. Incubação no Stop Buffer, a temperatura ambiente por 5';
10. Lavagem em tampão TBS;
11. Incubação no Stop Solution, a temperatura ambiente por 5';
12. Incubação no Blocking buffer, a temperatura ambiente por 10';
13. Lavagem em tampão TBS;
14. Incubação com tetrahydrocloridrato de diaminobenzidina (DAB) por 15';
15. Lavagem em tampão TBS;
16. Contracoloração com verde de metila, temperatura ambiente por 3';
17. Dois banhos em etanol 100%;
18. Um banho em xileno,
19. Montagem em Permount®

O controle negativo consistiu na substituição da TdT por água e o controle positivo feito com corte de timo humano.

A análise do TUNEL não foi feita de forma quantitativa e, sim, descritiva do padrão de marcação encontrado.

Análise estatística

A análise estatística foi realizada com objetivo de se verificar, entre os diferentes grupos estudados (AP GSMe, AP GSMa, GN, gla adj), possíveis diferenças na expressão de cada uma das proteínas. A análise foi realizada com todas as proteínas, exceto com Nf- κ B p65, uma vez que todos os casos se mostraram negativos. O programa estatístico utilizado foi o SPSS (versão 19.0)

e a análise feita pelos testes chi-quadrado de Pearson, teste exato de Fisher e teste de McNemar, sendo considerados $p < 0,05$ para todos os testes.

Resultados

Dados gerais

Os dados clínicos (idade e gênero), classificação histológica, localização e tamanho da lesão de todos os casos da amostra estão descritos na tabela 2.

Nas GN (11 casos avaliados) a análise descritiva da imunohistoquímica foi realizada considerando-se separadamente ductos e ácinos. Para a realização dos testes estatísticos o índice final da glândula foi representado pela análise conjunta da imunomarcagem das duas regiões. Desse modo, o resultado final obtido, na maior parte das vezes, deu-se em extensão pela área acinar, uma vez que essa região representa a maior porção do parênquima glandular, enquanto, para a intensidade final, prevaleceu o padrão observado na região dos ductos, que, em geral, representava a área positiva. As imagens das reações de imunohistoquímica podem ser observadas na figura 2.

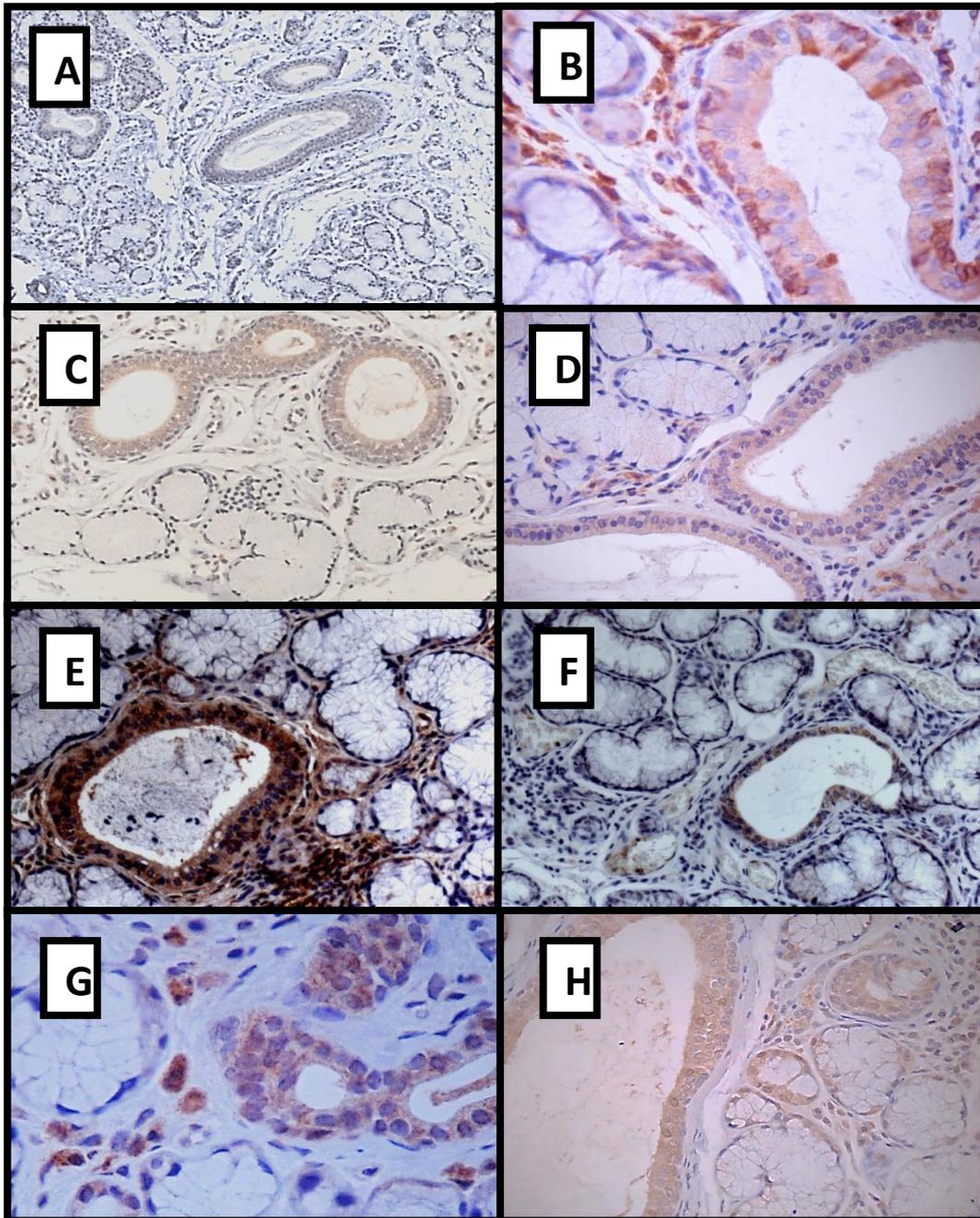
Dentre os casos de AP em GSMe, 19 apresentaram-se no gênero feminino e 12 no masculino e, dentre os de GSMa, 06 no gênero feminino e 06 no masculino, totalizando uma amostra de 25 casos femininos e 18 masculinos. A idade foi estratificada e apresentou uma leve diferença nos picos de idade entre as neoplasias de GSMe e GSMa. Quando avaliados como um único grupo, a faixa etária mais envolvida esteve entre 0-29 anos.

Quando avaliados em relação à classificação histológica, dentre os casos de AP GSMe, 26 apresentavam-se como tipos I e II, enquanto 5 casos encontravam-se no grupo dos tipos III e IV. Destes últimos 5 casos, 4 apresentaram positividade para bcl-2 e caspase 3 não clivada, 3 com positividade para caspase 3 clivada e caspase 8 e 2 casos mostraram-se positivos para Trx. Já entre o grupo AP GSMa, 11 casos foram classificados tipos 1 e 2 e apenas 1 caso no grupo 3 e 4, sendo que este apresentou-se positivo apenas para as caspases 3 e 8 não clivadas e bcl-2.

O dado referente ao tamanho da lesão também foi coletado. Tamanhos variados de lesões foram encontrados independentemente da idade dos pacientes. O ponto de corte, proposto por Alves et al. (2002), de 3,5 cm de diâmetro para classificar as lesões como grande ou pequenas também foi

aplicado no nosso trabalho, no grupo AP GSMa. Dessa forma, encontramos 7 casos com diâmetro igual ou menor que 3,5 cm e 5 casos maiores que o valor de corte. O único caso classificado histologicamente como tipo III apresentou diâmetro inferior ao ponto de corte. Nenhuma proteína mostrou associação estatística com o tamanho da lesão (caspase 3 clivada $p=0,417$; Trx $p=1,0$; bax $p=0,205$; bcl-2 $p=0,417$). No entanto, encontramos um resultado bem interessante quanto à análise de correlação. Os índices de correlação entre o tamanho das lesões e a caspase 3 clivada, a Trx, a bax e a bcl-2 foram respectivamente: +0,357; -0,029; +0,488 e -0,357, sendo, portanto, encontradas correlações tanto positivas quanto negativas e inversas.

Figura 2 – Imunoistoquímica das glândulas salivares normais para bax, bcl-2, caspase 3 NCL, caspase 8 NCL, survivina, Nf-k β p65, caspase 3 clivada e Trx.



Legenda:

- A) Bax; negatividade dos ácinos e expressão fraca restrita as células ductais luminais;
- B) Bcl-2; negatividade dos ácinos e expressão forte restrita as células do ducto estriado;
- C) Casp 3 NCL; negatividade dos ácinos e expressão moderada restrita as células ductais luminais;
- D) Casp 8 NCL; negatividade dos ácinos e expressão moderada restrita as células do ducto estriado;
- E) Nf-k β p65; negatividade dos ácinos e expressão forte restrita as células ductais luminais;
- F) Survivina; negatividade dos ácinos e expressão moderada restrita as células ductais luminais;
- G) Caspase 3 clivada; negatividade dos ácinos e expressão moderada restrita as células ductais;
- H) Trx; negatividade dos ácinos e expressão moderada restrita as células ductais.

Resultados bax

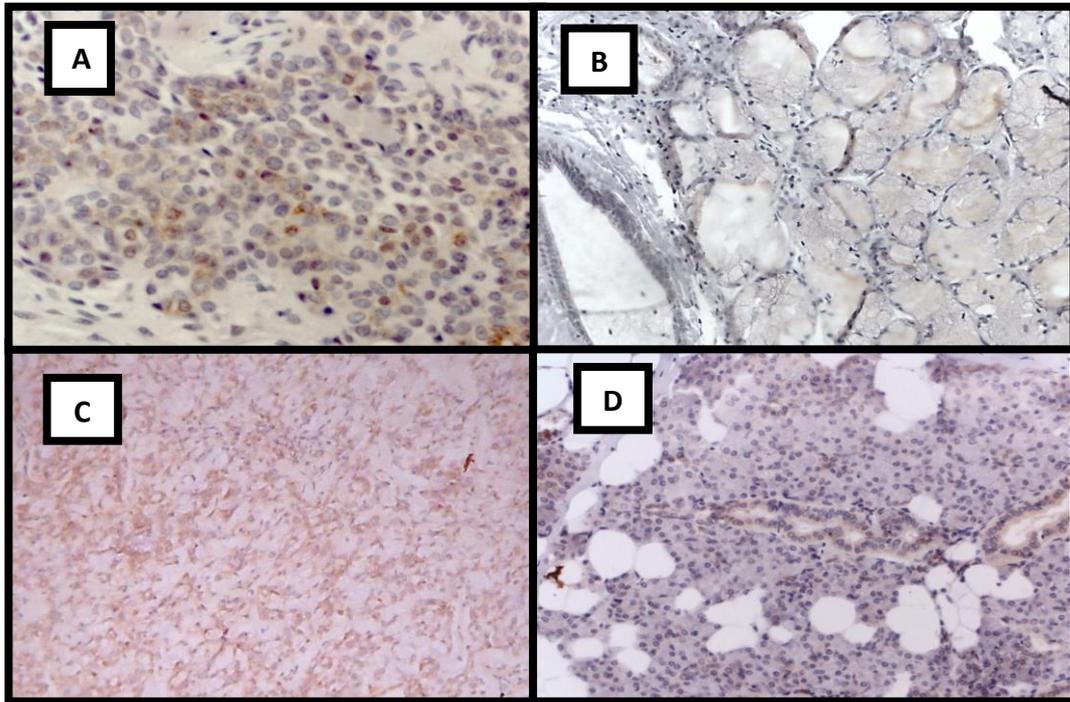
Na análise da bax, a imunomarcção da glândula como um todo (figura 2A) mostrou que apenas um dos 11 casos apresentou-se positivo para a proteína. Quando analisadas as estruturas separadamente, os ácinos apresentaram-se negativos em todos os casos e, entre os ductos, 2 (18,2%) casos foram positivos. O resultado sugere uma baixa expressão dessa proteína na glândula normal.

Já a avaliação da bax nos AP (figura 3) mostrou uma baixa expressão da proteína nos AP das GSMe (5/31 casos positivos), nas glândulas adjacentes (1/10 casos positivos) e na GN (1/11 caso positivo). O grupo de AP das GSMA (9/12 casos positivos, 75%) e glândula adjacente ao tumor (7/11 casos positivos) apresentaram uma maior imunoexpressão da mesma quando comparada à glândula normal (1/11 caso positivo).

A análise estatística, pelo teste exato de Fisher, não encontrou associação entre as GN e os AP agrupados ($p=0,153$), nem quando analisados os grupos GN e AP GSMe ($p=1,0$). No entanto, foi encontrada uma associação entre a glândula normal e AP GSMA ($p=0,003$). Já as GN e GSMe gla adj ($p=1,0$) também não apresentaram associação, diferentemente da GN e GSMA gla adj ($p=0,024$). O teste de McNemar não encontrou associação entre o AP GSMA e sua glândula adjacente ($p=1,0$), nem entre AP GSMe e sua glândula adjacente ($p=1,0$).

A imunomarcção para a bax foi observada no carcinoma de células acinares e no carcinoma adenoide cístico, enquanto nas glândulas adjacentes a este tumor não se observou a marcação. Já o carcinoma do ducto salivar e o carcinoma mucoepidermoide foram negativos para a mesma. Os ACPBG apresentaram-se, na maior parte dos casos, negativos para a bax (83,3%), semelhante ao observado nas glândulas normais (1/11 caso positivo) e 100% dos casos das glândulas adjacentes foram negativas para a bax. O adenoma de células basais e o tumor de Warthin se mostraram positivos para a proteína (figura 4). Esses casos foram submetidos apenas à análise descritiva.

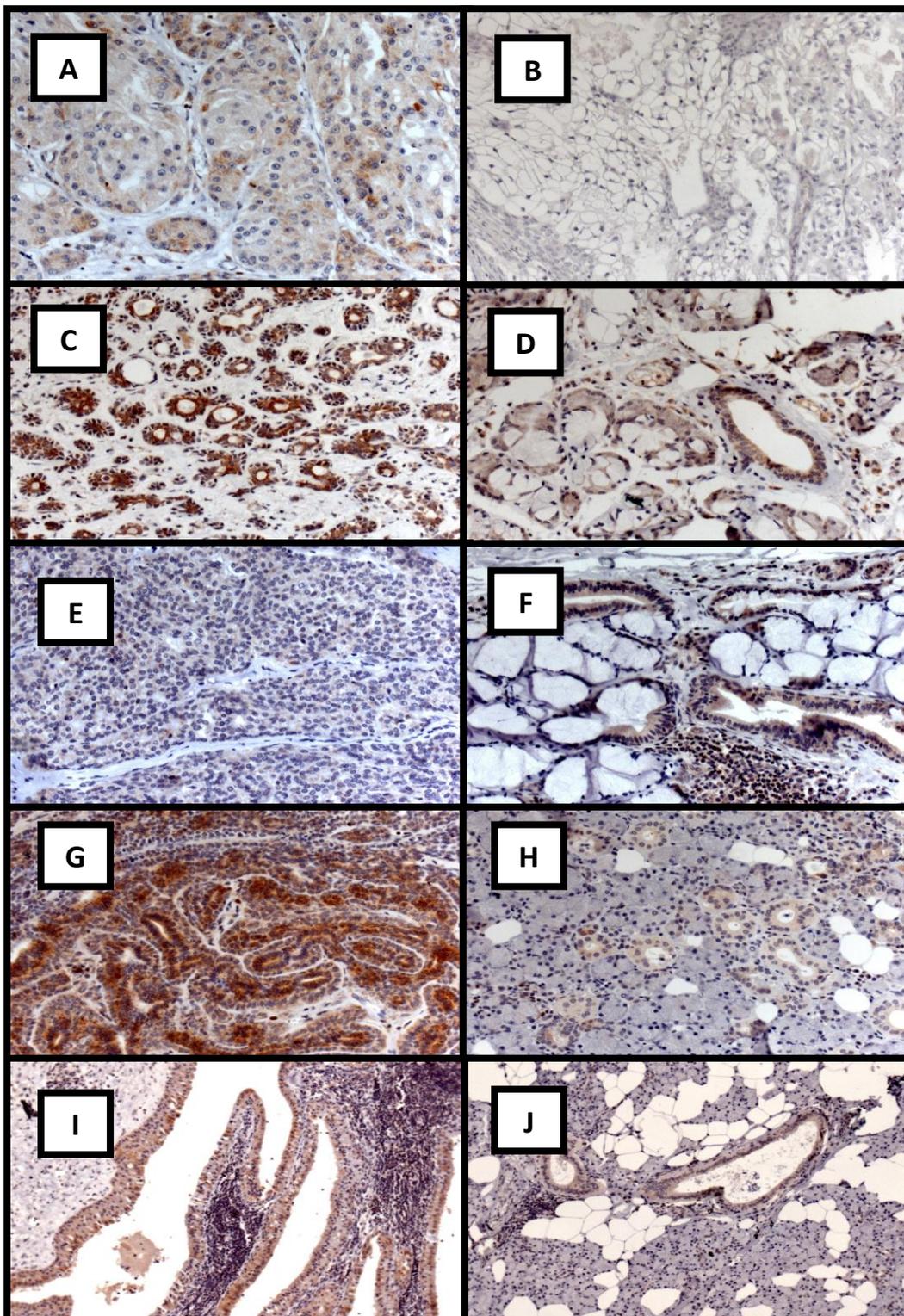
Figura 3 - Imunoistoquímica bax, adenoma pleomórfico e glândulas salivares adjacentes à lesão.



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção fraca das células tumorais, dispostas em padrão difuso;
- B) GSMe gla adj; imunomarcção fraca restrita às células ductais;
- C) AP GSMa; imunomarcção fraca das células tumorais, dispostas em padrão difuso;
- D) GSMa Adj, imunomarcção fraca, restrita às células ductais.

Figura 4 – Imunomarcacão para bax; outras neoplasias das glândulas salivares.



Legenda:

- A) Ca células acinares; imunomarcção fraca das células tumorais;
- B) Ca mucoepidermoide; lâmina negativa para essa proteína;
- C) CAC, imunomarcção forte das células tumorais;
- D) CAC gla adj; imunomarcção moderada restrita aos ductos e semiluas serosas;
- E) ACPBG; imunomarcção fraca das células tumorais, em disposição difusa;
- F) ACPBG gld adj; imunomarcção moderada restrita aos ductos.
- G) Adenoma de células basais; imunomarcção forte e difusa no padrão trabecular;
- H) Adenoma de células basais gld adj; imunomarcção moderada em ductos;
- I) Tumor de Warthin; imunomarcção moderada no componente epitelial;
- J) Tumor de Warthin gld adj; imunomarcção moderada dos ductos.

Resultado bcl-2

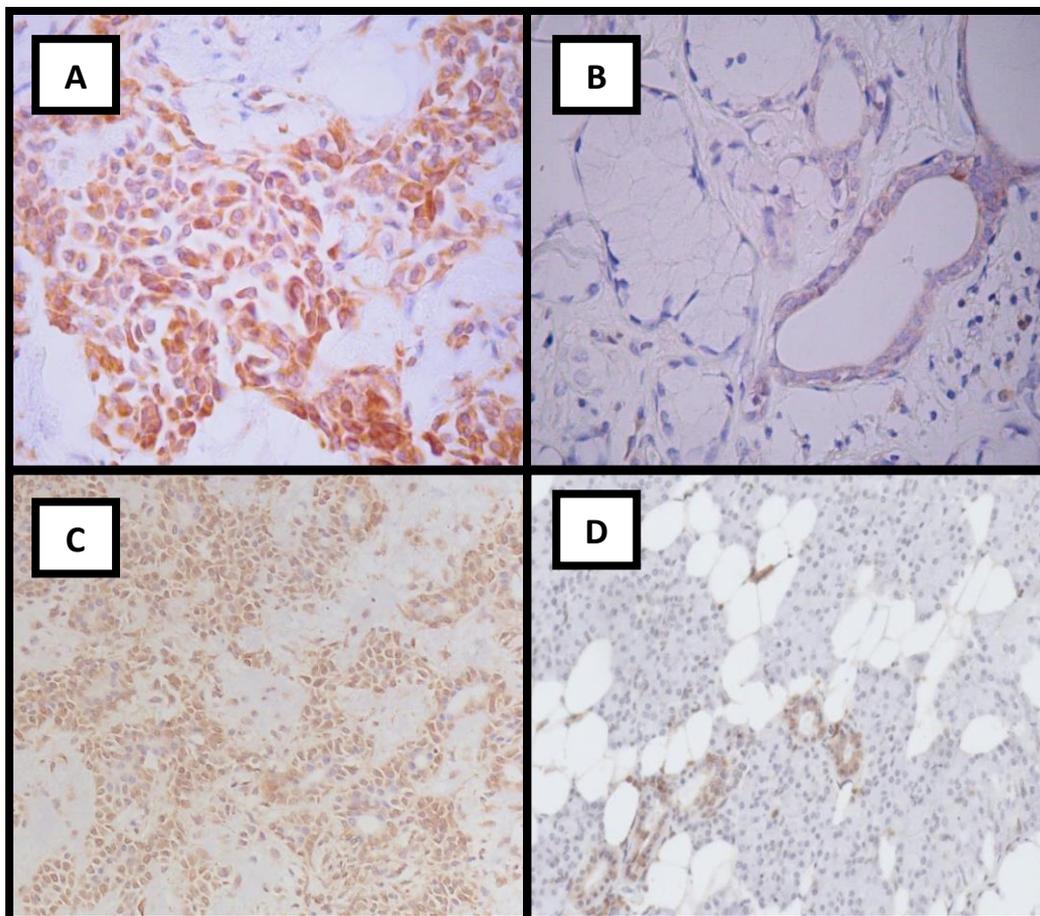
Quando analisada a imunomarcção glandular não associada ao tumor, a avaliação da glândula como um todo mostrou 7 casos negativos (63,6%), enquanto 100% dos ácinos foram negativos e 8 (72,7%) casos apresentaram ductos positivos para a proteína (figura 2b).

Quando avaliada a imunomarcção da bcl-2 (figura 5), os AP das GSMe e das GSMa apresentaram, ambos, uma grande expressão dessa proteína (22 casos e 11 casos respectivamente) , proporcionalmente maior do que o observado na glândula normal (4/11 casos). No entanto observou-se uma similaridade entre as glândulas normais e as adjacentes aos tumores para as imunoexpressões da bcl-2 (4/11 casos positivos), que apresentaram positividade em 3 (GSMe gla adj) e 3 (GSMa gla adj) casos dentre os casos analisados de cada grupo.

O teste exato de Fisher apresentou uma associação estatística entre a GN e AP quando avaliados conjuntamente ($p=0,025$) entre a GN e AP GSMa ($p=0,009$) e uma tendência à associação entre GN e AP GSMe ($p=0,07$). Já as GN e as glândulas adjacentes não apresentaram associação entre GN e AP GSMa gla adj ($p=1,0$) ou GN e GSMe gla adj ($p=1,0$). O teste de McNemar apresentou associação entre o AP GSMe e sua glândula adjacente ($p=0,031$) e uma tendência à associação entre AP GSMa e sua glândula adjacente ($p=0,07$).

A bcl-2 (figura 6) mostrou positividade para o carcinoma de células acinares e para o carcinoma adenoide cístico, enquanto as glândulas adjacentes a este último tumor mostraram-se negativas para essa proteína. Já o carcinoma do ducto salivar e o carcinoma mucoepidermoide, bem como as glândulas adjacentes a ele, foram negativos para bcl-2. Os ACPBG apresentaram um aumento da imunoexpressão em relação à glândula normal, enquanto a marcação da glândula adjacente mostrou-se similar à normal. Dentre as demais neoplasias benignas, apenas o adenoma de células basais mostrou-se positivo para esta proteína. Esses casos foram submetidos apenas à análise descritiva.

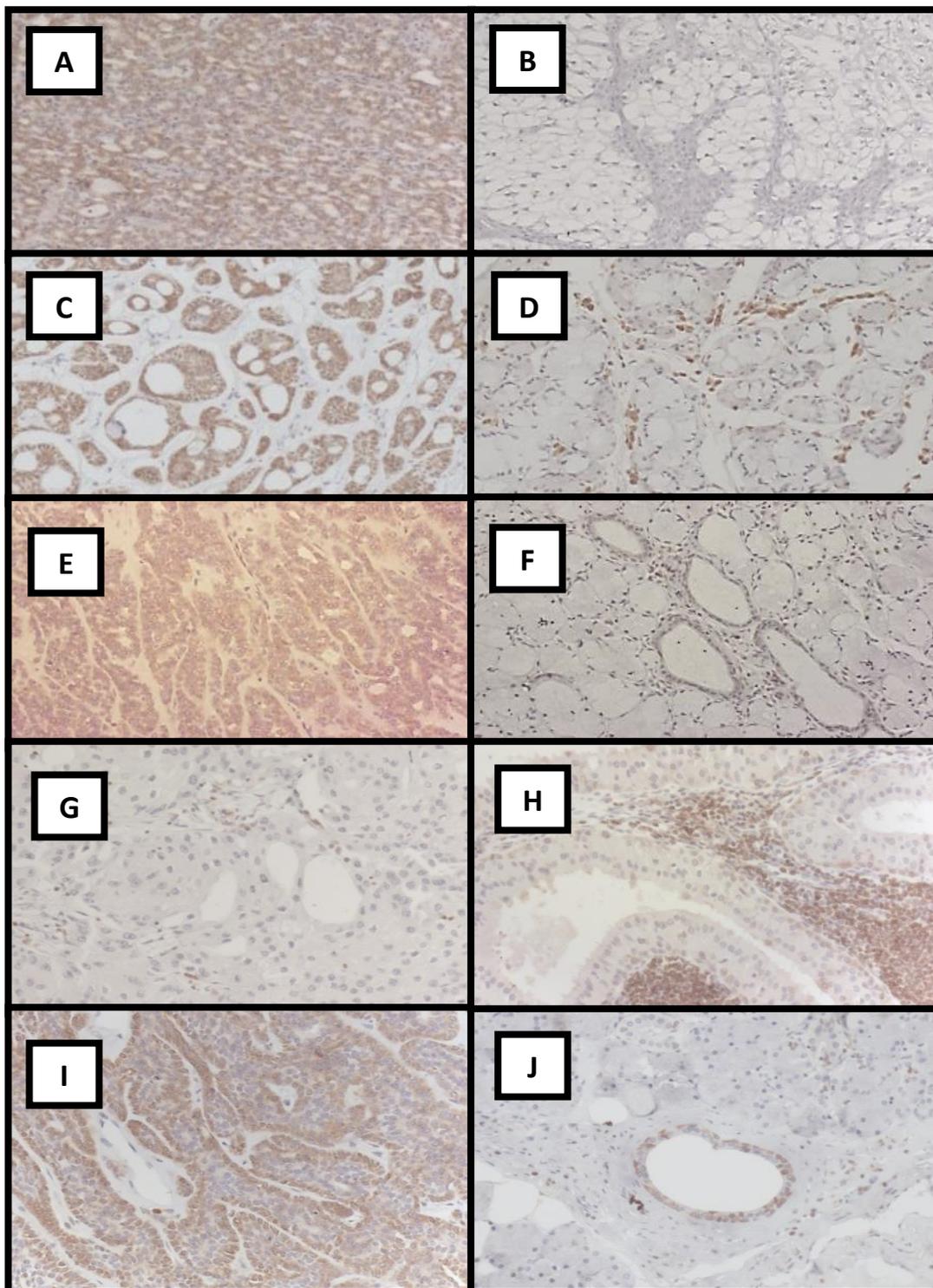
Figura 5 - Imunoistoquímica bcl-2, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão.



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção forte das células tumorais, dispostas em lençóis e ninhos;
- B) GSMe gla adj; imunomarcção fraca restrita aos ductos estriados
- C) AP GSMa; imunomarcção forte das células tumorais, dispostas de forma difusa;
- D) GSMa gla adj; imunomarcção moderada restrita aos ductos estriados e intercalares.

Figura 6 - Imunomarcção bcl-2, outras neoplasias das glândulas salivares.



Legenda:

- A) Ca células acinares; imunomarcção forte, de padrão difuso;
- B) Ca mucoepidermoide; negatividade para a lesão;
- C) CAC, imunomarcção forte das células epiteliais do padrão cribiforme;
- D) CAC gla adj; negatividade tanto para ductos quanto para ácidos;
- E) ACPBG; imunopositividade fraca e difusa;
- F) ACPBG gla adj; imunopositividade fraca em ductos.
- G) Ca ducto salivar; negatividade do caso;
- H) Tumor Warthin; predominantemente negativo, com componente epitelial apresentando-se focalmente com imunomarcção fraca;
- I) Adenoma de células basais; imunomarcção forte, principalmente nas células periféricas;
- J) Adenoma células basais gla adj; positividade focal em ductos e negatividade dos ácidos.

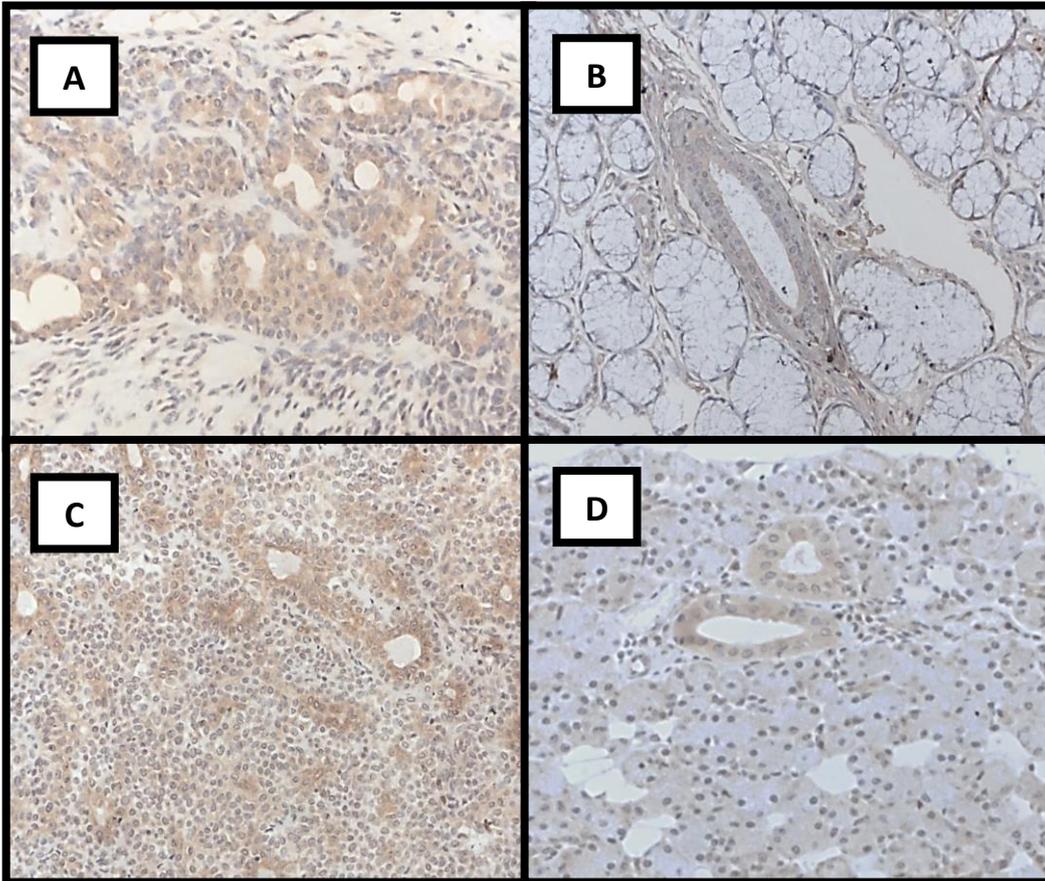
Resultado caspase 3 não clivada (NCL)

Na avaliação da caspase 3, a glândula como um todo apresentou 7 casos negativos. Dentre os ductos, 9 casos foram negativos e, dentre os ácinos, 7 foram negativos, assemelhando-se com o resultado da glândula como um todo (figura 2C).

A imunoexpressão da caspase 3 não clivada (figura 7) foi observada em 23 dos 43 casos de AP (15 GSMe e 8 GSMa), sendo 48,4% e 66,7% de casos positivos respectivamente. Nas GSMe gla adj ao AP, 6 casos (60%) mostraram-se positivos enquanto dentre as GSMa gla adj ao tumor foram observados 6 casos positivos, equivalendo a 54,5%, expressão discretamente maior que aquela observada nas glândulas normais não associadas (36,4%). O resultado da imunomarcção para caspase 3 não clivada não foi submetida a testes estatísticos uma vez que essa mesma proteína, na sua forma clivada, portanto mais específica no processo apoptótico, também foi avaliada neste trabalho. Os resultados da caspase 3 NCL foram submetidos apenas à análise descritiva.

A caspase 3 não clivada (figura 8) apresentou positividade para o carcinoma adenoide cístico e para o carcinoma de células acinares. Destes, apenas o carcinoma adenoide cístico apresentou glândula adjacente, e a mesma mostrou-se positiva para a proteína. No grupo dos ACPBG apenas 2 casos foram positivos para caspase 3 e, das duas glândulas adjacentes à lesão, ambas foram negativas. Das neoplasias benignas, apenas o adenoma de células basais apresentou positividade, bem como as glândulas adjacentes ao tumor. O tumor de Warthin e a glândula adjacente mostraram-se negativas. Esses casos foram submetidos apenas à análise descritiva.

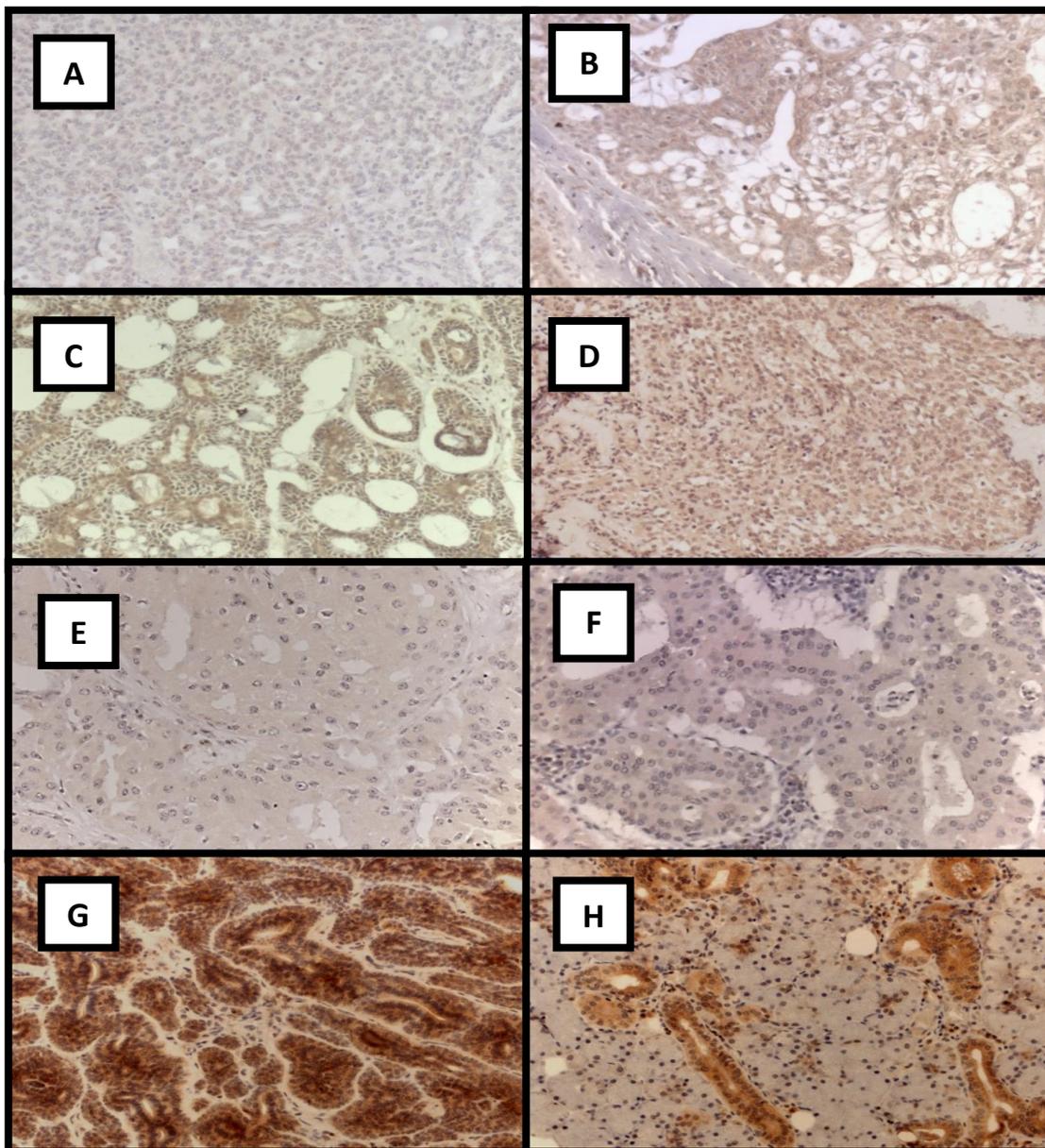
Figura 7 – Imunoistoquímica caspase 3 não clivada, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção forte em áreas de ninhos e ductos;
- B) GSMe gla adj; imunomarcção fraca restrita a células ductais lumiais;
- C) AP GSMa; ; imunomarcção forte em áreas de ninhos e ductos;
- D) GSMa gla adj imunomarcção moderada restrita a ductos estriado e intercalar.

Figura 8 – Imunomarcacão caspase 3 não clivada, outras neoplasias das glândulas salivares



Legenda:

- A) Ca ducto salivar; imunomarcção negativa;
- B) Tumor de Warthin; imunomarcção negativa;
- C) Adenoma de células basais; imunomarcção forte;
- D) Adenoma células basais gla adj; imunomarcção forte principalmente em ductos.
- E) Ca células acinares; imunomarcção positiva;
- F) Ca mucoepidermoide; imunomarcção negativa no tumor, com marcação fraca e inespecífica em estroma;
- G) CAC; imunomarcção moderada
- H) ACPBG; imunomarcção moderada e difusa.

Resultado caspase 3 clivada

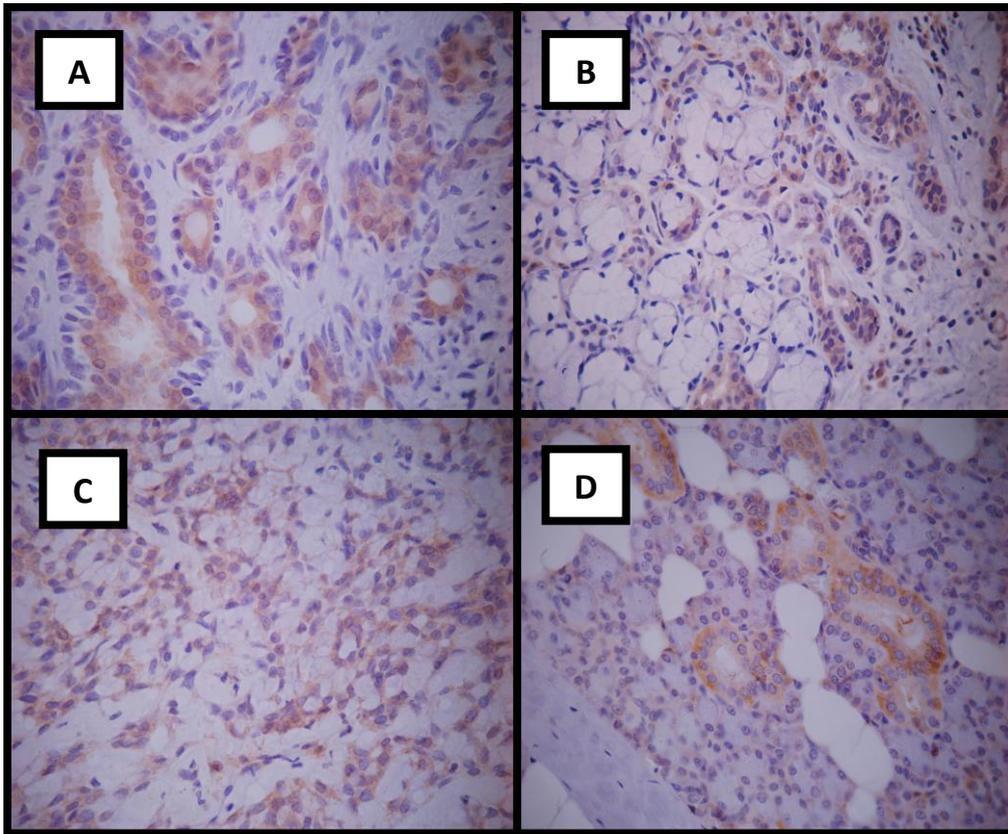
A imunistoquímica anti-caspase 3 clivada foi realizada em 10 casos de GN (figura 2g). Na análise da glândula como um todo, apenas um caso mostrou-se positivo. Esse mesmo caso apresentou também positividade para os ductos. Todos os casos apresentaram negatividade para os ácinos.

Quando analisados os AP, dos 12 casos de AP das GSMa apenas 1 apresentou-se positivo para a mesma (figura 9). Dos GSMa gla adj, 10 casos ainda se encontravam viáveis para análise imunistoquímica. Destes, apenas 1 apresentou-se positivo. Dos AP GSMe, 28 ainda se apresentavam viáveis para análise imunistoquímica. Destes, apenas 6 (21,4%) apresentaram-se positivos. Entre os casos com glândulas adjacentes, 8 ainda exibiam material suficiente para análise e todas as 8 apresentaram-se negativas.

O teste exato de Fisher e Chi-quadrado de Pearson não encontraram associação entre GN e os AP associados ($p=0,95$), nem entre GN e AP GSMa ($p=0,68$) ou GN e AP GSMe ($p=0,726$). A GN e GSMa gla adj ($p=1,0$) e GN e GSMe gla adj ($p=1,0$) também não apresentaram associação. O teste de McNemar também não encontrou associação entre as GN e GSMa gla adj ($p=0,625$), nem GN a GSMe gla adj ($p=1,0$).

Na análise dos outros tumores, encontramos positividade nos casos de tumor de Warthin, carcinoma adenoide cístico, adenoma de células basais e negatividade para o carcinoma de células acinares, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma do ducto salivar. Das glândulas adjacentes a esses tumores encontramos positividade apenas para o adenoma de células basais. Dentre os ACPBG, apenas 1 caso mostrou-se positivo e, das glândulas adjacentes a esse tumor, todas mostraram-se negativas. Esses casos foram submetidos apenas à análise descritiva (figura 10).

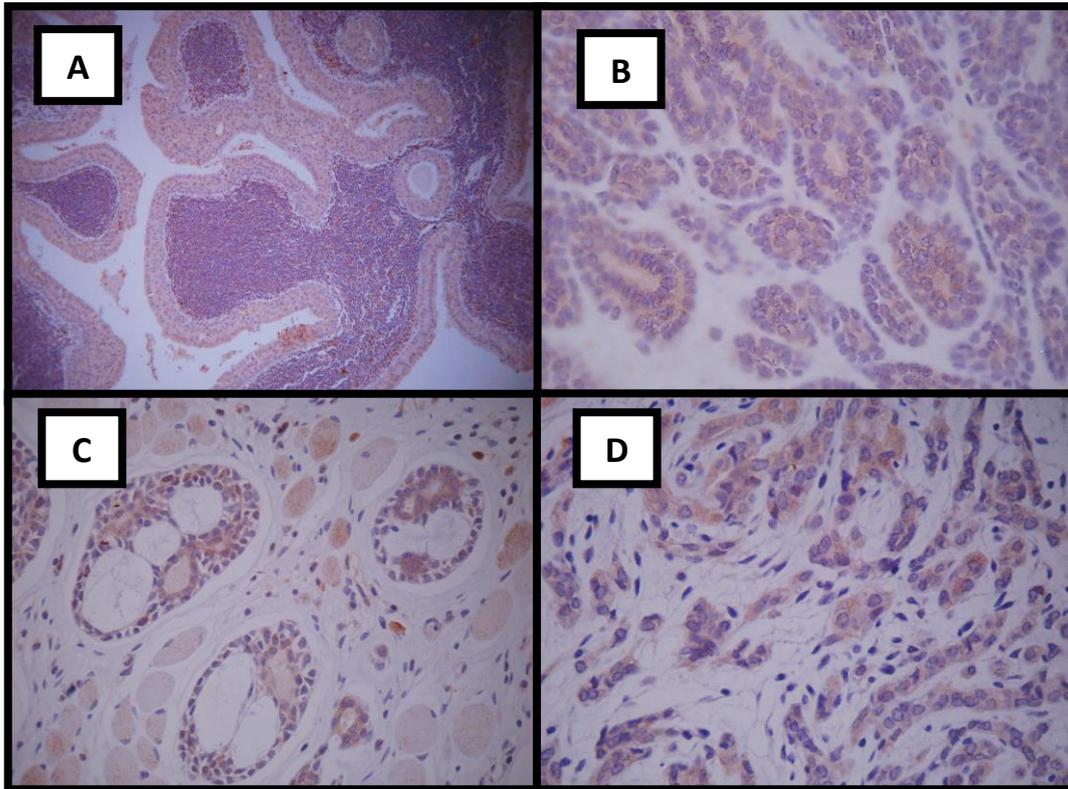
Figura 9 - Imunoistoquímica caspase 3 clivada, adenoma pleomórfico e glândulas salivares adjacentes à lesão



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção forte, principalmente em áreas de formações ductais;
- B) GSMe gla adj; imunomarcção moderada restrita às células ductais;
- C) AP GSMa; imunomarcção forte das células tumorais, de padrão difuso;
- D) GSMa gla adj; imunomarcção moderada de ductos.

Figura 10 - Imunomarcção caspase 3 clivada, outras neoplasias das glândulas salivares.



Legenda:

- A) Tumor de Warthin, imunomarcção forte do componente epitelial;
- B) Adenoma de células basais; imunomarcção moderada difusa das células tumorais;
- C) CAC; imunomarcção forte em formações cribiformes;
- D) ACPBG; imunomarcção forte e difusa;

Resultado caspase 8

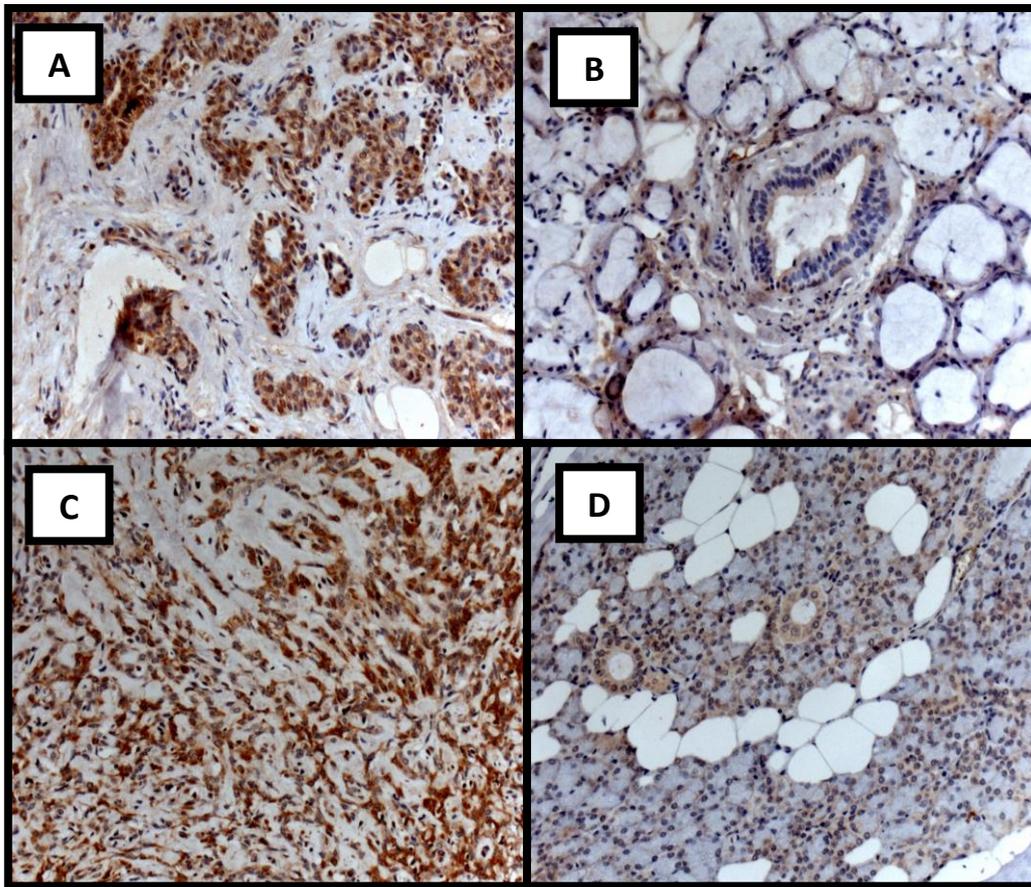
Na avaliação da caspase 8 foram observados 2 casos (18,2%) negativos, quando avaliada toda a glândula (figura 2D). Quando analisadas as estruturas separadamente, foram encontrados todos os casos negativos para os ácinos e 9 casos negativos (81,8%) para os ductos.

Na avaliação da imunomarcagem dos AP (figura 11), tanto os relacionados às GSMe quanto os relacionados às GSMa, apresentaram-se positivos para caspase 8 (80% e 100% respectivamente). Já as glândulas adjacentes aos tumores apresentaram resultados diferentes entre os grupos. Enquanto as glândulas adjacentes aos AP GSMa mostraram imunoexpressão semelhante à glândula normal (2/11 positivos, 18,2% casos positivos em ambas), as glândulas salivares adjacentes aos AP GSMe apresentaram 6 casos positivos (60%).

O teste exato de Fisher mostrou associação entre GN e AP juntos ($p=0,0$), que se manteve na análise separada GN e AP GSMa ($p=0,0$) e GN e AP GSMe ($p=0,0$). A análise entre os grupos de glândulas normais não apresentou associação entre GN e GSMa gla adj ($p=1,0$) e GN e GSMe gla adj ($p=0,8$). O teste de McNemar já não apresentou associação entre AP GSMe e suas glândulas adjacentes ($p=0,5$) e não foi realizado entre AP GSMa e suas glândulas adjacentes pela distribuição dos dados se tratarem de uma constante.

Já o carcinoma de células acinares, o carcinoma do ducto salivar e o carcinoma mucoepidermoide mostraram-se negativos para a mesma. O grupo dos ACPBG mostrou positividade para caspase 8 em 50% dos casos e negatividade para as glândulas salivares adjacentes à lesão (figuras 12). As neoplasias benignas mostraram-se negativas para caspase 8. Esses casos não foram submetidos à análise estatística. Esses casos foram submetidos apenas à análise descritiva.

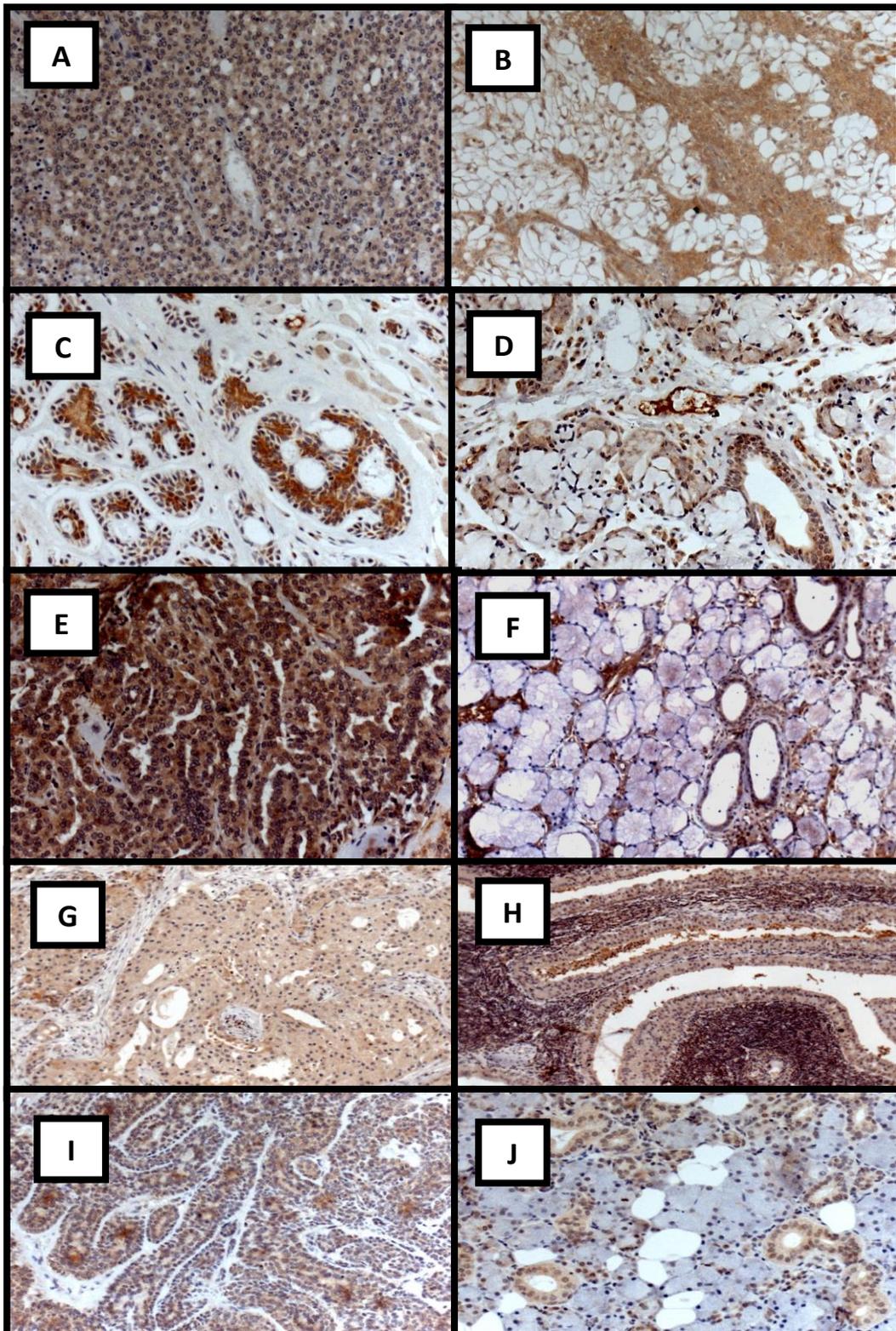
Figura 11 - Imunoistoquímica caspase 8, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção forte, principalmente em áreas de formações ductais;
- B) GSMe gla adj; imunomarcção moderada restrita às células ductais lumiais;
- C) AP GSMa; imunomarcção forte das células tumorais, de padrão difuso;
- D) GSMa gla adj; imunomarcção moderada de ductos intercalares.

Figura 12 - Imunomarcção caspase 8, outras neoplasias das glândulas salivares.



Legenda:

- A) Ca células acinares; negativa para a proteína;
- B) Ca mucoepidermoide; negatividade para a proteína, com imunomarcacão inespecífica em estroma;
- C) CAC; imunomarcacão forte em formações cribiformes;
- D) Ca adenoide gla adj; imunomarcacão moderada em ductos e semi-luas serosas;
- E) ACPBG; imunomarcacão forte e difusa;
- F) ACPBG gla adj, imunomarcacão moderada em ductos.
- G) Ca ducto salivar; imunomarcacão negativa;
- H) Tumor de Warthin; imunomarcacão negativa, com positividade focal em estroma;
- I) Adenoma de células basais; imunomarcacão negativa, com positividade focal em estroma;
- J) Adenoma células basais gla adj, imunomarcacão forte em ductos.

Resultado Trx

Na análise da imunomarcagem para a Trx, observou-se uma semelhança no padrão de marcação citoplasmático e nuclear, tanto em relação à extensão da área marcada, quanto em relação à intensidade.

Dos 10 casos de GN, apenas um apresentou-se positivo para a proteína (figura 2H). Quando analisadas as estruturas separadamente, observamos que todos os casos apresentaram as estruturas acinares negativas, enquanto 4 casos apresentaram marcação ductal.

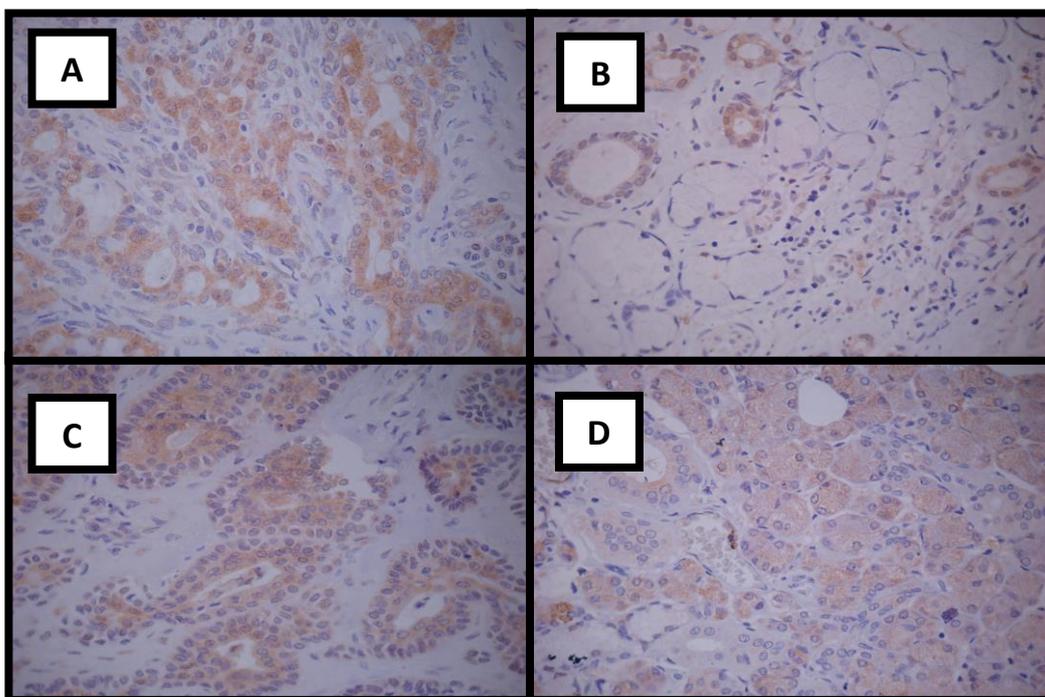
Quando avaliados os AP das GSMa, encontramos 5 casos positivos e 7 negativos. As glândulas adjacentes a esses tumores exibiram positividade em 3 casos e negatividade em 8. Dos AP de GSMe, um não foi submetido à técnica de imunistoquímica em função da insuficiência de material para análise. Dentre os demais casos, 16 apresentaram-se positivos para a proteína. Nove tumores ainda apresentavam glândulas adjacentes com material suficiente para análise. Dessa forma, foi observado apenas 1 caso positivo e 8 negativos (figura 13).

O teste exato de Fisher mostrou uma associação entre a GN e os AP juntos ($p=0,032$) e GN e AP GSMe ($p=0,026$), mas que não se manteve na análise entre GN e GSMa ($p=0,162$). A associação também não foi encontrada entre GN e GSMa gla adj ($p=0,586$), nem entre GN e GSMe gla adj ($p=1,0$). O teste de McNemar não mostrou associação entre a GN e GSMa gla adj ($p=0,5$), nem entre GN e GSMe gla adj ($p=0,937$).

Quando avaliado, pelo teste de Chi-quadrado de Pearson, não foi observada associação entre as proteínas Trx e caspase 3 clivada nos AP GSMa ($p=1,0$) e a correlação, embora negativa, mostrou-se fraca ($-0,255$). O mesmo resultado foi encontrado na análise entre Trx e caspase 3 clivada nos AP GSMe ($p=0,385$) e uma correlação negativa, embora fraca ($-0,198$). Na análise em conjunto dos AP, o resultado se manteve ($p=0,407$) e a correlação também: negativa e fraca ($-0,189$).

Das outras neoplasias avaliadas (figura 14), o carcinoma de células acinares, o carcinoma mucoepidermoide e o adenoma de células basais mostraram-se negativas enquanto o tumor de Warthin, o carcinoma do ducto salivar e o carcinoma adenoide cístico mostraram-se positivas para o Trx. Apenas o tumor de Warthin apresentou a glândula adjacente positiva para o Trx. Dos ACPBG, 2 casos exibiram positividade e 4 negatividade para o Trx. Das glândulas adjacentes a esse tumor, apenas uma mostrou-se positiva. Esses casos foram submetidos somente à análise descritiva.

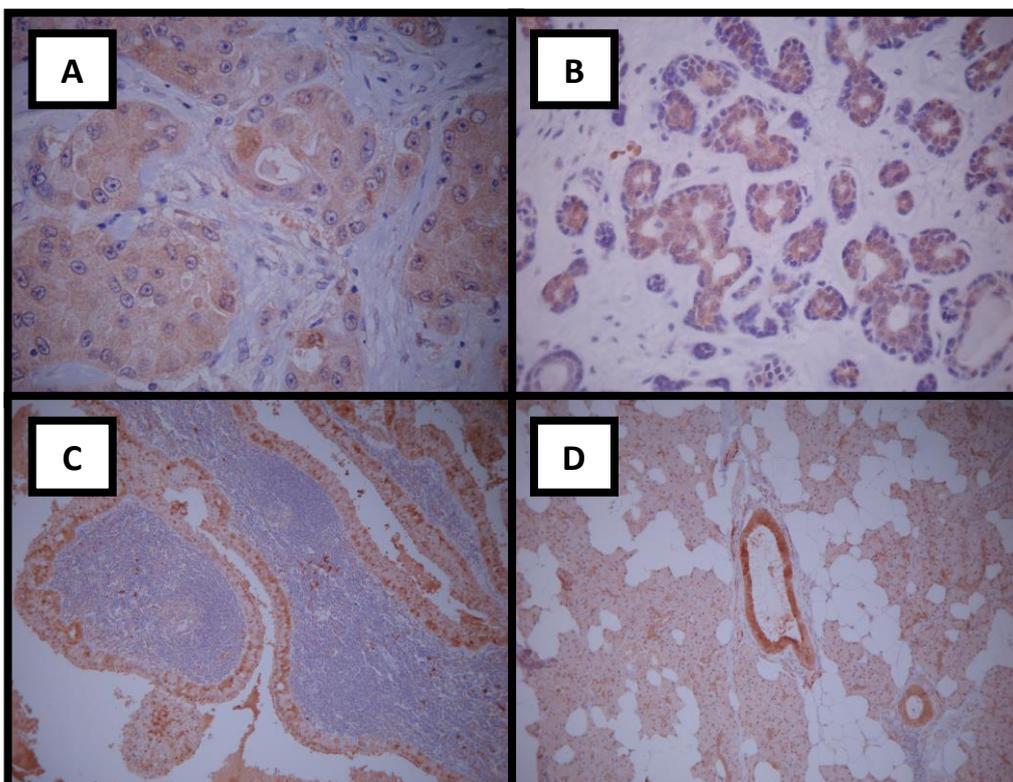
Figura 13 - Imunoistoquímica Trx, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção forte, principalmente em áreas de formações ductais;
- B) GSMe gla adj; imunomarcção moderada restrita às células ductais lumiais;
- C) AP GSMa; imunomarcção forte em áreas de formação ductal;
- D) GSMa gla adj; imunomarcção moderada de ductos e ácinos.

Figura 14 - Imunomarcção Trx, outras neoplasias das glândulas salivares.



Legenda:

- A) Ca ducto salivar, imunomarcção forte e difusa das células tumorais;
- B) CAC, imunomarcção forte das formações císticas;
- C) Tumor de Warthin, imunomarcção forte do component epithelial;
- D) Tumor de Warthin gla adj, imunomarcção de ácinos e ductos.

Resultado survivina

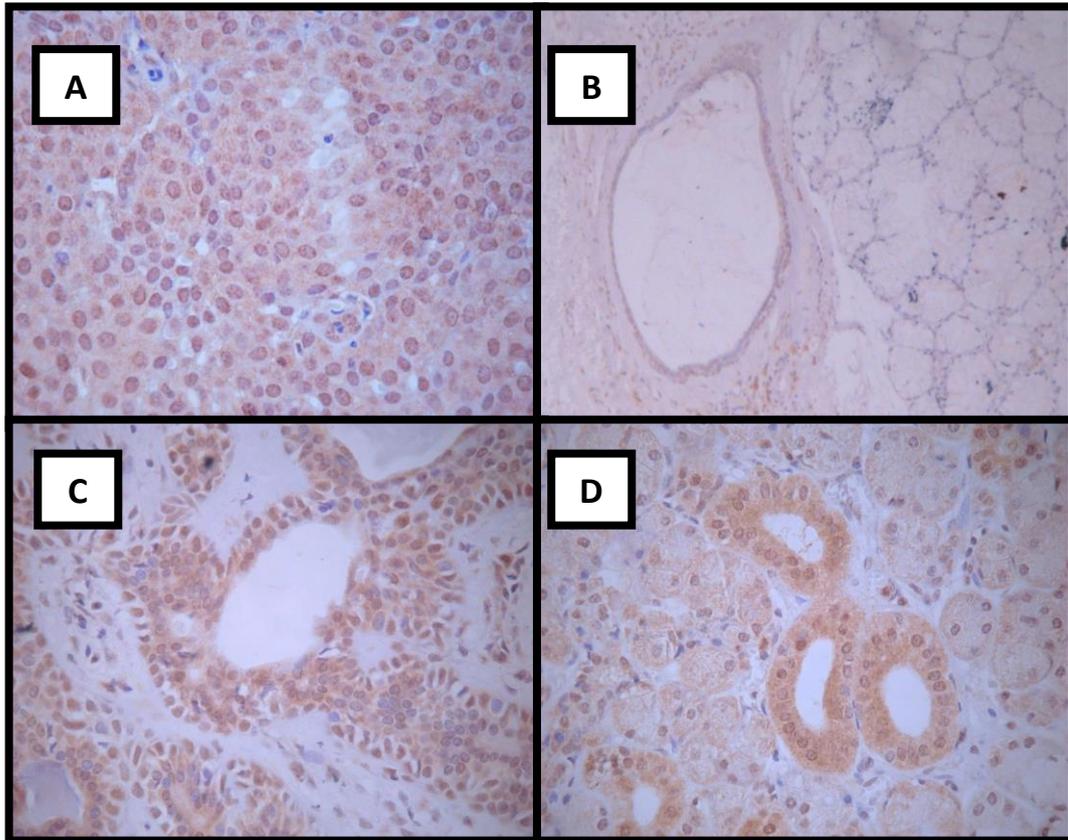
Na avaliação das GN foram encontrados 4 casos positivos para a survivina. Quando analisadas as estruturas separadamente, observamos todos os casos com negatividade para os ácinos e 4 casos com positividade para os ductos.

Dentre os AP GSMe, os 31 casos foram submetidos à análise imunoistoquímica e, destes, 18 (58%) apresentaram positividade para a survivina. Das glândulas salivares adjacentes a esses tumores, apenas 3 (30%) foram positivas. Dos AP GSMa, 7 (58,3%) dos 12 casos avaliados mostraram-se positivos. Das glândulas adjacentes, apenas 10 foram mantidas para análise e, destas, 6 mostraram-se positivas (figura15).

O teste de Pearson não encontrou associação estatística entre a GN e a totalidade de AP ($p=0,196$). O teste de Fisher não apresentou associação estatística entre GN e GSMe ($p=0,298$), nem com GN e GSMa ($p=0,292$). Também não foi observada associação estatística entre GN e GSMe gla adj ($p=1,0$). Não foi realizada análise estatística entre GN e GSMa gla adj, em função da divisão dos casos ser uma constante. Quando realizada a análise estatística para verificação de associação estatística entre as proteínas caspase 3 clivada e survivina, não foi encontrada associação entre as mesmas para os AP avaliados como um todo ($p=0,677$), ou para AP GSMe ($p=0,673$), com correlação positiva e fraca (0,101), ou para AP GSMa ($p=1,0$) e uma correlação positiva e fraca (0,255). O teste de McNemar para análise dos tumores e suas glândulas adjacentes não mostrou associação entre AP GSMe e GSMe gla adj ($p=0,25$), nem entre AP GSMa e GSMa gla adj ($1,0$).

Dentre os demais tumores que exibiram positividade, encontram-se o adenoma de células basais, o carcinoma adenoide cístico, o carcinoma de células acinares e o carcinoma do ducto salivar. Desses, o único que apresentou positividade também na glândula adjacente foi o adenoma de células basais. O carcinoma mucoepidermóide e o tumor de Warthin se mostraram negativos, bem como suas glândulas adjacentes. Dos ACPBG, apenas 1 mostrou-se positivo, bem como sua glândula adjacente (figura 16).

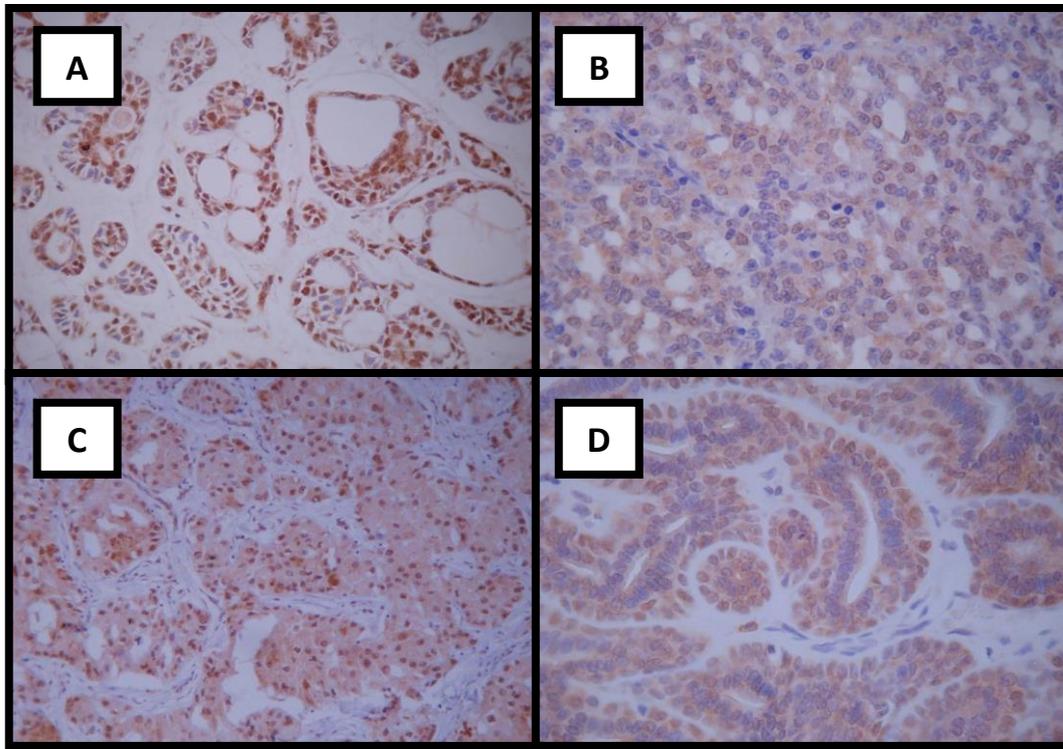
Figura 15 - Imunoistoquímica survivina, adenomas pleomórficos e glândulas salivares



Legenda:

- A) AP GSMe; imunomarcção moderada, de padrão difuso.
- B) GSMe gla adj; imunomarcção fraca em ductos.
- C) AP GSMa, imunomarcção forte em áreas ductais;
- D) GSMa gla adj; imunomarcção em ductos e ácinos.

Figura 16 - Imunoistoquímica survivina, outras neoplasias de glândulas salivares



Legenda:

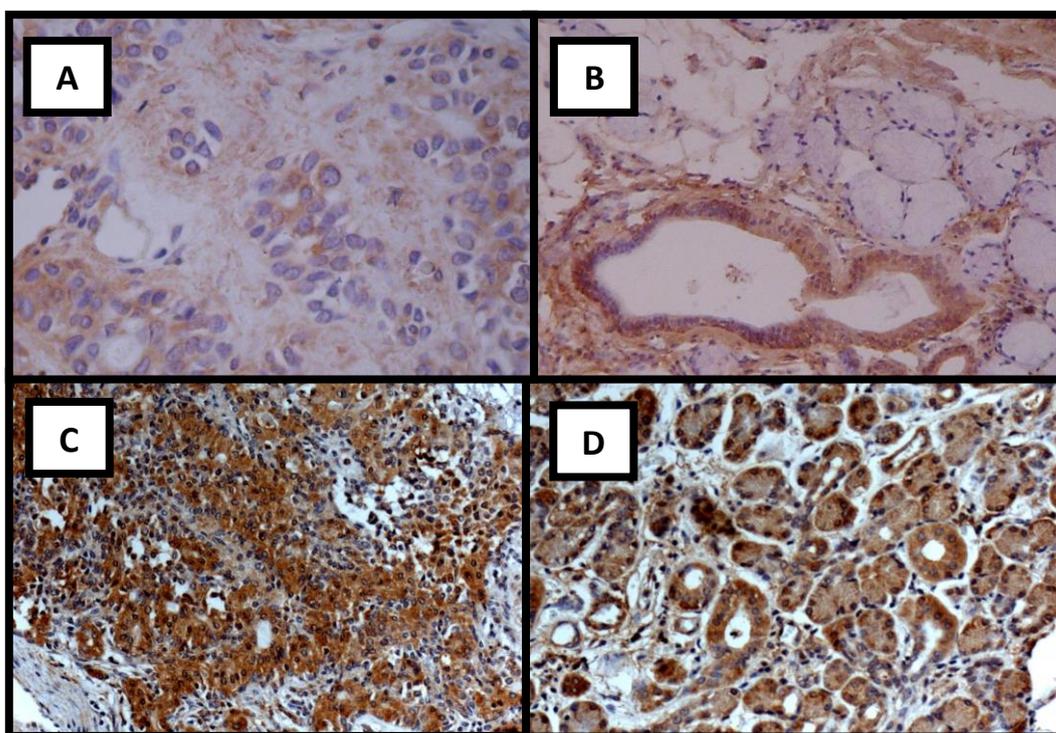
- A) CAC, imunomarcção forte em áreas císticas;
- B) carcinoma de células acinares, imunomarcção moderada e difusa das células tumorais;
- C) Carcinoma do ducto salivar, imunomarcção forte e difusa das células tumorais;
- D) Adenoma de células basais, imunomarcção forte e difusa das células tumorais

Resultado Nfk β -p65

A análise do Nf-k β -65 apresentou 100% das GN negativas, não sendo observada marcação nuclear nem em ácinos, nem em ductos (figura 2e).

A imunomarcção nuclear para o Nfk β -p65 dos demais casos da amostra também apresentaram uma ausência de marcação nuclear. Dessa forma, não foi feita análise estatística da mesma (figuras 17 e 18).

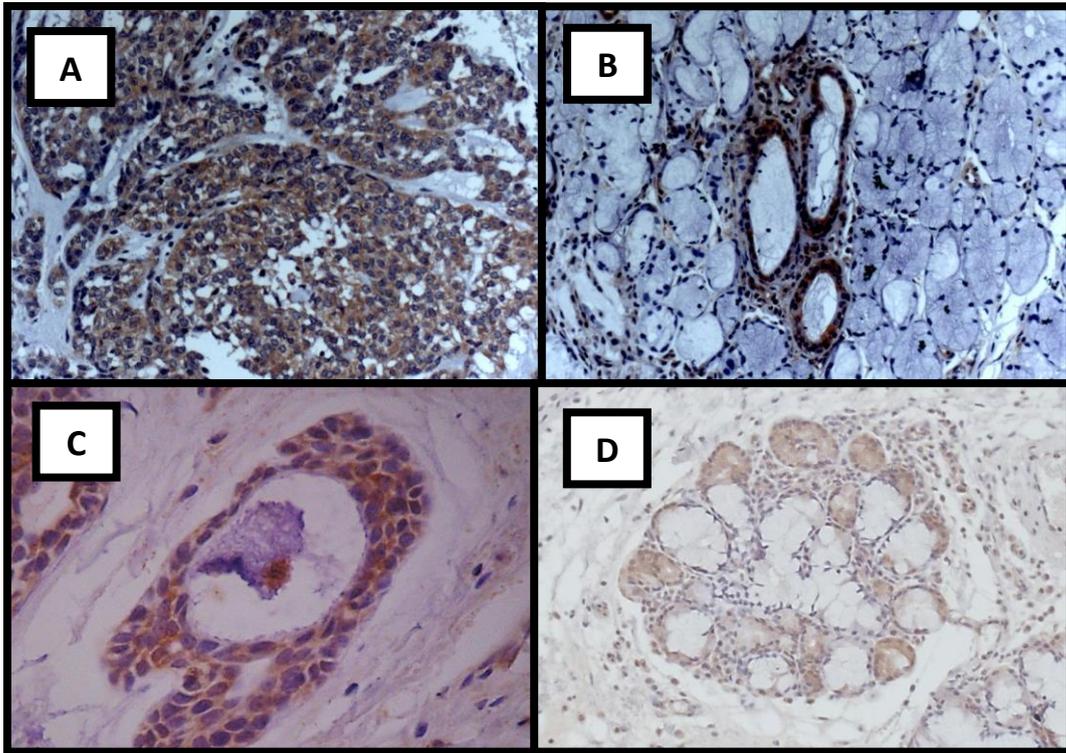
Figura 17 – Imunoistoquímica Nf-k β p65, adenomas pleomórficos e glândulas salivares adjacentes à lesão



Legenda:

- A) AP GSMe, imunomarcção nuclear ausente,
- B) GSMe gla adj, imunomarcção nuclear ausente,;
- C) AP GSMa; imunomarcção nuclear ausente,;
- D) GSMa gla adj; imunomarcção nuclear ausente,.

Figura 18 – Imunoistoquímica Nf-k β p65, outras neoplasias de glândulas salivares



Legenda:

- A) ACPBG, imunomarcção nuclear ausente,
- B) ACPBG gla adj, imunomarcção nuclear ausente,;
- C) CAC; imunomarcção nuclear ausente,;
- D) CAC gla adj; imunomarcção nuclear ausente,.

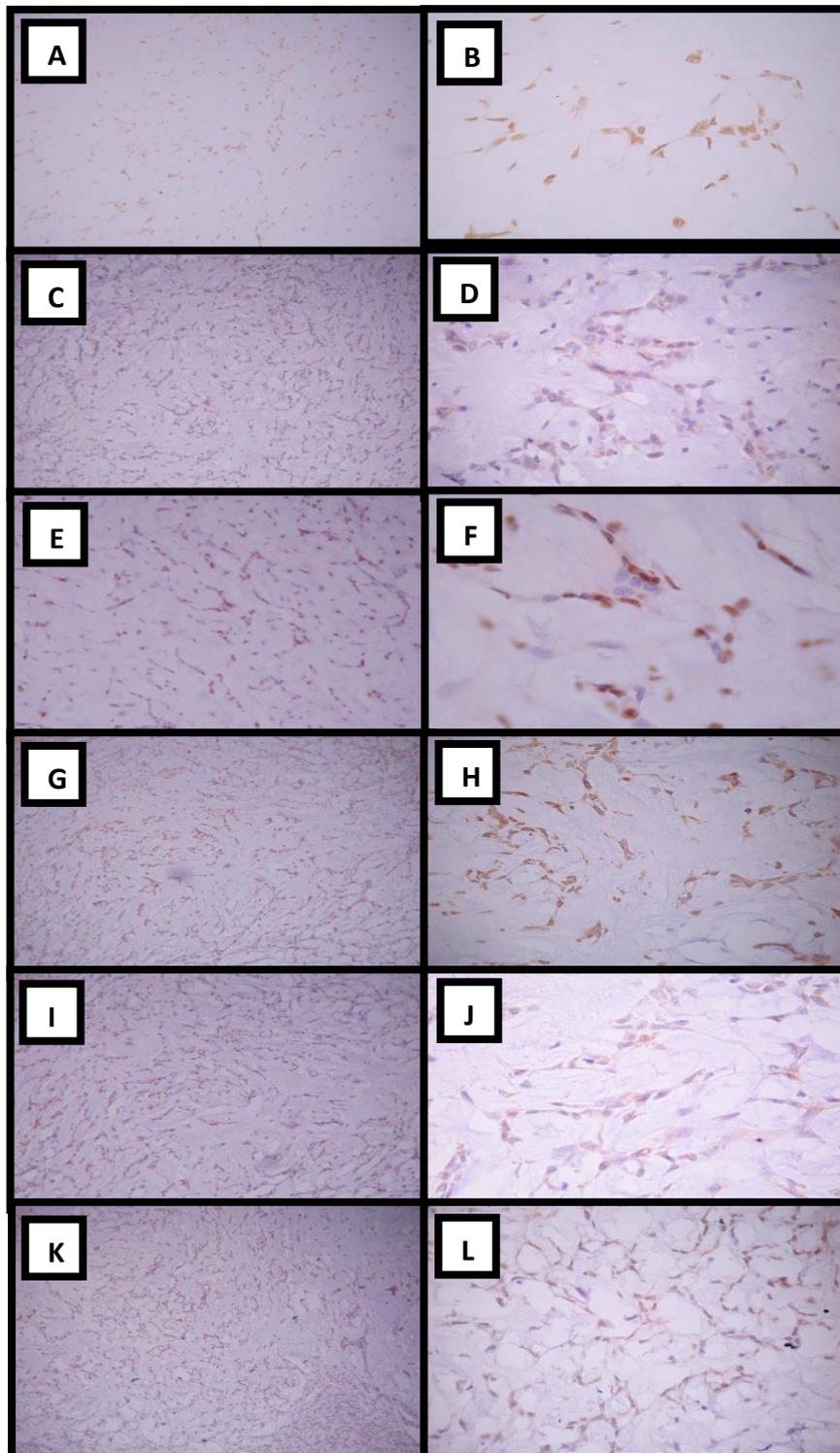
Resultado TUNEL

Na análise da glândula normal não associada ao tumor, submetida à técnica do TUNEL, foi possível observar negatividade para os ácinos e positividade esporádica nas células ductais. Já nos AP, o que se pode observar foi que casos que se apresentavam mais celularizados não exibiram marcação, enquanto o tipo mixoide apresentou marcação positiva na área mais frouxa e também em áreas de transição entre áreas mixoides e celularizadas, sendo, nessa região, observada ainda a marcação de ductos. Embora tenha sido possível observar a marcação em áreas mixoides, o mesmo padrão não foi observado em áreas de estroma condroide.

A figura 19 mostra a mesma área de estroma frouxo com a marcação para o TUNEL, caspase 3 clivada, survivina, bax, bcl-2 e Trx. Foi possível observar que esse caso de estroma mais frouxo apresentou forte marcação para o TUNEL e imunomarcação intensa para as proteínas pró-apoptóticas, mas também para as antiapoptóticas e para a proteção e sobrevivência celular, como a Trx.

A figura 20 mostra a mesma área de marcação de um caso classificado como tipo III / IV, para o TUNEL, caspase 3 clivada, survivina, bax, bcl-2 e Trx. Nessas imagens, podemos observar uma marcação mais discreta do que a observada na figura 19, tanto para o TUNEL, quanto para as proteínas avaliadas.

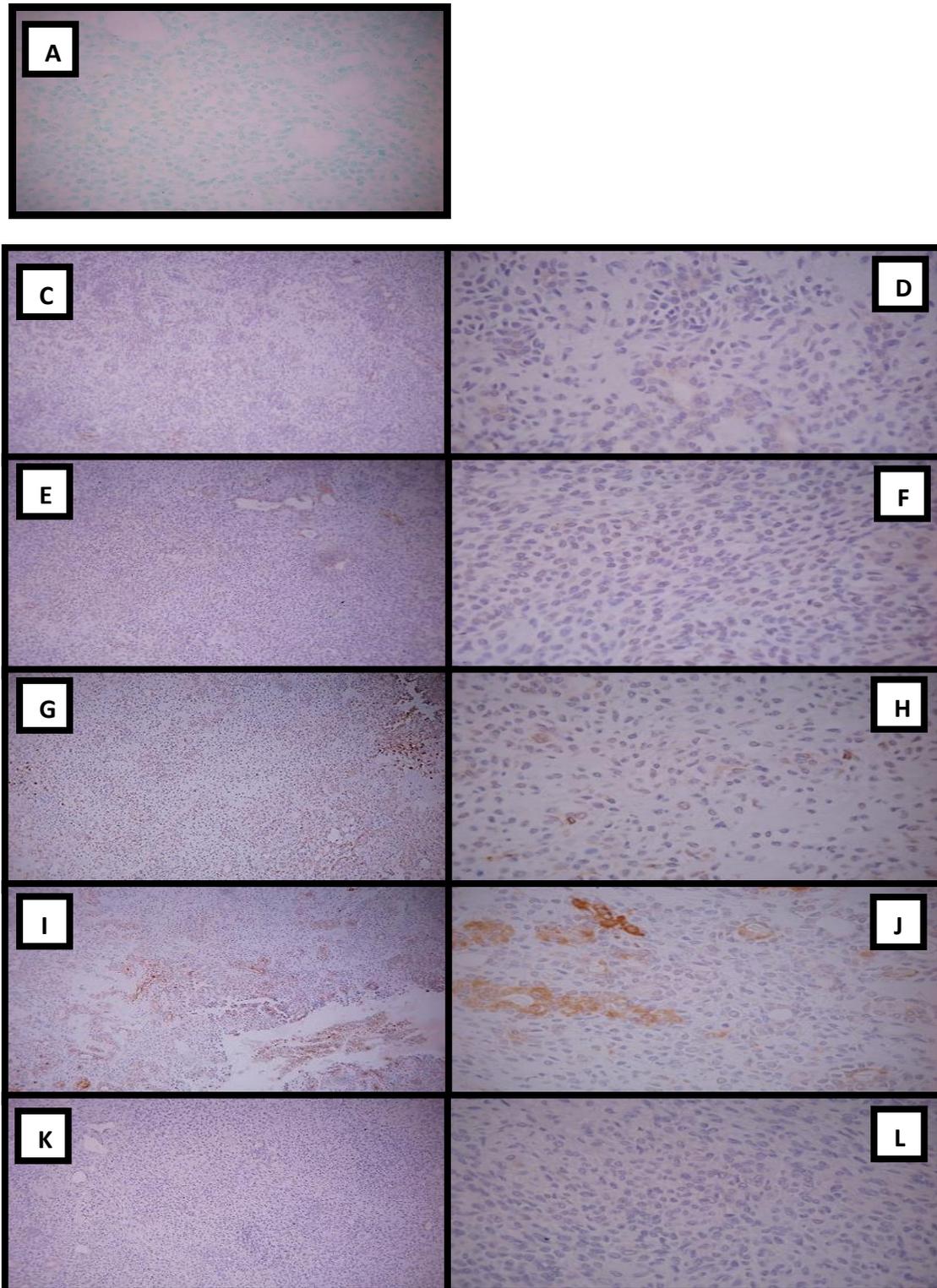
Figura 19 – Imunomarcação da área mixóide de Adenoma Pleomórfico pelas proteínas caspase 3 clivada, survivina, bax, bcl-2 e Trx em comparação à marcação pelo TUNEL.



Legenda:

- A) TUNEL, 100X, marcação área mixoide.
- B) TUNEL, 400X, marcação área mixoide.
- C) Caspase 3 clivada, 100X, marcação área mixoide.
- D) Caspase 3 clivada, 400X, marcação fraca área mixóide, embora a lâmina seja positiva.
- E) Survivina, 100X, marcação área mixoide.
- F) Survivina, 400X, marcação área forte mixoide e lâmina positiva.
- G) Bcl-2, 100X, marcação área mixoide.
- H) Bcl-2, 400X, marcação forte área mixoide e lâmina positiva.
- I) Bax, 100X, marcação área mixoide.
- J) Bax, 400X, marcação fraca área mixóide, embora a lâmina seja positiva.
- K) Trx, 100X, marcação área mixoide.
- L) Trx, 400X, marcação moderada área mixóide, embora a lâmina seja negativa.

Figura 20 – Imunomarcação de área celularizada de Adenoma Pleomórfico pelas proteínas caspase 3 clivada, survivina, bax, bcl-2 e Trx em comparação à marcação pelo TUNEL.



Legenda:

- A) TUNEL, 400X, ausência de marcação área celularizada.
- C) Caspase 3 clivada, 100X, ausência de marcação área celularizada.
- D) Caspase 3 clivada, 400X, marcação fraca área mixóide e lâmina negativa.
- E) Survivina, 100X, marcação área celularizada.
- F) Survivina, 400X, ausência de marcação área celularizada, embora a lâmina seja positiva.
- G) Bcl-2100X, ausência marcação área celularizada.
- H) Bcl-2, 400X, ausência marcação área celularizada, embora a lâmina seja positiva.
- I) Bax, 100X, marcação área celularizada.
- J) Bax, 400X, marcação forte e focal área celularizada, embora a lâmina seja negativa.
- K) Trx, 100X, marcação área frouxa.
- L) Trx, 400X, ausência marcação área celularizada e lâmina negativa.

Discussão

Na literatura são encontrados diversos trabalhos que se propõem a estudar as neoplasias das glândulas salivares (Cheuk e Chan, 2007; Speight, 2007), no entanto, poucos são os que investigam sua relação com a apoptose e, quando o fazem, direcionam o estudo à avaliação da expressão de proteínas isoladas (Yin et al., 2000; Norberg-Spaak et al., 2000). No presente trabalho realizamos uma descrição da expressão das proteínas relacionadas à apoptose em diferentes neoplasias. Além disso, comparamos esses resultados com o parênquima normal associado e não associado aos tumores.

Os resultados do nosso estudo descrevem o padrão de expressão das principais proteínas associadas à apoptose nas neoplasias de glândulas salivares. Embora, muitas vezes, não tenha sido encontrada associação entre essas proteínas e características clinicopatológicas ou entre os diferentes grupos de neoplasias, os padrões de imunexpressão observados sugerem uma inibição da apoptose nas neoplasias, diante da maior expressão de proteínas antiapoptóticas.

Na amostra de AP do presente estudo, a distribuição dos casos entre homens e mulheres apresentou-se semelhante ao encontrado nos trabalhos de Alves et al. (2002), Dhanuthai et al. (2009) e Oliveira et al. (2009): com predileção pelo gênero feminino. Já na análise relacionada à faixa etária, o presente trabalho encontrou maior número de pacientes distribuídos entre 1ª e 3ª décadas, mesma faixa etária mais acometida no estudo realizado por Dhanuthai et al. (2009), que avaliou a prevalência de neoplasias de glândulas salivares de um arquivo do departamento de Odontologia de uma universidade da Tailândia. Ambos os trabalhos avaliaram casos de arquivos, independentemente da localização das lesões. Os resultados encontrados por Alves et al. (2002) englobam praticamente os grupos 1 e 2 da estratificação da idade realizada em nosso estudo. O trabalho realizado por de Oliveira et al. (2009) encontrou uma maior prevalência de AP na 4ª década. Pequenas diferenças quanto à faixa etária entre os trabalhos são esperadas e se dão em função destes estudos trabalharem com amostras de conveniência e, não, com dados populacionais.

Ao se avaliar a literatura que investiga o tamanho das lesões, encontramos um ponto de corte de 3,5 cm que classifica as lesões em grandes ou pequenas (Alves et al., 2002). Utilizando este valor, tivemos a maior parte dos casos abaixo do ponto de corte, sem associação estatística entre tamanho das lesões e a imunexpressão das proteínas avaliadas. No entanto as correlações, exceto do Trx, mostraram-se moderadas, sendo as proteínas pró-apoptóticas de correlação positiva e as antiapoptóticas negativas. Num primeiro momento, esse resultado é contraditório se pensarmos que as lesões maiores estão exibindo maior taxa apoptótica. Todavia acreditamos que esse ponto possa ser analisado de outra forma se considerarmos que as lesões maiores foram justamente as menos celularizadas e com maior área de estroma. Sendo assim, aparentemente, o tamanho da lesão se dá não pela quantidade de células (o que poderia representar uma maior atividade proliferativa), mas, sim, pela quantidade de estroma e pela perda da adesividade intercelular, permitindo maior expansão da lesão. Dessa forma, os AP dos tipos III e IV tendem a ser menores do que os tipos I e II, tanto que o único caso do tipo III apresentou diâmetro menor que o ponto de corte. Resultado semelhante foi encontrado por Alves et al. (2002), que encontraram em seu trabalho 70% dos AP avaliados como tipo I maiores que 3,5 cm e 64% dos AP tipo 3 menores que 3,5 cm. Portanto, a lesão maior não necessariamente se mostra a mais agressiva.

A família BCL-2 constitui um grupo de proteínas relacionadas tanto com a sobrevivência quanto com a morte celular. A proteína bax pertence a essa família e apresenta uma ação pró-apoptótica (Hasnan et al., 2010). A análise da bax (figura 3) mostrou poucos casos de tumores positivos para a proteína, tanto entre as neoplasias benignas quanto malignas. No entanto, quando os grupos são avaliados separadamente, encontramos uma grande quantidade de casos positivos entre os AP GSMa, bem como em suas glândulas salivares adjacentes ao tumor. Essa diferença de resultados se mostra evidente na análise estatística significativa quando avaliados os grupos GN e AP GSMa e entre GN e GSMa gla adj. É difícil imaginar o porquê dos dois grupos de glândulas adjacentes aos tumores terem resultados estatisticamente

significativos, uma vez que não foi encontrada diferença entre GN e GSMe gl adj. Morfologicamente, o que marca a diferença entre esses dois tipos de glândulas salivares (menor e maior) é a presença de ácinos serosos. No nosso trabalho, 7 dos 11 casos de glândulas adjacentes com ácinos serosos exibiram positividade para bax na região acinar. Talvez, a hipótese de Dardick et al. (1990) esteja correta quando sugere que os ácinos, embora não pareçam ser o principal agente da patogênese das neoplasias das glândulas salivares, possam, sim, de certa forma, contribuir para o seu desenvolvimento. Redman (2008), em seu trabalho, também sugere que em determinados momentos as células acinares possam se apresentar como progenitoras de outras células, incluindo uma célula semelhante à ductal. No entanto, ainda que tenhamos encontrado essa associação, a bax não foi a proteína que apresentou maior expressão dentre as avaliadas.

O estudo de Takahashi et al. (2008), avaliando a glândula submandibular de ratos, encontrou uma ausência total da imunexpressão de bax nas glândulas salivares normais, sendo que a expressão da mesma só foi observada à medida que a glândula ia se tornando atrofica em função de ligadura do ducto. Os resultados desse trabalho, assim como os nossos, sugerem uma baixa atividade apoptótica na glândula normal, embora esse processo possa ser aumentado ou diminuído de acordo com o acometimento da função glandular.

A proteína bcl-2, também membro da família BCL-2, com ação antiapoptótica (Takahashi et al., 2008), no presente estudo, exibiu uma grande expressão entre os AP, no adenoma de células basais e também entre o grupo de neoplasias malignas. Já as glândulas normais e glândulas adjacentes aos tumores apresentaram um maior número de casos negativos do que positivos para bcl-2. A associação entre os AP totais e GN mostram que realmente há uma diferença na taxa apoptótica entre os dois grupos e que a mesma se encontra diminuída nos tumores avaliados. Mesmo sendo AP de localizações diferentes, talvez, a tendência à associação no grupo AP GSMe possa se mostrar positiva no caso do aumento da amostra. Embora os AP dos dois grupos sejam de localizações diferentes, eles se apresentam clinicamente de

forma semelhante, de crescimento lento, o que nos faz pensar que, em ambos os grupos, esse crescimento se dê da mesma forma e, pelos resultados encontrados, o mesmo parece ser por diminuição da taxa apoptótica, além de uma baixa taxa proliferativa. Tadbir et al. (2012) encontraram uma baixa expressão imunoistoquímica de CD 105 e Ki-67 em amostras de AP, sendo a expressão dessas proteínas um pouco mais alta nas neoplasias de glândulas salivares malignas.

Outros autores, como Carlinfante et al. (2005), analisando o carcinoma adenoide cístico, encontraram, pela imunoistoquímica, uma alta taxa na imunoexpressão de (19/21) bcl-2 e apenas 9 dos 21 casos avaliados apresentaram positividade para o Ki-67. Resultado semelhante foi obtido por da Cruz Perez et al. (2004) que encontraram, através da imunoistoquímica, 87,5% de casos positivos para bcl-2, enquanto que toda a amostra foi negativa para o Ki-67. Essa baixa atividade proliferativa também foi demonstrada por Aoki et al. (2004), que observaram uma imunoexpressão esporádica do Ki-67 nos AP. Além dos trabalhos de imunoistoquímica, o estudo realizado com micro arranjo (Patel et al., 2006) descreveu a superexpressão do gene *BCL-2* em carcinoma adenoide cístico, não encontrando a mesma superexpressão na glândula parótida normal.

Já a diferença de resultados estatísticos entre GN e GSMa gla adj e GSMe gla adj pode ser interpretada pela formação morfológica dos dois tipos de glândulas salivares encontradas nos dois casos. Enquanto as glândulas salivares menores são formadas basicamente por ácinos mucosos, as glândulas salivares maiores apresentam uma predominância de ácinos serosos (Junqueira e Carneiro, 2004). É possível que os ácinos serosos apresentem uma imunomarcção cruzada com diversas proteínas, uma vez que seu conteúdo celular é composto de água, íons e proteínas (enzimas) além de um componente glicoproteico. Por sua vez, as células mucosas possuem escasso conteúdo enzimático e as poucas cadeias enzimáticas estão ligadas a cadeias de carboidratos, formando o muco (Katchburian e Arana, 1999). Essa diferença ultraestrutural pode vir a justificar a diferença na imunomarcção, não podendo, no entanto, deixar de considerar que realmente uma maior expressão da Bcl-2

nas GSMa gla adj, corroborando a hipótese de uma participação maior das células acinares na gênese tumoral, conforme discutido anteriormente (Dardick et al., 1990; Redman, 2008).

Na análise da caspase 8, encontramos positividade em aproximadamente 90% dos AP e 40% das neoplasias malignas. Dentre as glândulas salivares normais, apenas 2 casos apresentaram-se positivos e, nas glândulas adjacentes aos AP, menos de 40% apresentou-se positiva. Essa baixa marcação na glândula normal é um achado bem interessante, uma vez que a anti-caspase 8 disponível e utilizada é um anticorpo para pró-caspase, ou seja, apresenta uma imunomarcação positiva tanto da proteína não clivada, de constituição normal da célula, quanto da forma já ativada da mesma. Sendo assim, era esperada uma proporção maior de casos positivos, principalmente entre as glândulas normais e adjacentes aos tumores. Talvez, esse grande número de casos negativos das glândulas normais signifique uma baixa produção de pró-caspase 8 pelas células de glândulas salivares quando comparadas às células de outros tecidos, um indicativo, talvez, da baixa atividade apoptótica nestes tecidos.

Embora a taxa absoluta da marcação para caspase 8 não tenha se mostrado alta, foi observada uma diferença estatisticamente significativa na expressão dessa caspase entre as GN e os AP GSMa e GSMe, devido ao aumento da expressão da proteína no tumor, em relação à GN. Uma vez que a pró-caspase é de constituição normal da célula, esse aumento proteico tumoral sugere que, embora a caspase 8 não pareça ser a principal proteína envolvida na atividade apoptóticas desses tumores, ela pode ter, sim, alguma participação nesse processo. O estudo de Takahashi et al. (2007) evidencia a ação da caspase 8 no desenvolvimento da apoptose no tecido glandular. Os autores usaram caspase 8 clivada em seu trabalho e encontraram uma imunopositividade crescente para essa proteína nas glândulas salivares de ratos que sofreram ligadura dos ductos. Após a ligadura, à medida que o tempo ia passando, os autores observaram um aumento crescente na expressão da proteína, inclusive em ácinos, porém a expressão da mesma não foi observada em glândulas normais. No entanto, após o dia 3, observou-se um declínio na

positividade e, no 14^o dia, poucas células das glândulas do grupo caso ainda apresentavam positividade para a caspase 8 clivada, sugerindo uma diminuição seguida de estabilização do processo. O fato de os autores não terem encontrado caspase 8 ativa em glândulas normais corrobora a nossa hipótese de que a caspase 8 inativa não é uma proteína tão frequente nas glândulas normais como em outros tecidos e que talvez a via das caspases, apesar de parecer ser ativada, não seja uma via rotineiramente requisitada no metabolismo das glândulas salivares normais.

No presente trabalho, encontramos uma grande diferença entre as imunoexpressões da caspase 3 clivada e não clivada. Mesmo que não tenhamos encontrado associação estatística na análise da caspase 3 não clivada, a expressiva diminuição da imunomarcação entre os grupos de casos avaliados fortalece a hipótese de que a caspase 3 não clivada, embora seja de produção normal nos tecidos corporais, não é amplamente produzida nas glândulas salivares. Ainda que esteja presente nas estruturas glandulares e possa participar do processo apoptótico, essa proteína não parece ser a mais importante no desencadeamento da morte celular programada.

Os tumores que compõem este estudo, embora sejam de naturezas diferentes, apresentam todos um mesmo padrão de crescimento lento, mesmo aqueles malignos. Esse crescimento lento, porém invasivo, sugere uma ideia de que o aumento da lesão não se dê por uma alta taxa proliferativa, conforme observada em outros tipos de neoplasias, como o carcinoma de células escamosas (Dragomir et al., 2012). Dessa forma, mesmo que a caspase 3, assim como caspase 8, possa se expressar em algumas células que estejam em apoptose, essa proteína não parece ser a mais expressiva nessas neoplasias.

Takahashi et al. (2007) também avaliaram a imunoexpressão da caspase 3 (clivada) no processo de apoptose das glândulas salivares de ratos e encontraram casos positivos no 3^o dia de ligadura. Já nas glândulas normais (controle) e nos casos de 1 dia de ligadura não foram observados casos de positividade. Esse resultado corrobora a proposta já exposta de que as

caspases, embora possam participar do processo de apoptose nas glândulas salivares, mostram-se funcionais em momentos específicos, não sendo a ativação frequente nas glândulas salivares normais ou em neoplasias das mesmas.

Em nosso trabalho avaliamos, para o Trx, conjuntamente a imunomarcção do núcleo e do citoplasma. A maior parte dos casos apresentou a área de marcação e intensidade semelhantes para as duas regiões. Além disso, ainda que a proteína tenha ações diferentes nos dois locais, sendo antioxidante e cofator de redução no citoplasma e como regulador de fatores de transcrição no núcleo (Nagano et al., 2012), ambas as ações se relacionam com o controle da apoptose.

A Trx apresentou diferentes expressões entre GN e o conjunto de AP (Me e Ma) e AP GSMe. Talvez a ausência de diferença entre as GN e AP GSMe seja pelo tamanho da amostra e não pela falta de relação entre os dois grupos. A associação estatística encontrada entre GN e total de AP e AP GSMe nos sugere que a Trx esteja relacionada ao controle negativo do processo apoptótico no tumores, uma vez que sua imunoexpressão mostrou-se maior entre os AP do que entre as GN. Dessa forma, esse resultado nos permite pensar que a proteína Trx atua na proteção antiapoptótica das células tumorais, mantendo-as viáveis.

Alguns trabalhos como Zhang et al. (2011) e Kurimoto et al. (2007) sugerem uma relação da Trx com disfunções mitocondriais em células tumorais. Embora a caspase 3 se relacione com o processo apoptótico via mitocôndria, não encontramos associação entre essa caspase e a proteína Trx. Os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que a caspase 3 não é a principal via relacionada ao desenvolvimento tumoral e que a Trx exerce, sim, um fator de proteção à sobrevivência das células tumorais. A falta de associação entre essas duas proteínas talvez se dê pela pouca relação da caspase 3 com o desenvolvimento dos AP e, talvez, a via de atuação da Trx não se relacione às caspases mas, sim, a outro grupo de proteínas não abordado em nosso trabalho.

A survivina, aparentemente frequente nos tecidos normais em desenvolvimento, parece ser encontrada de forma limitada nos tecidos adultos como endométrio, timo e placenta e parece ser ausentes em rins, pulmões, coração e cérebro. Em outras regiões como tireóide, ovário e tonsila ainda pouco se sabe sobre sua expressão (Spaulding et al., 2010). No nosso trabalho encontramos cerca de 40% das GN positivas para a survivina. Agrupando as glândulas adjacentes e as normais, observamos positividade em quase metade dos casos. De acordo com esse resultado, as glândulas salivares entrariam para o grupo dos tecidos adultos normais que expressa essa proteína de forma limitada. No entanto, mais estudos são necessários para se conhecer o real papel e expressão da survivina nesse tecido.

Embora nosso estudo não tenha encontrado associação entre a survivina e a caspase 3, outros estudos já encontraram. Essa relação entre expressão de survivina e caspase 3 já foi observada em outras neoplasias, como no carcinoma de células escamosas. Li et al. (2012), pelo método de ELISA, observaram um aumento da expressão de survivina na neoplasia em relação ao tecido normal, uma baixa expressão de pró-caspase 3 no tumor e uma ausência de caspase 3 no carcinoma.

A presença do Nf- κ B p65 citoplasmático foi percebida em inúmeros casos avaliados na nossa amostra, evidenciando a presença da forma inativa da proteína em 72% dos casos de AP e 70% das glândulas normais. No entanto, todos os casos de todos os grupos apresentaram uma ausência de marcação nuclear, sugerindo uma não participação do Nf- κ B p65 como fator de transcrição na progressão das neoplasias de glândulas salivares.

No trabalho de Zhang et al. (2005), os autores avaliaram a expressão de Nf- κ B-p65 em carcinoma adenoide cístico e encontraram uma grande expressão da proteína no citoplasma de numerosas células tumorais, no entanto a marcação nuclear foi observada em poucos casos. Ainda assim, os autores encontraram uma associação entre a proteína e a microdensidade vascular e agressividade das lesões. Assim como no nosso trabalho, Zhang et al. (2005) também não encontraram marcação nuclear nas glândulas normais.

Embora a participação do Nf- κ B-p65 já tenha sido descrita em outros processos patológicos como a resposta inflamatória (Tokunaga e Iwai, 2012), essa proteína não parece estar relacionada de forma efetiva com desenvolvimento de neoplasias glandulares.

A técnica do TUNEL, embora aparentemente fácil, é um processo associado a numerosas falhas de execução, desde o processamento e fixação do material, até digestão excessiva pela proteinase (Duan et al., 2003). No trabalho realizado por Frankfurt e Krishan (2001), os autores avaliaram a marcação do TUNEL em tecido apoptótico e tecido necrótico e observaram que células em estágios iniciais de apoptose apresentaram uma marcação fraca comparada com células em estágio apoptótico mais avançado. Outro achado interessante obtido pelos autores foi uma marcação intensa das células necróticas (cerca de 90% das células), similar à observada em células em estágio final de apoptose.

Em função da dificuldade de execução técnica e da possibilidade de falsos positivos, alguns autores propõem alternativas à investigação das células em apoptose. Duan et al. (2003) e Resendes et al. (2004) concluíram em seus estudos que a imunomarcação pela caspase 3 clivada é um bom marcador para células apoptóticas, mais específica que a técnica do TUNEL, e sensível a células em estágio inicial de apoptose.

A técnica do TUNEL foi executada em casos de cada subtipo histológico do AP GSMa. Um dos casos selecionados foi classificado histologicamente como do tipo III, com predominância celular, e dois dos casos apresentavam-se no subtipo histológico 2; no entanto um exibia um estroma mais condroide e o outro mais mixoide. O caso com estroma mixoide mostrou uma intensa positividade das células nesta região e negatividade nas demais regiões da lâmina. Os outros dois casos foram negativos, inclusive na área condroide. O teste foi repetido e obteve-se o mesmo resultado. Uma hipótese para esse achado é a de que as células mioepiteliais, após grande atividade metabólica com a produção de quantidades abundantes de estroma mixoide, encontrem-se neste fenótipo em processo de apoptose.

A associação dos resultados encontrados na técnica do TUNEL, juntamente com os encontrados nas reações de imunistoquímica, permite-nos pensar que as áreas mixóides são responsáveis pelo crescimento tumoral, não só pela perda de adesividade celular, mas também pela grande quantidade de imunomarcção observada nessa região, enquanto a área celularizada apresentou-se positiva apenas para bax. Talvez, as áreas mixóides sejam uma evolução de tumores previamente classificados como celularizados. Para o fortalecimento dessa hipótese, é necessária a avaliação de maior número de casos e também o emprego de outras metodologias.

A dificuldade de execução e resultados muitas vezes questionados em função de sua sensibilidade e especificidade (Labat-Moleur et al., 1998; Resendes et al., 2004) foi uma limitação também encontrada no nosso trabalho em relação ao TUNEL. Assim como sugerido por outros autores (Resendes et al., 2004), o presente trabalho também apresentou uma marcação anti-caspase 3 no estroma mixoide dos adenomas pleomórfico, embora a imunomarcção tenha sido moderada no caso avaliado e alguns casos da nossa amostra tenham sido negativos para a caspase 3 clivada. Outros trabalhos deveriam ser feitos para uma melhor elucidação dessa hipótese da equivalência entre TUNEL e imunomarcção para caspase 3 clivada.

Em resumo, nosso trabalho encontrou uma predominância de proteínas antiapoptóticas entre os grupos de neoplasias avaliadas, sendo que, entre as proteínas da apoptose aqui avaliadas, a bcl-2 parece exercer um papel importante no desenvolvimento tumoral. As proteínas caspase 3 e caspase 8 não parecem exercer um papel importante nem nas neoplasias de glândulas salivares, nem no tecido glandular. As proteínas reguladoras da apoptose como Trx e survivina também parecem exercer um papel importante no desenvolvimento tumoral, enquanto o Nfκβ-p65 não parece se relacionar com a tumorigênese dos casos avaliados.

Conclusões

- A imunomarcção nas GN, para todas as proteínas, apresentou-se principalmente na região ductal, embora, por vezes também pudesse ser percebida nos ácinos. Isso sugere uma maior atividade nos ductos do que nos ácinos. Entre os AP, foi observada uma maior positividade de casos para bcl-2. O número de casos positivos para bcl-2 foi maior entre as neoplasias que entre as glândulas adjacentes ao tumor, sugerindo uma diminuição do processo apoptótico.

- Observamos uma maior expressão da proteína da bcl-2 e uma menor expressão da proteína bax entre os AP dos tipos III e IV, sugerindo uma maior celularidade em função da diminuição da apoptose.

- A proteína bax teve baixa expressão tanto nas lesões tumorais quanto nas glândulas salivares normais, adjacentes ou não à lesão tumoral, sugerindo uma inibição dessa proteína em todos os grupos.

- À excessão da caspase 8 e Trx, não houve diferença na expressão das proteínas avaliadas entre os AP e GN. Dessa forma, a via das caspases não parece ser a via mais frequentemente ativada no tecido glandular normal e se mantém pouco expressa nas neoplasias. Para os AP foi observado um número muito maior de casos positivos para a Trx do que entre as GN e do que entre as neoplasias malignas. A Trx parece se relacionar com a manutenção celular nos AP, devendo ser essa relação mais estudada.

-A positividade para caspase 8 foi muito maior entre os casos de AP que entre as neoplasias malignas de glândula salivar. Entre as glândulas normais, a expressão dessa proteína foi menor que nos tumores. A via da caspase 8 não parece ser a mais frequentemente ativada no tecido glandular normal, embora pareça participar, de forma discreta, da apoptose no tecido neoplásico.

-Embora sem diferença estatística, o número de casos positivos para a caspase 3 clivada também foi maior entre os casos de AP que entre as neoplasias malignas, com diferentes expressões nas glândulas adjacentes de acordo com a lesão avaliada. A via da caspase 3 não parece ser a mais frequentemente ativada no tecido glandular normal, embora pareça participar, ainda que de forma discreta, da apoptose no tecido neoplásico.

-A negatividade para a expressão nuclear do Nf- κ B p65 sugere que a mesma não atua como fator de transcrição no desenvolvimento das neoplasias de glândulas salivares.

-A expressão da survivina foi encontrada em mais de 50% da amostra de AP de GSMe. Dessa forma, essa proteína parece participar do controle apoptótico dos AP.

-O padrão de marcação para o TUNEL seguiu o padrão de expressão das caspases nos casos de AP avaliados, com marcação significativa das células mioepiteliais no estroma mixoide.

-Não foram encontradas diferenças no padrão de expressão das proteínas em relação aos subtipos histológicos de AP e as características clínicas, idade e tamanho da lesão.

-A avaliação da caspase 3 clivada e de fatores relacionados ao seu controle são importantes para melhor compreensão da apoptose nas neoplasias de glândula salivar.

***Atividades
desenvolvidas***

Trabalhos apresentados em congressos:

- *Tuberculose com manifestação bucal*. XVII Jornada Mineira de Estomatologia (JOME), Belo Horizonte, MG, 3 a 5 junho de 2010.
- *Histiocitoma fibroso rico em células granulares*. XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, PE, 29 de julho de 2011.
- *Estomatite urêmica – relato de caso*. XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, PE, 29 de julho de 2011.
- *Imunoexpressão de HMLH1 está relacionada ao grau de displasia epitelial de leucoplasias bucais*. XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, PE, 29 de julho de 2011.
- *Immunohistochemistry study of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands*. II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Coimbra, Portugal, 10 a 12 de dezembro de 2012.
- *Patologia humana virtual – um desafio*. 47ª Reunião da Associação Brasileira de Ensino Odontológico – ABENO, Campinas, SP, 22 a 25 de agosto de 2012.
- *Imunolocalização da metalotioneína no adenoma pleomórfico de glândula salivar: correlações clínico-patológicas*. XXI Semana de Iniciação Científica da UFMG, Belo Horizonte, MG, 19 de outubro de 2012.
- *Immunoexpression of pro and anti-apoptotic proteins in pleomorphic adenoma*. IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition in Seattle, Washington, USA, 20 a 23 de março de 2013.

Participação em congressos:

- XVII Jornada Mineira de Estomatologia (JOME), Belo Horizonte, MG, 3 a 5 junho de 2010.
- Semana Científica da Odontologia (XI Encontro Científico de Faculdade de Odontologia da UFMG, IX Encontro Mineiro das Faculdades de Odontologia e III Encontro de Pesquisa em Saúde Coletiva), Belo Horizonte, MG, 9 a 14 de maio de 2011.
- XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, PE, 27 a 29 de julho de 2011.
- II Congresso Luso-Brasileiro de Patologia Experimental, Coimbra, Portugal, 10 a 12 de dezembro de 2012.
- IADR/AADR/CADR General Session & Exhibition in Seattle, Washington, USA, 20 a 23 de março de 2013.

Participação em mini-cursos:

- *Imaginologia aplicada à estomatologia*. Ministrada pelo prof. Elismauro Francisco Mendonça. XVII Jornada Mineira de Estomatologia (JOME), Belo Horizonte, MG, 5 junho de 2010, 2 horas.
- *Método lógico para redação científica*. Ministrada pelo prof. Gilson Luiz Volpato, Fonaldilogia e Medicina da UFMG, Belo Horizonte, MG, 17 e 18 de novembro de 2011, 16 horas.
- Curso teórico-prático “Workshop de Imuno-histoquímica”, Faculdade de Medicina da UFMG, 9 de dezembro de 2010, 8 horas.
- II Seminário Multidisciplinar do Estágio Obrigatório, Instituto de Ensino e Pesquisa da Santa Casa BH, 11 de junho de 2013, 4 horas.

Participação em bancas / comissão de avaliação:

- Trabalho de conclusão de Curso: Granuloma Central de Células Gigantes – Revisão de Literatura e Relato de Caso Clínico. Centro Universitário Newton Paiva, 22 de junho de 2011.
- Trabalho de Conclusão de Curso: Higiene bucal e prevenção da pneumonia nosocomial. Centro Universitário Newton Paiva, 22 de junho de 2012.
- Comissão de avaliação da XXI Semana de Iniciação Científica da UFMG, Belo Horizonte, MG, de 15 a 19 de outubro de 2012.

Palestra Ministrada:

- *A importância da patologia no dia a dia do Cirurgião Dentista*. Grupo de Estudos em Odontologia do Centro Universitário Newton Paiva, 15 de junho de 2011.

Orientação de trabalho:

- *Atenção odontológica em paciente hospitalizado em centros de unidade intensivos*. I Seminário Multidisciplinar do Estágio Obrigatório Santa Casa BH, Belo Horizonte, MG, 28 de novembro de 2012.

- *Atenção odontológica aos pacientes em CTI*. I Seminário Multidisciplinar do Estágio Obrigatório Santa Casa BH, Belo Horizonte, MG, 11 de junho de 2013.

Publicação completa relacionada ao projeto:

Viana, ACM, Ribeiro DC, Florencio TNG, Torres VS, Sousa AA, Aguiar MCF. Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a role in the control of apoptosis? *Acta Histochemica*, 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.12.004> (in press).

Publicação de resumos:

- Scalzo MTA, Ribeiro DC, Lacerda JCT, Mesquita RA, AGUIAR MCF. Tuberculose com manifestação bucal. In: XVII Jornada Mineira de Estomatologia, 2010, Belo Horizonte. *Revista do CROMG*. Belo Horizonte: CROMG, 2010. v. 11. p. 19-19.

- Ribeiro DC, Caldeira PC, Sousa SF, Carmo MAV, Aguiar MCF. Estomatite urêmica – relato de caso. *Int J Dent*, 10(Supl 2): 25-163 XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, 2011. <http://www.ufpe.br/ijid>

- Caldeira PC, Ribeiro D, Aguiar MCF, Almeida OP, Carmo MAV. Carmohistiocitoma fibroso rico em células granulares. *Int J Dent*, 10(Supl 2): 25-163 XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, 2011. <http://www.ufpe.br/ijid>

- Ribeiro DC, Caldeira PC, Abreu MHNG, Aguiar MCF, Carmo MAV. Imunoexpressão de hmlh1 está relacionada ao grau de displasia epitelial de leucoplasias bucais. *J Dent*, 10(Supl 2): 25-163 XIX Congresso Brasileiro de Estomatologia, Recife, 2011. <http://www.ufpe.br/ijid>

- Arantes DCB, Ribeiro DC, Junior JFR, Amorim JNC, Ferreira FA, Oliviera AA. Patologia humana virtual - um desafio. *Revista da ABENO*, 12(1):8-131, 2012. <http://www.abeno.org.br/ckfinder/userfiles/files/revista-abeno-2012-1.pdf>

- Ribeiro DC, Viana ACM, Caldeira PC, Aguiar MCF. Imunoexpressão de proteínas pró e anti-apoptóticas em adenoma pleomórfico. *J Dent Res* <92>A (1476), 2013, IADR/AADR/CADR 91st General Session, Seattle, Washington.

- Ribeiro DC; Viana ACM, Aguiar, MCF. Immunohistochemistry study of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands. In: II Congresso de Patologia Experimental, Coimbra, Portugal, 2012.

Publicações de artigos na íntegra (2010-2013):

- Viana, ACM, Ribeiro DC, Florencio TNG, Torres VS, Sousa AA, Aguiar MCF. Immunohistochemical expression. of metallothionien in pleomorphic adenoma of minor salivar glands: a role in the control of apoptosis? Acta Histochemica, 2013; <http://dx.doi.org/10.1016/j.acthis.2012.12.004> (in press).

- Servato, JPS, de Souza PEA, Horta MCR, Ribeiro DC, de Aguiar MCF, de Faria PR, Cardoso SV, Loyola AM. Odontogenic tumours in children and adolescents: a collaborative study of 431 cases. Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2012; xxx: xxx-xxx doi:10.1016/j.ijom.2012.02.021, available online at <http://www.sciencedirect.com>

- Ribeiro DC, Netto FOG, Sousa SF, Bernardes VF, Abreu MHNG , Aguiar MCF. Immunohistochemical expression of EGFR in oral leukoplakia: Association with clinicopathological features and cellular proliferation Med Oral Patol Oral Cir Bucal-AHEAD OF PRINT - ARTICLE IN PRESS

-Caldeira PC, Ribeiro DC, de Almeida OP, Mesquita RA, do Carmo MA. Tumor of the hard palate. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol. 2012 Jun;113(6):722-7. doi: 10.1016/j.oooo.2011.09.017.

- Coelho, MQ; Martelli, DRB; Ribeiro, DC; Gomez, RS; Pires, MBO; Martelli PH. Análise comparativa do perfil dos usuários e acesso aos serviços de diagnóstico bucal de duas universidades de Minas Gerais, Brasil / Comparative analysis of the profile of users and access to oral diagnostic services in two universities of Minas Gerais, Brazil. Arq. odontol;47(3):153-161, 2011.

Outras atividades:

- Participação no auxílio técnico aos alunos recebidos na UFMG pelo Procad para realização da técnica de imunoistoquímica, dupla marcação.

- Participação na rotina do laboratório e descrição histológica dos casos.

- Aprovação em concurso para professor auxiliar no Centro Universitário Newton Paiva e exercício do cargo de professor.

- Aprovação em processo seletivo para dentista do Centro de Terapia Intensiva da Santa Casa de Misericórdia de Belo Horizonte e exercício do cargo.

- Representante docente do colegiado do curso de bacharelado em odontologia do Centro Universitário Newton Paiva

Anexos

1) Tabelas:

Tabela 2 - Diagnóstico histopatológico e características clínicas das neoplasias de glândula salivar

Caso	Diagnóstico	Gênero	Idade	Localização	Histologia	Tamanho da lesão (cm)
1	AP	Feminino	19	FSVest	1	Ni
2	AP	Feminino	16	Palato	1	Ni
3	AP	Feminino	55	Palato	1	Ni
4	AP	Masculino	25	Palato	1	Ni
5	AP	Masculino	31	Palato	1	Ni
6	AP	Feminino	40	Palato	1	Ni
7	AP	Feminino	54	Palato	1	Ni
8	AP	Feminino	30	Palato	1	Ni
9	AP	Masculino	22	Palato	3	Ni
10	AP	Feminino	55	Soalho	1	Ni
11	AP	Masculino	34	Palato	4	Ni
12	AP	Feminino	X	Palato	3	Ni
13	AP	Masculino	49	Soalho	1	Ni
14	AP	Feminino	34	Palato	1	Ni
15	AP	Masculino	56	Palato	1	Ni
16	AP	Feminino	28	Palato	1	Ni
17	AP	Feminino	36	Palato	1	Ni
18	AP	Masculino	29	Palato	3	Ni
19	AP	Feminino	27	Palato	1	Ni
20	AP	Feminino	76	Palato	1	Ni
21	AP	Masculino	X	Palato	1	Ni

22	AP	Feminino	67	Palato	1	Ni
23	AP	Feminino	49	Palato	1	Ni
24	AP	Masculino	38	Palato	1	Ni
25	AP	Feminino	59	Palato	1	Ni
26	AP	Masculino	34	Palato	1	Ni
27	AP	Masculino	23	Palato	1	Ni
28	AP	Feminino	28	Mucosa jugal	4	Ni
29	AP	Masculino	26	Mucosa jugal	3	Ni
30	AP	Feminino	86	Palato	4	Ni
31	AP	Feminino	26	Mucosa jugal	2	Ni
32	AP	Masculino	30	parótida	2	2
33	AP	Feminino	56	parótida	1	6
34	AP	Feminino	68	submandi	3	3,5
35	AP	Masculino	48	parótida	1	6
36	AP	Feminino	29	submandi	2	5
37	AP	Masculino	26	parótida	1	3,5
38	AP	Feminino	25	parótida	1	3
39	AP	Masculino	28	parótida	2	4
40	AP	Masculino	29	parótida	2	3,2
41	AP	Feminino	76	submandi	1	2
42	AP	Feminino	40	parótida	1	4
43	AP	Masculino	54	parótida	2	0,6
44	CAC	Feminino	23	palato	Ni	Ni
45	CCA	Feminino	45	parótida	Ni	Ni
46	CDS	Feminino	95	parótida	Ni	Ni
47	MEC	Feminino	55	palato	Ni	Ni
48	ACPBG	Ni	ni	Ni	Ni	Ni

49	ACPBG	Ni	ni	Ni	Ni	Ni
50	ACPBG	Ni	ni	Ni	Ni	Ni
51	ACPBG	Masculino	27	palato	Ni	Ni
52	ACPBG	Ni	0	Ni	Ni	Ni
53	ACPBG	Masculino	60	palato	Ni	Ni
54	ACB	Masculino	76	parótida	Ni	Ni
55	Warthin	Masculino	49	parótida	Ni	Ni

ni – não informado; AP – adenoma pleomórfico; CAC – carcinoma adenoide cístico; CCA – adenocarcinoma de células acinares; MEC – carcinoma mucoepidermoide; ACPBG – adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade; ACB – adenoma de células basais; CDS - carcinoma do ducto salivar.

2) Aprovação do COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 0512.0.203.000-11

Interessado(a): **Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar**
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 16 de dezembro de 2011, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado **"Estudo da apoptose em neoplasias de glândulas salivares"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. ■

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

Profa. Maria Teresa Marques Amara
Coordenadora do COEP-UFMG

Referências
bibliográficas

Alam A, Cohen LY, Aouad S, Sékaly RP. Early activation of caspases during T lymphocyte stimulation results in selective substrate cleavage in nonapoptotic cells. *J Exp Med*. 1999 Dec 20;190(12):1879-90.

Al-Gayyar MM, Abdelsaid MA, Matragoon S, Pillai BA, El-Remessy AB. Thioredoxin interacting protein is a novel mediator of retinal inflammation and neurotoxicity. *Br J Pharmacol*. 2011 Sep;164(1):170-80.

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 Dec;128(12):1400-3.

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 Oct;40(9):954-9

Ashkenazi A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2008 Jun-Aug;19(3-4):325-31.

Autret A, Martin SJ. Emerging role for members of the Bcl-2 family in mitochondrial morphogenesis. *Mol Cell*. 2009 Nov 13;36(3):355-63.

Barnes, L.; Eveson, J. W.; Reichart, P.; Sidransky. *Genética e patologia dos tumores de cabeça e pescoço– Classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde*. 1ª ed. Livraria Editora, 2009.

Bozec A, Ruffion A, Decaussin M, Andre J, Devonec M, Benahmed M, Mauduit C. Activation of caspases-3, -6, and -9 during finasteride treatment of benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005 Jan;90(1):17-25. Epub 2004 Oct 26.

Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke*. 2009 May;40(5):e331-9.

Burz C, Berindan-Neagoe I, Balacescu O, Irimie A. Apoptosis in cancer: key molecular signaling pathways and therapy targets. *Acta Oncol*. 2009;48(6):811-21.

Carlinfante G, Lazzaretti M, Ferrari S, Bianchi B, Crafa P. P53, bcl-2 and Ki-67 expression in adenoid cystic carcinoma of the palate. A clinico-pathologic study of 21 cases with long-term follow-up. *Pathol Res Pract*. 2005;200(11-12):791-9.

Chattopadhyay M, Kodela R, Nath N, Barsegian A, Boring D, Kashfi K. Hydrogen sulfide-releasing aspirin suppresses NF- κ B signaling in estrogen receptor negative breast cancer cells in vitro and in vivo. *Biochem Pharmacol*. 2012 Mar 15;83(6):723-32.

Chau MN, Radden BG. A clinical-pathological study of 53 intra-oral pleomorphic adenomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1989 Jun;18(3):158-62.

Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. *Histopathology*. 2007 Jul;51(1):1-20.

Chowdhury I, Tharakan B, Bhat GK. Current concepts in apoptosis: the physiological suicide program revisited. *Cell Mol Biol Lett*. 2006;11(4):506-25.

Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. *Nat Rev Cancer*. 2009 Jul;9(7):501-7.

Cusimano EM, Knight AR, Slusser JG, Clancy RL, Pierce JD. Mitochondria: the hemi of the cell. *Adv Emerg Nurs J*. 2009 Jan-Mar;31(1):54-62

da Cruz Perez DE, de Abreu Alves F, Nobuko Nishimoto I, de Almeida OP, Kowalski LP. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol*. 2006 Feb;42(2):139-46.

da Cruz Perez DE, 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 Jul;68(7):895-902.

Dardick I, Byard RW, Carnegie JA. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1990 Jan;69(1):53-67.

de Araujo VC, Passador-Santos F, Turssi C, Soares AB, de Araujo NS. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: an analysis of epidemiological studies and hints for pathologists. *Diagn Pathol*. 2013 Jan 15;8:6.

de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Máximo AA, de Aquino EC, Alencar Rde C, Vencio EF. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol*. 2009 Dec;3(4):271-5.

Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995 Sep;48(9):876-8.

Dhanuthai K, Boonadulyarat M, Jaengjongdee T, Jiruedee K. A clinicopathologic study of 311 intra-oral salivary gland tumors in Thais. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jul;38(6):495-500.

do Prado RF, Consolaro A, Taveira LA. Expression of betacatenin in carcinoma in pleomorphic adenoma, pleomorphic adenoma and normal salivary gland: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2006 May 1;11(3):E247-51.

Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: a review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncol.* 2006 Sep;42(8):759-69. Epub 2006 Jun 6.

Dragomir LP, Simionescu C, Mărgăritescu C, Stepan A, Dragomir IM, Popescu MR. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Rom J Morphol Embryol.* 2012;53(1):89-93.

Duan WR, Garner DS, Williams SD, Funckes-Shippy CL, Spath IS, Blomme EA. Comparison of immunohistochemistry for activated caspase-3 and cleaved cytokeratin 18 with the TUNEL method for quantification of apoptosis in histological sections of PC-3 subcutaneous xenografts. *J Pathol.* 2003 Feb;199(2):221-8.

Expression of cyclooxygenase-2, Bcl-2 and Ki-67 in pleomorphic adenoma with special reference to tumor proliferation and apoptosis. *Oral Oncol.* 2004 Oct;40(9):954-9.

Favaloro B, Allocati N, Graziano V, Di Ilio C, De Laurenzi V. Role of apoptosis in disease. *Aging (Albany NY).* 2012 May;4(5):330-49.

Fodor D, Pop S, Maniu A, Cosgaria M. Gray scale and Doppler ultrasonography of the benign tumors of parotid gland (pleomorphic adenoma and Warthin's tumor). Pictorial essay. *Med Ultrason.* 2010 Sep;12(3):238-44.

Frank AK, Pietsch EC, Dumont P, Tao J, Murphy ME. Wild-type and mutant p53 proteins interact with mitochondrial caspase-3. *Cancer Biol Ther.* 2011 Apr 15;11(8):740-5. Epub 2011 Apr 15.

Frankfurt OS, Krishan A. Identification of apoptotic cells by formamide-induced dna denaturation in condensed chromatin. *J Histochem Cytochem.* 2001 Mar;49(3):369-78.

Fukuda M, Kusama K, Sakashita H. Cimetidine inhibits salivary gland tumor cell adhesion to neural cells and induces apoptosis by blocking NCAM expression. *BMC Cancer.* 2008 Dec 18;8:376.

Fulda S. Caspase-8 in cancer biology and therapy. *Cancer Lett.* 2009 Aug 28;281(2):128-33.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 1992 Nov;119(3):493-501.

Ghiotto F, Fais F, Bruno S. BH3-only proteins: the death-puppeteer's wires. *Cytometry A.* 2010 Jan;77(1):11-21.

Hasnan J, Yusof MI, Damitri TD, Faridah AR, Adenan AS, Norbaini TH. Relationship between apoptotic markers (Bax and Bcl-2) and biochemical markers in type 2 diabetes mellitus. *Singapore Med J.* 2010 Jan;51(1):50-5.

Hockenbery D, Nuñez G, Millman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. *Nature.* 1990 Nov 22;348(6299):334-6.

Jaskoll T, Chen H, Min Zhou Y, Wu D, Melnick M. Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development. *BMC Dev Biol.* 2001

Jia L, Esguerra RL, Tang X, Yin H, Sakamoto K, Okada N, Takagi M, Kurimoto C, Kawano S, Tsuji G, Hatachi S, Jikimoto T, Sugiyama D, Kasagi S, Komori T, Nakamura H, Yodoi J, Kumagai S. Thioredoxin may exert a protective effect against tissue damage caused by oxidative stress in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol.* 2007 Oct;34(10):2035-43.

Jia L, Esguerra RL, Tang X, Yin H, Sakamoto K, Okada N, Takagi M. Prognostic value of apoptosis and apoptosis-associated proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Pathol Int.* 2004 Apr;54(4):217-23.

Jiang Z, Wu W, Qian ML. Cellular damage and apoptosis along with changes in NF-kappa B expression were induced with contrast agent enhanced ultrasound in gastric cancer cells and hepatoma cells. *Cancer Cell Int.* 2012 Mar 15;12(1):8. doi: 10.1186/1475-2867-12-8.

Jung MJ, Roh JL, Choi SH, Nam SY, Kim SY, Lee SW, Cho KJ. Basal cell adenocarcinoma of the salivary gland: a morphological and immunohistochemical comparison with basal cell adenoma with and without capsular invasion. *Diagn Pathol.* 2013 Oct 21;8(1):171.

Junqueira, LC; Carneiro, J. *Histologia Básica-Texto e Atlas.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Katchburian E, Arana V, *Histologia e embriologia oral.* 1 ed. São Paulo: Panamericana, 1999.

Kallianpur A, Yadav R, Shukla NK, Deo SV, Muduly DK. Locally advanced salivary duct carcinoma of the parotid gland. *Ann Maxillofac Surg.* 2012 Jul;2(2):178-81.

Kulkarni K, Selesniemi K, Brown TL. Interferon-gamma sensitizes the human salivary gland cell line, HSG, to tumor necrosis factor-alpha induced activation of dual apoptotic pathways. *Apoptosis.* 2006 Dec;11(12):2205-15.

Kobayashi K, Hatano M, Otaki M, Ogasawara T, Tokuhisa T. Expression of a murine homologue of the inhibitor of apoptosis protein is related to cell proliferation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Feb 16;96(4):1457-62.

Koschny R, Brost S, Hinz U, Sykora J, Batke EM, Singer S, Breuhahn K, Stremmel W, Walczak H, Schemmer P, Schirmacher P, Ganten TM. Cytosolic and nuclear caspase-8 have opposite impact on survival after liver resection for hepatocellular carcinoma. *BMC Cancer.* 2013 Nov 9;13(1):532.

Kotsafti A, Farinati F, Cardin R, Burra P, Bortolami M. Bax inhibitor-1 down-regulation in the progression of chronic liver diseases. *BMC Gastroenterol.* 2010 Apr 1;10:35.

Kurimoto C, Kawano S, Tsuji G, Hatachi S, Jikimoto T, Sugiyama D, Kasagi S, Komori T, Nakamura H, Yodoi J, Kumagai S. Thioredoxin may exert a protective effect against tissue damage caused by oxidative stress in salivary glands of patients with Sjögren's syndrome. *J Rheumatol*. 2007 Oct;34(10):2035-43.

Labat-Moleur F, Guillermet C, Lorimier P, Robert C, Lantuejoul S, Brambilla E, Negoescu A. TUNEL apoptotic cell detection in tissue sections: critical evaluation and improvement. *J Histochem Cytochem*. 1998 Mar;46(3):327-34.

Lei Y, Chiosea SI. Re-evaluating historic cohort of salivary acinic cell carcinoma with new diagnostic tools. *Head Neck Pathol*. 2012 Jun;6(2):166-70.

Li SX, Chai L, Cai ZG, Jin LJ, Chen Y, Wu HR, Sun Z. Expression of survivin and caspase 3 in oral squamous cell carcinoma and peritumoral tissue. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):5027-31.

Liao Y, Zeng H, Wang X, Huang Y, Chen N, Ge B, Tang L, Luo Q. Expression patterns and prognostic significance of inhibitor of apoptosis proteins in adenoid cystic carcinoma and pleomorphic adenoma of lachrymal gland. *Exp Eye Res*. 2009 Jan;88(1):4-11.

Lisi S, Sisto M, Lofrumento D, Frassanito MA, Caprio S, Romano ML, Mitolo V, D'Amore M. Regulation of mRNA caspase-8 levels by anti-nuclear autoantibodies. *Clin Exp Med*. 2010 Sep;10(3):199-203

Locati LD, Perrone F, Losa M, Mela M, Casieri P, Orsenigo M, Cortelazzi B, Negri T, Tamborini E, Quattrone P, Bossi P, Rinaldi G, Bergamini C, Calderone RG, Liberatoscioli C, Licitra L. Treatment relevant target immunophenotyping of 139 salivary gland carcinomas (SGCs). *Oral Oncol*. 2009 Nov;45(11):986-90.

MacKenzie SH, Schipper JL, Clark AC. The potential for caspases in drug discovery. *Curr Opin Drug Discov Devel*. 2010 Sep;13(5):568-76.

Marioni G, Marino F, Stramare R, Marchese-Ragona R, Staffieri A. Benign metastasizing pleomorphic adenoma of the parotid gland: a clinicopathologic puzzle. *Head Neck*. 2003 Dec;25(12):1071-6.

Miranda Viana Ade C, Ribeiro DC, Florêncio TN, Santos VT, Sousa AA, Aguiar MC. Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: A role in the control of apoptosis? *Acta Histochem*. 2013 Jul;115(6):564-8.

Munteanu MC, Mărgăritescu C, Cionca L, Nițulescu NC, Dăguci L, Ciucă EM. Acinic cell carcinoma of the salivary glands: a retrospective clinicopathologic study of 12 cases. *Rom J Morphol Embryol*. 2012;53(2):313-20.

Nagao T, Sato E, Inoue R, Oshiro H, H Takahashi R, Nagai T, Yoshida M, Suzuki F, Obikane H, Yamashina M, Matsubayashi J. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors:

application for surgical pathology practice. *Acta Histochem Cytochem*. 2012 Oct 31;45(5):269-82.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*, 3ª edição, 2009, Elsevier Editora, 972 páginas

Norberg-Spaak L, Dardick I, Ledin T. Adenoid cystic carcinoma: use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome. *Head Neck*. 2000 Aug;22(5):489-97.

Nikitakis NG, Scheper MA, Papanikolaou VS, Sklavounou A, Sauk JJ. Immunohistochemical expression of the oncogenic molecules active Stat3 and survivin in benign and malignant salivary gland tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2009;107:837-43.

Ochicha O, Malami S, Mohammed A, Atanda A. A histopathologic study of salivary gland tumors in Kano, northern Nigeria. *Indian J Pathol Microbiol*. 2009 Oct-Dec;52(4):473-6

Patel KJ, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM. Genes associated with early development, apoptosis and cell cycle regulation define a gene expression profile of adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol*. 2006 Nov;42(10):994-1004

Peterson QP, Hsu DC, Novotny CJ, West DC, Kim D, Schmit JM, Dirikolu L, Hergenrother PJ, Fan TM. Discovery and canine preclinical assessment of a nontoxic procaspase-3-activating compound. *Cancer Res*. 2010 Sep 15;70(18):7232-41.

Pommier Y, Sordet O, Antony S, Hayward RL, Kohn KW. Apoptosis defects and chemotherapy resistance: molecular interaction maps and networks. *Oncogene*. 2004 Apr 12;23(16):2934-49.

Pont E, Plá Á, Cruz Mojarrieta J, Ferrandis E, Brotons S, Vendrell JB. Salivary duct carcinoma: diagnostic clues, histology and treatment. *Acta Otorrinolaringol Esp*. 2013 Mar-Apr;64(2):150-3.

Xiang B, Zhang Y, Li YM, Gao Y, Gan YH, Wu LL, Yu GY. Phenylephrine protects autotransplanted rabbit submandibular gland from apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 5;377(1):210-4.

Pirger Z, Rácz B, Kiss T. Dopamine-induced programmed cell death is associated with cytochrome c release and caspase-3 activation in snail salivary gland cells. *Biol Cell*. 2009 Feb;101(2):105-16.

Poetsch M, Zimmermann A, Wolf E, Kleist B. Loss of heterozygosity occurs predominantly, but not exclusively, in the epithelial compartment of pleomorphic adenoma. *Neoplasia*. 2005 Jul;7(7):688-95.

Ponniah I, Murali GM, SureshKumar P, Kumaran MG, Shaheen A. Salivary duct carcinoma of the palate. *Indian J Dent Res*. 2005 Oct-Dec;16(4):167-70.

Raguénez G, Mühlethaler-Mottet A, Meier R, Duros C, Bénard J, Gross N. Fenretinide-induced caspase-8 activation and apoptosis in an established model of metastatic neuroblastoma. *BMC Cancer*. 2009 Mar 30;9:97. doi: 10.1186/1471-2407-9-97.

Redman RS. On approaches to the functional restoration of salivary glands damaged by radiation therapy for head and neck cancer, with a review of related aspects of salivary gland morphology and development. *Biotech Histochem*. 2008 Jun;83(3):103-30.

Resendes AR, Majó N, Segalés J, Espadamala J, Mateu E, Chianini F, Nofrarias M, Domingo M. Apoptosis in normal lymphoid organs from healthy normal, conventional pigs at different ages detected by TUNEL and cleaved caspase-3 immunohistochemistry in paraffin-embedded tissues. *Vet Immunol Immunopathol*. 2004 Jun;99(3-4):203-13.

Rivero ER, Caliarì MV, Tarquínio SB, Loyola AM, de Aguiar MC. Proliferative activity in oral salivary gland tumors: the role of PCNA and AgNOR assessed by a double staining technique. *J Oral Sci*. 2004 Jun;46(2):87-92.

Seethala RR. An update on grading of salivary gland carcinomas. *Head Neck Pathol*. 2009 Mar;3(1):69-77.

Sams RN, Gnepp DR. P63 expression can be used in differential diagnosis of salivary gland acinic cell and mucoepidermoid carcinomas. *Head Neck Pathol*. 2013 Mar;7(1):64-8.

Seifert G, Langrock I, Donath K. Pathomorphologische Subklassifikation der pleomorphen Speicheldrüsenadenome. *HNO* 1976;24:415-26.

Seol MB, Bong JJ, Baik M. Expression profiles of apoptosis genes in mammary epithelial cells. *Mol Cells*. 2005 Aug 31;20(1):97-104.

Spaulding B, Pan D, Ghadersohi A, Nielsen G, Jensen S, Gellert F, Ling X, Zhang M, Black A, Li F. Characterization of the 12C4 survivin monoclonal antibody and insight into the expression of survivin in human adult tissues. *Histopathology*. 2006 Dec;49(6):622-33.

Speight PM, Barrett AW. Prognostic factors in malignant tumours of the salivary glands. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Dec;47(8):587-93

Speight PM. Update on diagnostic difficulties in lesions of the minor salivary glands. *Head Neck Pathol*. 2007 Sep;1(1):55-60.

Stenner M, Klusmann JP. Current update on established and novel biomarkers in salivary gland carcinoma pathology and the molecular pathways involved. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2009 Mar;266(3):333-41.

Schultz DR, Harrington WJ Jr. Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum*. 2003 Jun;32(6):345-69.

- Szegezdi E, Macdonald DC, Ni Chonghaile T, Gupta S, Samali A. Bcl-2 family on guard at the ER. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2009 May;296(5):C941-53.
- Spaulding B, Pan D, Ghadersohi A, Nielsen G, Jensen S, Gellert F, Ling X, Zhang M, Black A, Li F. Characterization of the 12C4 survivin monoclonal antibody and insight into the expression of survivin in human adult tissues. *Histopathology*. 2006 Dec;49(6):622-33.
- Tadbir AA, Pardis S, Ashkavandi ZJ, Najvani AD, Ashraf MJ, Taheri A, Zadeh MA, Sardari Y. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13(10):5155-9.
- Takahashi S, Gobe GC, Yoshimura Y, Kohgo T, Yamamoto T, Wakita M. Participation of the Fas and Fas ligand systems in apoptosis during atrophy of the rat submandibular glands. *Int J Exp Pathol*. 2007 Feb;88(1):9-17.
- Takahashi S, Yoshimura Y, Yamamoto T, Wakita M. Cellular expression of Bcl-2 and Bax in atrophic submandibular glands of rats. *Int J Exp Pathol*. 2008 Oct;89(5):303-8.
- Tilly JL. Apoptosis and ovarian function. *Rev Reprod*. 1996 Sep;1(3):162-72.
- Tokunaga F, Iwai K. Linear ubiquitination: a novel NF- κ B regulatory mechanism for inflammatory and immune responses by the LUBAC ubiquitin ligase complex. *Endocr J*. 2012 Aug 31;59(8):641-52.
- Vangestel C, Van de Wiele C, Mees G, Peeters M. Forcing cancer cells to commit suicide. *Cancer Biother Radiopharm*. 2009 Aug;24(4):395-407.
- Vered M, Braunstein E, Buchner A. Immunohistochemical study of epidermal growth factor receptor in adenoid cystic carcinoma of salivary gland origin. *Head Neck*. 2002 Jul;24(7):632-6.
- Wang C, Youle RJ. The role of mitochondria in apoptosis*. *Annu Rev Genet*. 2009;43:95-118.
- Wu XW, Teng ZY, Jiang LH, Fan Y, Zhang YH, Li XR, Zhang YN. Human thioredoxin exerts cardioprotective effect and attenuates reperfusion injury in rats partially via inhibiting apoptosis. *Chin Med J (Engl)*. 2008 May 5;121(9):819-26.
- Xiang B, Zhang Y, Li YM, Gao Y, Gan YH, Wu LL, Yu GY. Phenylephrine protects autotransplanted rabbit submandibular gland from apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Dec 5;377(1):210-4.
- Yan C, Siegel D, Newsome J, Chilloux A, Moody CJ, Ross D. Antitumor indolequinones induced apoptosis in human pancreatic cancer cells via inhibition of thioredoxin reductase and activation of redox signaling. *Mol Pharmacol*. 2012 Mar;81(3):401-10.
- Yin HF, Okada N, Takagi M. Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. *Pathol Int*. 2000 Aug;50(8):603-9.

Zhang X, Zheng Y, Fried LE, Du Y, Montano SJ, Sohn A, Lefkove B, Holmgren L, Arbiser JL, Holmgren A, Lu J. Disruption of the mitochondrial thioredoxin system as a cell death mechanism of cationic triphenylmethanes. *Free Radic Biol Med*. 2011 Apr 1;50(7):811-20.

Zhang J, Peng B, Chen X. Expressions of nuclear factor kappaB, inducible nitric oxide synthase, and vascular endothelial growth factor in adenoid cystic carcinoma of salivary glands: correlations with the angiogenesis and clinical outcome. *Clin Cancer Res*. 2005 Oct 15;11(20):7334-43.

Zhu X, Zhang J, Chen X, Feng X. Comparison of Ki-67, cyclin E, and p63 in benign and malignant human pleomorphic adenoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2012 May;113(5):667-72.