

ALESSANDRA DE CASTRO MIRANDA VIANA

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA METALOTIONEÍNA NO ADENOMA
PLEOMÓRFICO DE GLÂNDULA SALIVAR: CORRELAÇÕES CLÍNICO-
PATOLÓGICAS**

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2012

ALESSANDRA DE CASTRO MIRANDA VIANA

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA METALOTIONEÍNA NO ADENOMA
PLEOMÓRFICO DE GLÂNDULA SALIVAR: CORRELAÇÕES CLÍNICO-
PATOLÓGICAS**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de concentração: Patologia Bucal.

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

FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
BELO HORIZONTE

2012

À Deus,

*“Eu pedi força...
E Deus me deu dificuldades para superar e, assim me fortalecer.
Eu pedi sabedoria...
E Deus me deu problemas para resolver.
Eu pedi prosperidade, solução para problemas materiais...
E Deus me deu capacidade para trabalhar.
Eu pedi saúde, cura...
E Ele me deu forças, compreensão e esperança.
Eu pedi coragem...
E Deus me deu perigos para superar.
Eu pedi favores...
E Deus me deu oportunidades.
Eu pedi carinho e amor...
E Deus me deu pessoas com quem conviver.
Na minha oração eu não recebi nada do que pedi, mas tudo o que precisava!”.*

(Autor desconhecido)

AGRADECIMENTOS:

À Prof^a. e orientadora Maria Cássia Ferreira de Aguiar, pela oportunidade, pelo aprendizado profissional e pessoal. Você é um exemplo de esforço, dedicação e ética.

Quanta sabedoria! Tenho muito orgulho de tê-la como orientadora!

Aos meus amados pais Ilton e Lenir, pelo amor, apoio incondicional, pelas orações que me sustentam e pelo exemplo de vida.

Aos meus irmãos Alisson e Thales, pela convivência maravilhosa, pelas risadas, pelo amor com o qual me cercam, pela união e companheirismo.

Ao meu marido Ivam, pela “paciência” neste momento difícil, pelo respeito, proteção e amor.

À minha pequena, minha luz, minha vida: Maria Eduarda. Obrigada por ter me apresentado o “maior amor do mundo”.

Ao tio Deusdete, pelos conselhos e apoio. Tenho um grande carinho por você!

À minha sogra Maria Luiza, aos meus cunhados Daniela e Rodrigo, e à minha prima Jackeline, pelas orações, apoio e cuidados imprescindíveis com a Maria Eduarda.

Às minhas cunhadas Tatiana e Maria Cláudia, pelas ajudas nos finais de semana e por torná-los cheios de alegria.

À minha avó Iolanda, à todos tios e primos, pelo carinho e pela “torcida” de sempre.

À minha avó Maria, pela luz da presença diária.

À minha grande amiga e “irmã de leite”, Dani Lopes, pelo carinho, pelas orações e por entender minha ausência.

Amo Vocês!!!

À Profª. Maria Auxiliadora, por toda ajuda, pelo aprendizado e pelos valiosos conselhos.

Quanta coisa aprendi com você...

À Profª. Tarcília, pela oportunidade e ensinamentos. Tenho em você um exemplo de profissionalismo!

Aos professores Ricardo Mesquita, Ricardo Gomez, Wagner Santos, pelos ensinamentos da pesquisa e pelo aprendizado.

Ao Prof. Saul Paiva Martins, pela atenção e pela força que não me negou.

À Pat, pela paciência e por tudo que me ensinou. Você merece seu lugar na docência...

Te admiro muito, amiga!

Ao Fred e Silvinha, meus dois grandes amigos e companheiros nos momentos mais difíceis... Obrigada pelo carinho, pelas ajudas constantes!

À Dani Cotta, por ter sido quase uma “co-orientadora” na realização deste trabalho.

Sem você, este trabalho seria muito mais difícil. Muito obrigada!!!

À Giovanna, pela disponibilidade, esclarecimentos e força no final deste trabalho.

Aos amigos da patologia: Fabrício, Vanessinha, Elizete, Márcio, Carolina, João, Renata, Ju Massote e Telminha pelos momentos de descontração e alegria e pelas numerosas ajudas.

Às minhas grandes amigas de mestrado: Mara e Janine. Obrigada por tudo!!!

À Taynara e Vanessa, pela valiosa ajuda na realização da pesquisa.

À Inês, sempre amiga e cuidadosa em nossos trabalhos.

Aos meus chefes Marcelo e Flávia, pelo grande apoio e por entender “meus horários complicados”.

À FAPEMIG e ao CNPq pelo apoio financeiro.

RESUMO:

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna mais frequente das glândulas salivares maiores e menores. Apesar do crescimento lento, pode alcançar grandes dimensões, especialmente quando localizado na parótida. Histologicamente exibe grande diversidade morfológica, com a participação de estruturas epiteliais-mioepiteliais. A metalotioneína (MT) é uma proteína rica em cisteína presente em células mioepiteliais de várias neoplasias benignas e malignas e que tem sua função associada com a proteção ao DNA, ao estresse oxidativo e a apoptose. O objetivo do presente trabalho foi avaliar através da técnica de imunistoquímica, a expressão da MT em APs, buscando a sua associação com características clínico-patológicas das lesões e, em especial, sua correlação com Bcl-2, em uma tentativa de analisar o papel da MT no controle da apoptose nos APs. Para isto, foram utilizados 35 casos de AP de glândulas salivares menores, emblocados em parafina e realizada a imunistoquímica para as proteínas MT e Bcl-2. A análise semi-quantitativa da expressão destas proteínas foi realizada pelo método “*Quickscore*”. Os dados foram analisados usando o programa de estatística SPSS (versão 17.0, para Windows. Chicago, IL). Foi observado que a presente amostra representa características epidemiológicas semelhantes às descritas para o AP. Não foi encontrada nenhuma associação entre as características clínico-patológicas dos APs e a imunexpressão das proteínas estudadas, porém foi observada uma correlação entre a expressão da MT e Bcl-2. Os presentes achados sugerem que a expressão da MT no AP possa ter, entre outras funções, um papel no controle da apoptose.

Unitermos: adenoma pleomórfico, metalotioneína, Bcl-2, apoptose, imunistoquímica.

ABSTRACT:

Pleomorphic adenoma (PA) is the most common benign neoplasm of major and minor salivary glands. The tumor growth is slow; however, PA can reach large dimensions, mainly when located in the parotid gland. The histological features are very diversified with the involvement of epithelial-myoepithelial structures. Metallothionein (MT) is a cysteine rich protein present in myoepithelial cells of several benign and malignant neoplasms. MT has its function associated with DNA protection, oxidative stress and apoptosis. The purpose of this study was to evaluate the expression of MT in PAs. Additionally, we investigated the association of the clinicopathologic features of the lesions with MT, and specifically, the correlation of Bcl-2 with MT in an attempt of evaluate the role of MT in the control of apoptosis in the PAs. Thirty five cases of PA of minor salivary gland were selected and immunohistochemistry was performed for Bcl-2 and MT proteins. The expression of these proteins was analyzed by the "*QuickScore*" method. The sample showed epidemiological characteristics similar of those described in the literature. We did not find association between the clinicopathologic characteristics of PAs and the immunoexpression of the proteins studied, but a correlation between Bcl-2 and MT was demonstrated. The results suggest that MT may have a role in the control of apoptosis in PA.

Keywords: pleomorphic adenoma, metallothionein, Bcl-2, apoptosis, immunohistochemistry

ABREVIATURAS E SIGLAS:

µm – Micrometro (ou micrômetro)

AP – Adenoma pleomórfico

Bcl2 – *B-cell CLL/lymphoma 2*

CAC – Carcinoma adenóide cístico

cAMP – AMP cíclico

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

CXPA – Carcinoma ex-adenoma pleomórfico

DAB – *Diaminobenzidine* (diaminobenzidina)

DNA – *Desoxirribonucleic acid* (ácido desoxirribonucléico)

EDTA – *Ethylenediamine tetraacetic acid*

EUA – Estados Unidos da América

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

Fig – Figura

FO – Faculdade de Odontologia

G0 – Intervalo de latência no qual as células se encontram fora do ciclo celular

G1 – Intervalo pós-mitótico e pré-síntese do DNA

G2 – Intervalo pós-síntese do DNA e pré-mitótico

GN – Glândula normal

HE – *Hematoxylin-eosin* (hematoxilina-eosina)

HRP – *Enzyme horseradish peroxidase*

LSAB+ – Labelled streptavidin biotin (sistema de detecção imunoistoquímica)

MEC – Matriz extracelular

MT – Metalotioneína

MT-I – Isoforma proteína da Metalotioneína 1

MT-II – Isoforma proteína da Metalotioneína 2

MT-III – Isoforma proteína da Metalotioneína 3 ou para o gene regulador desta isoforma

MT-IV – Isoforma proteína da Metalotioneína 4 ou para o gene regulador desta isoforma

NF-kB – Fator nuclear Kappa B

P53 – Proteína p 53

PBS – *Phosphate buffered saline*

SPSS – *Statistical Package for the Social Sciences*

TNF – Tumor necrosis factor (fator de necrose tumoral)

TRIS- EDTA – *Hidroximetil amino metano - Ethylenediamine tetraacetic acid -*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USA – *United States of America*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
2. REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Adenoma pleomórfico	18
2.2 Metalotioneína (MT)	21
2.2.1 Conceito e caracterização	21
2.2.2 Localização da MT na célula	23
2.2.3 Funções da MT	23
2.2.4 MT e apoptose	24
2.2.5 MT em glândula salivar normal e em neoplasias	27
2.3 Apoptose	28
3. OBJETIVOS	33
4.1 Objetivo geral	34
4.2 Objetivos específicos	34
4. METODOLOGIA	35
4.1 Seleção da amostra	36
4.2 Reação imunoistoquímica	36
4.3 Análise da marcação imunoistoquímica	39
4.3.1 Análise da imunomarcção da MT	39
4.3.2 Análise da imunomarcção de Bcl-2	42
4.4 Análise estatística	43
4.5 Aspectos éticos e legais	43
5. RESULTADOS	44

5.1 Características clínicas e histopatológicas-----	45
5.2 Imunoexpressão da MT no AP-----	46
5.3 Imunoexpressão da MT nas glândulas salivares normais -----	47
5.4 Imunoexpressão de Bcl-2 no AP-----	48
5.5 Imunoexpressão de Bcl-2 nas glândulas salivares normais-----	49
5.6 Correlação MT/Bcl-2-----	49
5.7 Artigo-----	53
6. DISCUSSÃO-----	69
7. CONCLUSÕES-----	78
8. REFERÊNCIAS-----	80
9. ANEXO-----	96
10. APÊNDICES-----	98

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 – Padronização imunoistoquímica para os anticorpos primários usados no estudo	38
TABELA 2 – Características clínico-patológicas dos casos de AP avaliados	45
Table 1 – Histological, clinical, and IHC data from 35 pleomorphic adenomas of the salivary glands	67

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 – Subtipos histológicos de APs (Seifert <i>et al.</i> , 1976)	50
FIGURA 2 – Imunomarcações encontradas nos casos de APs e GNs	50
FIGURA 3 – Distribuição da positividade para MT entre os diferentes subtipos histológicos de AP	51
FIGURA 4 – Positividade para MT nos APs e GNs avaliados	51
FIGURA 5 – Distribuição da positividade para Bcl-2 entre os diferentes subtipos histológicos de AP	52
FIGURA 6 – Positividade para MT nos APs e GNs avaliados	52
Figure 1 – Artigo - Immunohistochemical findings in samples of pleomorphic adenomas	68

1. INTRODUÇÃO

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna mais frequente das glândulas salivares maiores e menores. Histologicamente apresenta grande diversidade morfológica. Os componentes epiteliais apresentam variabilidade fenotípica, incluindo células basalóides, cuboidais, pavimentosas, fusiformes e plasmocitóides dispostas em lençóis, ninhos, cordões e ductos; estes últimos revestidos por células colunares luminiais e envolvidos por uma ou mais camadas de células poligonais com diferentes padrões de diferenciação mioepitelial. A participação da célula mioepitelial leva a variações no estroma, representadas por áreas mixóides, condróides, hialinas, osteóides e lipomatosas. A proporção entre os dois componentes varia de tumor para tumor, conferindo o aspecto pleomórfico a esta neoplasia e permitindo a identificação de alguns subtipos histológicos (Seifert *et al.*, 1976; Ellis & Auclair, 1996; Barnes *et al.*, 2005).

Clinicamente o AP é caracterizado por um crescimento lento que pode se estender por anos, levando excepcionalmente ao desenvolvimento de lesões muito grandes (Eveson & Cawson, 1985). É sabido que o crescimento lento está associado a baixos índices proliferativos (Alves *et al.*, 2002), entretanto, até o momento, o papel da apoptose neste comportamento não está totalmente esclarecido.

A expressão da metalotioneína (MT) tem sido demonstrada no AP nas células mioepiteliais neoplásicas, tanto naquelas que circundam as estruturas ductais, quanto nas que estão embebidas no estroma mixóide e condróide (Chauvin *et al.*, 1992; Sunardhi-Widyaputra *et al.*, 1995). As metalotioneínas (MTs) são um grupo de proteínas intracelulares ricas em cisteínas e de baixo peso molecular. A função destas proteínas está associada com a proteção ao DNA, ao estresse oxidativo e a apoptose; além da regulação do crescimento celular; diferenciação e ativação de certos fatores de

transcrição dependentes de zinco (Jasani & Schmid, 1997; Theocharis *et al.*, 2004; Maret, 2007; Dutsh-Wlcherek *et al.*, 2008). Com relação a apoptose, não há ainda certeza sobre a forma pela qual a MT atua, mas há sugestões de que isso ocorra via Bcl-2 (Shimoda *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2009).

A apoptose ou morte celular programada é um fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua morte, sendo frequente tanto em estados fisiológicos quanto patológicos (Cusimano *et al.*, 2009). Em relação à tumorigênese, a supressão da apoptose, assim como o aumento da atividade proliferativa, aumentam as chances de sobrevivência de células com danos ao DNA, induzindo o desenvolvimento tumoral (Fujita *et al.*, 1999). A imunistoquímica pode ser útil na avaliação da apoptose, demonstrando tanto proteínas antiapoptóticas como a Bcl-2, quanto pró-apoptóticas.

Apesar da existência de trabalhos que avaliam a expressão da MT em AP, o papel desta proteína neste tumor não foi ainda esclarecido. Neste trabalho, hipotetizamos que a expressão da MT no AP pode estar relacionada ao controle da apoptose. Para isso, a expressão da MT foi avaliada através da imunistoquímica e correlacionada à expressão imunistoquímica da proteína Bcl-2.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO (AP)

O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia mais comum de glândulas salivares maiores e menores (Ellis & Auclair, 1996), compreendendo 33% de todas as neoplasias benignas e malignas, 30% das neoplasias de parótida e 33% de todas as neoplasias em glândulas salivares menores (Pires *et al.*, 2007). Em adultos, pode ocorrer em qualquer idade, porém é mais comum em pacientes acima de quarenta anos e possui uma discreta tendência a acometer preferencialmente o gênero feminino (Nardone *et al.*, 2002). É o segundo tumor mais frequente em crianças, ficando atrás apenas dos hemangiomas (Oh Ys & Eisele, 2006).

Clinicamente, o AP apresenta-se como uma massa firme, com tendência a formar estrutura ovóide e bem-definida, de crescimento lento e indolor. Quando ocorre em glândulas salivares menores, o palato é a localização mais frequente, seguido pelo lábio superior e mucosa jugal (Eveson *et al.*, 2005; 2007; Pires *et al.*, 2007).

Histologicamente exibe grande diversidade morfológica. Os componentes principais incluem as células epiteliais e mioepiteliais, os elementos estromais ou mesenquimais (Eveson *et al.*, 2005), além da possível presença de uma cápsula fibrosa que pode se apresentar incompleta ou, ainda, infiltrada por células neoplásicas (Stennert *et al.*, 2001). O componente epitelial pode formar ductos, pequenas ilhotas, lençóis sólidos, cordões anastomosados, ou ainda, sofrer diferenciação escamosa. As estruturas ductais exibem diâmetros variados e são constituídas por duas ou mais camadas de células. As células internas ou luminais são cubóides com citoplasma eosinofílico e núcleos centrais ou colunares com núcleo na porção basal. As células externas às luminais são células mioepiteliais anguladas. Este arranjo lembra o ducto intercalar da glândula salivar normal. Entretanto, nos adenomas pleomórficos, as

células mioepiteliais formam espessos colares ao redor das estruturas ductiformes, em contraste com o ducto intercalar normal (Dardick, 1996; Ellis & Auclair, 1996; Eveson *et al.*, 2005). Em meio à proliferação de células mioepiteliais tumorais podem ser vistas áreas de diferenciação escamosa e mais raramente adiposa e óssea (Barnes *et al.*, 2005).

As células mioepiteliais são células de origem ectodérmica, que se situam entre as células luminais ductais ou acinares e a lâmina basal de várias glândulas secretoras, incluindo as glândulas salivares; exibindo características epiteliais e mesenquimais (Furuse *et al.*, 2005). Nestas localizações é clara a sua função como célula contrátil, facilitando a excreção dos produtos das glândulas. Outras funções têm sido atribuídas às células mioepiteliais, incluindo sua participação na progressão das neoplasias. Essas células expressam muitas proteínas estruturais da matriz extracelular (MEC), inibidores de proteinase e inibidores angiogênicos, e acumulam MEC ao invés de degradá-la. Na transformação maligna esta propriedade é perdida (Sternlicht *et al.*, 1996; Barsky, 2003; Adriance *et al.*, 2005).

Barnes *et al.* (2005), relatam que as células mioepiteliais podem formar um padrão reticular ou apresentar-se na forma de lençol de células fusiformes, plasmocitóides ou hialinas. Apesar desta variabilidade fenotípica, a identificação das células mioepiteliais em colorações de rotina (HE) é difícil. Estas células exibem diferentes estágios de diferenciação, podendo por vezes se apresentar como células precursoras ou mais especificamente por uma transição celular (entre células luminais e mioepiteliais). Particularmente no AP, raramente a célula mioepitelial apresenta a diferenciação completa (Araújo *et al.*, 2000; Furuse *et al.*, 2005).

A imunistoquímica no AP auxilia na caracterização das células mioepiteliais. Marcadores da célula mioepitelial incluem miosina, actina de músculo liso, actina músculo específica, H-caldesmon e calponina (Araújo *et al.*, 2000; Furuse *et al.*, 2005). No entanto, estes marcadores nem sempre distinguem a célula mioepitelial neoplásica da normal.

Os APs foram classificados histologicamente por Seifert *et al.* (1976) em 4 tipos, de acordo com a quantidade e natureza do estroma e diferenciação das células epiteliais:

Tipo I – (Clássico) Quando 30% a 50% do tumor é constituído por estroma, contendo uma quantidade equilibrada entre estroma e células epiteliais;

Tipo II – (Mixóide) mais de 80% do tumor é constituído por estroma;

Tipo III – (Celular) menos de 30% do tumor é constituído por estroma;

Tipo IV – Contém estroma em proporções semelhantes ao tipo III, porém apresenta uma diferenciação monomórfica no componente epitelial.

Alguns estudos mostram que o tipo mixóide é o mais comumente encontrado, seguido do celular e clássico quando são considerados os APs de glândula salivar maior (Seifert *et al.*, 1976; Stennert *et al.*, 2001). Essa classificação mostra a ampla morfologia do AP, porém, até o momento, os tipos histológicos parecem não ter relação com o comportamento da lesão ou com a transformação em carcinoma ex-adenoma pleomórfico - CXPA (Margaritescu *et al.*, 2005), embora Stennert *et al.* (2001), afirmem que o AP mixóide geralmente apresenta ausência focal de cápsula, o que representa um risco de recorrência.

Independentemente da variante histopatológica, o AP apresenta um crescimento lento que pode estar associado a baixos índices apoptóticos. Alterações na

apoptose têm sido demonstradas em neoplasias de glândula salivar, incluindo o AP (Aoki *et al.*, 2004). Fujita *et al.* (1999), demonstraram que a apoptose é facilmente induzida nas células ductais neoplásicas, mas não nas células mioepiteliais neoplásicas do carcinoma adenóide cístico (CAC), sugerindo que essas últimas são mais resistentes à apoptose. Ainda no CAC, a superexpressão de Bcl-2 levou a uma inibição da apoptose (Jia *et al.*, 2004) e no caso de APs, essa proteína foi mais expressa nas células mioepiteliais (Aoki *et al.*, 2004). No carcinoma mucoepidermóide, houve maior expressão de Bcl-2 na periferia dos ninhos tumorais (Yin, Okada, Takagi, 2000).

2.2 METALOTIONEÍNA (MT)

2.2.1 CONCEITO E CARACTERIZAÇÃO

A metalotioneína (MT) foi descrita em 1957 por Margoshes & Valee, a partir do estudo de tecidos renais de equinos intoxicados por cádmio. Em 1960 esta proteína foi isolada por Kagi & Vallee, sendo designada de metalotioneína. MTs não são encontradas somente no reino animal, mas também em microorganismos procariotas, assim como em plantas (Romero-Isart & Vasak, 2002; Haq *et al.*, 2003).

As metalotioneínas (MTs) são um grupo de proteínas não enzimáticas que se ligam a metais. Caracterizam-se pelo baixo peso molecular (6 a 7 KDa), e pelos altos níveis de cisteína (23 a 33%). O nome metalotioneína (MT) reflete as altas concentrações de tiolato sulfúrico e metal, ambos na ordem de 10%. A proteína não ligada a metais é denominada de tioneína ou apoproteína, sendo expressa transitoriamente em células não neoplásicas, em condições de deficiência de zinco (Davis & Cousins, 2000; Cherian, Jayasurya, Bay, 2003).

Fisiologicamente, os níveis celulares de MT são baixos e aumentam em resposta à presença de metais pesados, estresse, hormônios (glucagon, glicocorticóides), bem como cAMP, interleucinas 1 e 6, interferon, e fator de necrose tumoral (Davis & Cousins, 2000).

Em tecidos normais, as MTs são encontradas em células epiteliais (pele, mucosa bucal, rins, fígado, estômago, colo do útero, próstata e células basais ductais das glândulas salivares) e mioepiteliais (ao redor das glândulas sudoríparas, mamárias e salivares) (Van Den Oord *et al.*, 1993; Van Den Oord *et al.*, 1994; Sundelin *et al.*, 1997).

Em humanos, são codificadas pela família dos genes localizados no braço longo do cromossomo 16q13, determinando diferentes isoformas. Quatro isoformas têm sido identificadas: MT-I e MT-II são as duas isoformas principais e são encontradas em todos os estágios do desenvolvimento em vários tipos celulares (Nartey *et al.*, 1987). MT-III é encontrada em neurônios e células da glia e nos órgãos reprodutivos masculinos, com funções protetoras na patogênese de doenças neurodegenerativas (como Alzheimer e Parkinson) e na espermatogênese (Ebadi *et al.*, 1996; Fisher & Davie, 1998; Palmiter, 1998). Um outro estudo mostrou que a MT-III também pode estar presente na saliva e em glândulas salivares, exercendo um possível efeito citoprotetor (Irie *et al.*, 2004). A presença da MT-IV foi descrita em epitélio estratificado da mucosa bucal, principalmente restrita às camadas mais superficiais do epitélio, ao contrário das isoformas MT-I e MT-II, encontradas apenas nas camadas basal e parabasal (Quaife *et al.*, 1994). As MTs são ubíquas, porém apenas MT-I e MT-II são altamente induzíveis, sendo que os eventos que induzem MT-I e MT-II geralmente não se refletem na indução de MT-III e MT-IV (Haq *et al.*, 2003).

2.2.2 LOCALIZAÇÃO DA MT NA CÉLULA

A MT é uma proteína citoplasmática em tecidos adultos ou células em repouso (G0), e sua localização no núcleo é detectada em células no período fetal e neonatal (Chan & Cherian, 1993; Cherian *et al.*, 2003). Durante a fase G0 e a fase G1, a MT é detectada principalmente no citoplasma, enquanto que na fase S e a G2, sua expressão nuclear é evidente (Miles *et al.*, 2000; Coyle *et al.*, 2002; Sato & Konkoh, 2002; Theocharis *et al.*, 2004; Cherian & Kang, 2006). Ao final de G2 e início de M, a MT tende a retornar a sua localização citoplasmática (Coyle *et al.*, 2002; Sato & Konkoh, 2002).

2.2.3 FUNÇÕES DA MT

Desde sua descrição, as funções das MTs têm sido investigadas (Fischer & Davie, 1998; Palmiter, 1998). A sua principal função está ligada à manutenção da homeostase de metais essenciais (cobre e zinco) sendo considerada a proteína principal na regulação da biodisponibilidade do zinco, recebendo e doando esse metal a outros componentes celulares (Suhy *et al.*, 1999). A regulação de Zn pela MT é de grande importância, uma vez que o Zn é essencial para muitas funções celulares (Maret, 2002).

Outro importante papel das MTs é a detoxificação de metais pesados (cádmio e mercúrio), funcionando como protetora das células (Hamer, 1986; Nordberg & Nordberg, 2000; Cherian *et al.*, 2003). Alguns autores verificaram que camundongos MT^{-/-} apresentaram um aumento no nível de toxicidade, comparados ao grupo controle, em resposta ao cádmio injetado (Michalska & Choo, 1993).

As MTs também têm sido associadas à captura de radicais livres. Em função do alto teor de cisteína, estas proteínas são eficientes captadoras de espécies reativas de oxigênio, como peróxido de oxigênio (H₂O₂) hidroxilas (OH), superóxido (O₂) e óxido nítrico (NO), protegendo os tecidos contra injúrias oxidativas como radiação, peroxidação lipídica e estresse oxidativo causado por quimioterápicos e condições de hiperoxidação (Cherian, Jayasurya, Bay, 2003; Theocharis *et al.*, 2004). Também foram vistas evidências diretas de proteção da MT contra raios ultravioletas (Thyss *et al.*, 2005).

As MTs também atuam como agentes quelantes de íons metálicos e possuem ações antioxidantes e anti-inflamatórias que podem mediar ações antiapoptóticas (Aschner & West, 2005; Penkowa *et al.*, 2006). Como as respostas pró-inflamatórias, incluindo citocinas neurotóxicas como interleucinas e fator de necrose tumoral (TNF^a) podem induzir apoptose neuronal por si, a redução da inflamação pela MT pode contribuir para seus efeitos protetores (Nielsen, Bohr, Penkowa, 2006).

2.2.4 MT E APOPTOSE

O papel da metalotioneína na apoptose ainda não é bem conhecido. Em um estudo feito por Kondo *et al.* (1995), foi demonstrado um aumento da expressão de proteínas de genes de resposta ao dano do DNA e da apoptose em células que não expressavam a MT, sugerindo que essa proteína inibia o fenômeno da apoptose.

Abdel-Mageed & Agrawal. (1998), mostraram que essa ação antiapoptótica da MT era devida à regulação da concentração de zinco celular, estimulando a ativação do fator de transcrição fator nuclear-κB (NF- κB), que atua na via apoptótica relacionada ao TNF e inibe a morte celular. Entretanto, Sakurai *et al.* (1999), mostraram que a MT seria

um regulador negativo da atividade do NF- κ B. Outros estudos propostos por Shimoda *et al.* (2003) e Pedersen *et al.* (2009) mostraram que a MT interage com proteínas envolvidas com a apoptose, podendo inibi-la através da indução de oncogenes antiapoptóticos como Bcl-2 e c-myc, ou pela inibição de proteínas supressoras tumorais pró-apoptóticas como a caspase-1 e 3 ou ainda inibindo a liberação do citocromo c. Outros estudos que definam este mecanismo são ainda necessários. Os mecanismos moleculares pelos quais a MT pode reduzir a apoptose em neurônios foram apresentados recentemente. Num primeiro estudo, a via da apoptose dependente de Bcl-2 foi induzida em uma população específica de neurônios por retirada de potássio. O tratamento com MT foi capaz de reduzir significativamente o nível da apoptose (Amborjn *et al.*, 2008). O efeito antiapoptótico foi mediado pela interação direta de MT com a proteína do receptor de lipoproteínas (LRP), levando assim, a redução da expressão de Bcl-2 (Amborjn *et al.*, 2008). Como resultado, foi proposto que a MT reduz a apoptose através do mecanismo independente de caspase-3. No entanto, é provável que MT possa também reduzir a apoptose caspase-dependente, como mostrou um estudo, em que o tratamento de neurônios com MT, resultou em redução da fosforilação das proteínas GSK3 β , jun e Stat3, todas envolvidas na morte celular mediada pela caspase (Asmussen *et al.*, 2009). MT-III também foi envolvida com a prevenção da morte neuronal por ativação de NF κ B através da sinalização das vias TrkA/PI3K/Akt (Kim *et al.*, 2003). Além disso, a MT parece inibir a liberação de citocromo C pela mitocôndria, também reduzindo a apoptose (Kawai *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001).

Em um estudo recente, foram dosados os níveis de zinco e cobre nos cérebros de camundongos com envelhecimento acelerado, para investigar os efeitos da MT-III. A MT diminui significativamente a apoptose em neurônios de uma forma dose-

dependente, ao mesmo tempo em que aumentou os níveis de Bcl-2 e diminui os níveis de Bax, indicando que esta proteína poderia diminuir a neurodegeneração (Ma *et al.*, 2011).

Sundelin *et al.* (1997), demonstraram que a expressão de MT correlaciona-se positivamente à proliferação celular e inversamente a apoptose. Neste estudo foi demonstrada a presença da MT em mucosa normal de carcinoma epidemóide bucal. Todas as amostras de tecidos normais mostraram positividade para a MT apenas nas camadas basais e parabasais. As amostras dos tumores também foram positivas para a proteína, sendo localizada na periferia das pérolas córneas em tumores bem diferenciados, sugerindo que a MT protegeria as células das camadas basais e parabasais normais e periféricas tumorais contra sinais apoptóticos.

Em tumores de mama, foi visto que a desregulação da MT com oligonucleotídeos *antisense* induz paralisação de proliferação e apoptose nas células cancerosas mamárias que superexpressam a MT (Abdel-Mageed & Agrawal, 1997; Yap *et al.*, 2009), indicando que essa proteína pode ser um alvo terapêutico para o tratamento das neoplasias de mama.

Outros estudos também mostraram correlação inversa entre apoptose e expressão da MT em neoplasias (Cai *et al.*, 1998; Jayasurya *et al.*, 2000), enquanto outros revelaram correlação positiva (Zhang & Takenaka, 1998; Dziegiel *et al.*, 2004) e um estudo não mostrou correlação (Jin *et al.*, 2002).

2.2.5 MT EM GLÂNDULA SALIVAR NORMAL E EM NEOPLASIAS

Em células normais, as MTs regulam a homeostase (cobre e zinco), funcionando como protetora do ambiente tecidual (Cherian *et al.*, 2003). In vitro, a MT foi relacionada à maturação de células acinares de glândulas salivares (Hecht *et al.*, 2002). A superexpressão do gene MT-I em células da linhagem de glândulas salivares leva a uma diferenciação morfológica dessas células, aumentando o tamanho do ácino formado (Hecht *et al.*, 2002).

A marcação da MT em neoplasias benignas de glândula salivar e no carcinoma mucoepidermóide foi avaliada por Sunardhi-Widyaputra *et al.* (1995). Nos casos de APs, a MT esteve presente na camada externa das estruturas ductais e as células embebidas em estroma mixóide e em estroma condróide. Já no tumor de Warthin, algumas células ductais marcaram fracamente em conjunto com componentes linfóides. Alta marcação da MT foi encontrada somente nos mioepiteliomas. Também foi observada marcação em células que margeavam grupos de células tumorais do carcinoma mucoepidermóide. Como em outros estudos, estes resultados também demonstram que as células mioepiteliais expressam MT (Sunardhi-Widyaputra *et al.*, 1995, Alves *et al.*, 2007). Também foi relatado a presença de MT nas células mioepiteliais de APs, porém a maior expressão desta foi vista em casos de CAC (Chauvin *et al.*, 1992).

Alves *et al.* (2007) avaliaram a expressão da MT em CAC e destacaram o mais alto índice de marcação nos casos sólidos, sendo ela em padrão de mosaico e mais frequentemente citoplasmática, sugerindo que a MT tenha papel importante na progressão neoplásica, visto que os tumores sólidos são mais agressivos e estão

relacionados a um pior prognóstico (Fordice *et al.*, 1999; Kokemueller *et al.*, 2004; Perez *et al.*, 2006; Ko *et al.*, 2007).

Em outro estudo semelhante, A MT foi expressa mais intensamente nos casos sólidos de CAC, nos quais há menor diferenciação e menor proporção de estruturas ductais. A marcação mais intensa de MT também foi associada a menor índice de sobrevida. E ainda, tumores primários com metástases precoces apresentaram altos índices de MT, maiores que nos metastáticos tardios. Os autores concluíram que a MT apresenta-se como um potencial marcador de comportamento biológico para o CAC (Silva, 2010).

Nas glândulas salivares normais, a MT somente é expressa em células mioepiteliais e células basais dos ductos excretórios (Sunardhi-Widyaputra *et al.*, 1995; Muramatsu *et al.*, 2000).

2.3 APOPTOSE

A manutenção do número de células num tecido é feita pelo controle dos mecanismos de proliferação celular (mitose) e de apoptose (Yeudall & Jakus, 1995). Apoptose ou morte celular programada é um mecanismo de eliminação celular controlada, iniciado ou inibido por estímulos fisiológicos ou patológicos (Kerr, 1993) que exerce um importante papel no desenvolvimento da modulação e diferenciação na embriogênese, na proliferação e controle celular de vários tumores benignos e malignos (Williams, 1991).

Apoptose é um processo caracterizado por alterações morfológicas e bioquímicas que incluem a condensação da cromatina, a fragmentação do DNA internucleossomal e alterações na superfície celular que possibilitam o rápido

reconhecimento e englobamento dos corpos apoptóticos, evitando-se a indução de inflamação (Kuan & Kuida, 2003).

Fisiologicamente, a apoptose possibilita a eliminação de células não necessárias para a manutenção da homeostase (Wöhrl & Häcker, 1999). A sua ocorrência possibilita um controle altamente regulado da celularidade com eliminação de células indesejáveis e consequente manutenção da celularidade tecidual (Hengartner, 2000).

Quando ocorre em condições patológicas, a apoptose pode ser desencadeada por vários agentes, como vírus, hipóxia, substâncias químicas, agressão imunitária, radiações ionizantes, etc. No caso de tumores, além da proliferação descontrolada, também pode haver redução na capacidade das células neoplásicas proliferadas de sofrerem apoptose (Filho *et al.*, 2006).

Independente do estímulo que a célula receba, a apoptose resulta sempre da ativação de proteases, as quais induzem modificações funcionais e morfológicas características do processo.

São duas as vias de ativação da apoptose:

1) A via intrínseca ou mitocondrial é o processo de morte celular que se dá pela agressão mitocondrial. A sobrevivência ou morte celular é determinada pela permeabilidade da mitocôndria controlada por uma família de mais de 20 proteínas indutoras e supressoras da apoptose, cujo protótipo é a Bcl-2. Os membros dessa família, como Bcl-2 e Bcl-XL inibem a apoptose, prevenindo a liberação de citocromo c, sendo antiapoptóticas, enquanto Bax, Bid e Bak são proteínas pró-apoptóticas (Hengartner, 2000).

Quando as células sofrem algum tipo de agressão, sendo privadas de fatores de crescimento ou, quando acontece lesão ao DNA, um grupo de sensores é ativado. Alguns desses sensores, membros da família Bcl-2, ativam dois membros pró-apoptóticos da família Bax e Bak, que se dimerizam e se inserem no interior da membrana mitocondrial, formando canais através dos quais o citocromo c e outras proteínas mitocondriais extravasam para o citosol. Esse mesmo resultado (extravasamento de proteínas mitocondriais) pode acontecer quando outros sensores inibem a Bcl-2 e Bcl-xL. O citocromo c, junto a alguns co-fatores, ativam a caspase 9 e outras proteínas bloqueiam as atividades dos antagonistas das caspases que funcionam como inibidores fisiológicos da apoptose. O resultado é ativação da cascata de caspases, que leva a fragmentação nuclear (Filho *et al.*, 2006).

Quando as células são expostas a fatores de crescimento e outros sinais de sobrevivência, sintetizam proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2 e Bcl-xL, que antagonizam a Bax e Bak. Além de ativar as proteínas pró-apoptóticas, as células privadas de fatores de crescimento, mostram níveis reduzidos de Bcl-2 e Bcl-xL (Filho *et al.*, 2006).

O fator de indução da apoptose (AIF) é outro fator mitocondrial que pode iniciar o processo de apoptose independente das caspases (Broughton, Reutens, Sobey, 2009).

Proteínas Bcl-2

Proteínas Bcl-2 constituem uma família de proteínas indutoras e supressoras da apoptose. Podem ser subdivididas em dois grupos: pró-apoptóticas (Bax, Bad, Bid, Bcl-xS, Bak, Box, Bik, Blk, Bim, Hrk, BNIP3), localizadas principalmente na membrana

externa da mitocôndria; e antiapoptóticas (Bcl-2, Bcl-xl, A1, Mcl-1), localizadas no envelope nuclear e no retículo endoplasmático (Mignotte & Vayssiere, 1998). Essas proteínas determinam se a célula entrará ou não em apoptose (Spanos *et al.*, 2002). Estão ligadas às mudanças na permeabilidade da membrana da mitocôndria, mas também podem estar envolvidas na ativação das Caspases. A proteína Bcl-2 inibe a apoptose diretamente bloqueando as Caspases, e indiretamente impedindo a liberação de citocromo C (Mignotte & Vayssiere, 1998).

Em tumores de glândulas salivares, já foi demonstrado que a superexpressão de Bcl-2 leva a uma inibição da apoptose (Jia *et al.*, 2004) e que no caso de APs, há uma maior expressão dessa proteína nas células mioepiteliais, sendo que, 94% dos casos mostraram-se imunopositivos (Aoki *et al.*, 2004). No carcinoma mucoepidermóide, foi mostrado que nos padrões císticos ou sólidos, a Bcl-2 foi fortemente positiva na periferia dos ninhos tumorais (Yin, Okada, Takagi, 2000). Neste mesmo estudo, os tumores de grau I, mostraram uma maior expressão de Bcl-2 do que os tumores de grau II e grau III. O porque da expressão de Bcl-2 estar associada ao comportamento tumoral menos agressivo ainda deve ser esclarecido. Tem sido sugerido que Bcl-2 promove a sobrevivência de células em tumores com crescimento lento e que pode diminuir a taxa de aquisição de fenótipos agressivos. Além disso, Bcl-2 regula o crescimento celular, não só pela inibição da apoptose, mas também através do sistema de oxidação das células (Öfner *et al.*, 1994).

2) Via extrínseca:

A via extrínseca da apoptose é mediada pelos “receptores de morte”, presentes na membrana plasmática. Esses receptores pertencem à família de receptores para o fator

de necrose tumoral (TNFR) (Ashkenazi, 2002). O TNF 1 e Fas (CD95) são receptores de morte prototípicos. Quando o receptor do TNF é ativado pelos seus ligantes, o processo de morte celular pode ser desencadeado. Alguns desses ligantes são as citocinas pró-inflamatórias TNF- α , INF-gama e FasL, que se ligam a seus receptores específicos, também chamados “receptores da morte”. Uma vez ativado, o receptor da morte inicia uma sinalização em sua parte citoplasmática, ligando-se a proteínas denominadas “proteínas do domínio de morte”, como a FADD (proteínas do domínio de morte Fas). Essa associação ligante + receptor + FADD é denominado “trimerização”. A esta trimerização se segue a ligação à pró-caspase 8 com a formação um complexo denominado “DISC”. Uma vez ativada, a caspase 8 libera o DISC e pode ativar proteínas pró-apoptóticas que atuam na via mitocondrial ou podem ativar diretamente a caspase 3, que, por sua vez, atua na clivagem de substratos protéicos necessários ao reparo do DNA nuclear (Kulkarni *et al.*, 2006; Broughton *et al.*, 2009).

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar através da técnica de imunistoquímica, a expressão da MT em APs de glândulas salivares e em glândulas salivares normais.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever a expressão de MT nos APs e nas glândulas salivares normais adjacentes ao tumor.
- Descrever a expressão de Bcl-2 nos APs e glândulas salivares normais adjacentes ao tumor.
- Verificar a associação da expressão de MT e Bcl-2 com os diferentes subtipos histológicos e características clínicas de APs.
- Descrever a expressão de MT e Bcl-2 em glândulas salivares normais.
- Verificar a correlação entre a expressão imunistoquímica das proteínas MT e Bcl-2 no AP.

4. METODOLOGIA

4.1 SELEÇÃO DA AMOSTRA:

Para a realização do estudo, foram avaliados todos os casos diagnosticados como AP pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial (LPB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), no período de 1978 a 2011. As lâminas coradas em HE foram revisadas em um microscópio de luz, marca Zeiss, para confirmação do diagnóstico. Foram selecionados 35 casos que apresentaram material suficiente para as análises imunoistoquímicas. Todos estes casos estavam localizados em glândulas salivares menores, podendo ou não apresentar glândulas salivares normais adjacentes ao tumor. Não foram usados como critério de exclusão gênero, idade ou profissão. Os casos selecionados foram classificados em 4 subtipos histológicos, de acordo com a quantidade e natureza do estroma e diferenciação das células epiteliais (Seifert *et al.*, 1976, Seifert *et al.*, 1980).

Para o grupo controle, foram selecionados 12 casos de hiperplasias fibrosas que apresentavam glândulas salivares menores na lâmina própria e pouco ou nenhum infiltrado inflamatório em permeio às glândulas salivares. Os casos selecionados apresentavam faixa etária semelhante ao do grupo caso e os critérios de exclusão foram os mesmos utilizados para a seleção dos tumores.

4.2 REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA:

Para realização da imunoistoquímica, os casos emblocados em parafina foram submetidos a cortes de 3 μ m e montados em lâminas de vidro carregadas eletrostaticamente (Startfrost). Os passos iniciais 1, 2 e 3 do protocolo de imunoistoquímica descritos a seguir foram aplicados apenas para a imunolocalização da MT. Para detecção do Bcl-2, os passos iniciais foram substituídos pela utilização do

Trilogy (CELL MARQUE, Rocklin, CA, USA). A modificação deveu-se ao fato dos melhores resultados obtidos. Também para o Bcl-2, o sistema de detecção empregado foi o Advanced, conforme descrito na tabela 1, aumentando a sensibilidade da reação.

1. Desparafinização em xilol I *overnight* à temperatura ambiente;
2. Desparafinização em xilol II por 15 minutos à temperatura ambiente e hidratação em cadeia descendente de etanol (100%, 90% e 70%);
3. Lavagem em cinco banhos de água destilada;
4. Recuperação antigênica, conforme descrito na tabela 1;
5. Após o resfriamento, alcançando equilíbrio térmico com o meio ambiente, lavagem em cinco banhos água destilada;
6. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
7. Bloqueio da avidina (10 minutos) seguido de cinco banhos de água; destilada e bloqueio da biotina (15 minutos), seguido de cinco banhos de água destilada (Miller *et al.*, 1999);
8. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
9. Bloqueio da peroxidase endógena por incubação dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 10% (v/v) em dois banhos de 15 minutos;
10. Incubação com os anticorpos primários anti-MT, em câmara umidificada, conforme protocolo descrito na tabela 1;
11. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
12. Incubação em anticorpo secundário, conforme tabela 1, por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido;
13. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;

14. Incubação em solução de complexo terciário contendo peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente, em ambiente úmido conforme tabela 1;
15. Lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4 em três banhos de 5 minutos;
16. Incubação com solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (DAB) – Dako Liquid DAB + Substrate-Chromogen System por 3 minutos e em seguida, cinco banhos de água destilada;
17. Contracoloração com hematoxilina por 30 segundos e em seguida, cinco banhos de água destilada;
18. Desidratação em cadeia ascendente de etanol (70%, 90% e três vezes a 100%), diafanização em três banhos de xilol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário. O controle positivo para MT foi a hiperplasia fibrosa, uma vez que esta proteína sabidamente está expressa no epitélio da mucosa bucal. Para a Bcl-2, amostras de tumor odontogênico ceratocístico foram utilizadas como controle.

TABELA 1:

Padronização imunoistoquímica para os anticorpos primários usados no estudo.

Anticorpo Primário	Clone / Fabricante	Recuperação antigênica	Diluição	Incubação
Anti-MT Monoclonal Mouse Anti-Horse	Clone E9, subtipos MT1 e MT2 Dako	Tris-EDTA pH 8.0 em banho-maria por 30', à 96°C	1:100	1h/TA
Anti-Bcl-2 Monoclonal mouse	Clone 124 – Dako	Trilogy (1ml\ 100ml H2O), 2 banhos de 20' no Steamer	1:100	1h/TA

TA: Temperatura ambiente

4.3 ANÁLISE DA MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

Todas as reações foram avaliadas em microscópio óptico de luz, marca Zeiss, por um único observador, sem conhecimento prévio das características clínicas.

4.3.1 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DA MT

Para a análise da MT, foi feita uma avaliação descritiva e semi-quantitativa, sendo consideradas as marcações citoplasmáticas e nucleares das células tumorais. A reação foi considerada positiva quando houve presença de coloração castanha em quaisquer das regiões celulares, podendo ambas apresentar positividade.

O número de campos histológicos avaliados foi determinado de acordo com Alves *et al.* (2007), que propuseram a análise de 500 células, perfazendo aproximadamente 10 campos microscópios em maior aumento (400x).

A avaliação da lâmina foi realizada utilizando os campos histológicos presentes em um único eixo de movimento no charriot (x ou y). Inicialmente, com objetiva para magnificação de 10x, identificou-se a área de marcação mais evidente e intensa, denominada *hot spot*. Tendo essa área como referência, foi identificado o eixo de maior comprimento do corte tecidual que necessariamente passasse pelo hot spot, somando um número de 10 campos observados. A partir de uma observação em objetiva de 40x foi estimado o número de campos microscópicos possíveis de se avaliar neste longo eixo. Como apenas 10 campos seriam avaliados por cada caso, o seguinte cálculo foi realizado para determinar o período entre um campo a ser avaliado e o outro, dentro do eixo selecionado previamente:

$$l = (n/10) - 1$$

(onde "l" é o número de campos que constituem o intervalo entre dois campos a serem analisados, e "n" é o número total de campos constantes do longo eixo orientado pelo hot spot, sendo considerados apenas números inteiros, sem arredondamento).

Isso possibilitou a avaliação da maior área possível da seção tecidual e não privilegiou apenas as áreas marcadas.

Observaram-se quatro parâmetros na análise descritiva da marcação:

A- Padrão de marcação (avaliação da MT no interior da célula, se ausente, citoplasmática, nuclear e citoplasmática ou apenas nuclear):

- 0- Ausência de marcação
- 1- Citoplasmática
- 2- Nuclear
- 3- Citoplasmática e nuclear.

B- Intensidade (para estimar a quantidade de proteína transcrita na célula, para tal avalia-se a intensidade da marcação, que é dividida em ausente, fraca, moderada e intensa):

- 0- Ausência de marcação
- 1- Fraca
- 2- Moderada
- 3- Forte

C- Proporção (avalia a quantidade de células tumorais que expressam MT, qualquer que seja a intensidade ou compartimento celular marcado):

- 0- Ausência de marcação
- 1- > 0% até 25%
- 2- ≥ 25% até 50%
- 3- ≥ 50% até 75%
- 4- ≥ 75%

D- Núcleo (identificação proporcional de células que apresentam marcação no compartimento nuclear, independente da intensidade ou mesmo se esta é restrita ou simultânea com a citoplasmática)

- 0- Ausência de marcação
- 1- 0% até 25%
- 2- ≥ 25% até 75%
- 3- ≥ 75%

Para avaliação semi-quantitativa da imunistoquímica, foi utilizado o método multiplicativo “*Quickscore*” (Detre *et al.*, 1995). Este método considera tanto a intensidade quanto a proporção de células marcadas com índices que variam de 0 a 12. A intensidade da coloração foi multiplicada pelos índices relativos à proporção de células marcadas. Após a realização do *Quickscore*, classificou-se três grupos para avaliação da MT (Yamasaki *et al.*, 2006):

Grupo 1- Os valores de 0 foram negativos

Grupo 2- Valores de 1 a 3 eram fracamente positivos

Grupo 3- Valores de 4 a 12 foram fortemente positivos

Para análise dicotomizada, os grupos 1 e 2 foram considerados negativos e o grupo 3 positivo. A avaliação semi-quantitativa da MT foi feita de forma independente por dois avaliadores e não foram encontradas discrepâncias nas avaliações. A mesma análise foi feita nas glândulas normais presentes nos tecidos controle.

4.3.2 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO DE BCL-2

Para a avaliação de Bcl-2, também foi utilizado o método semi-quantitativo “*Quickscore*” (Detre *et al.*, 1995). A intensidade da marcação foi categorizada como 0 (negativo), 1 (fraca), 2 (moderada) e 3 (forte) e multiplicada pelos índices gerados pelos percentuais de células positivas (Nikitakis *et al.*, 2009):

- 0- 0%;
- 1- <20%;
- 2- 20-50%;
- 3- >50%.

O *Quickscore* gerou índices que variam de 0 a 9, classificados em quatro grupos:

- 1- 0
- 2- Valores de 1 a 3
- 3- Valores de 4 a 6
- 4- Valores de 7 a 9

Para a análise dicotomizada, os grupos 1 e 2 foram considerados negativos, 3 e 4 positivos.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram armazenados e analisados usando o programa de estatística SPSS (versão 17.0, para Windows. Chicago, IL). A análise da distribuição normal foi feita usando o teste Shapiro-Wilk. Associação da expressão da MT e Bcl-2 nas neoplasias e em glândulas normais foram feitas usando o Teste exato de Fisher. Análises de associação entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos descritos e os subtipos histológicos e características foram feitas usando o Teste exato de Fisher. A correlação entre os marcadores foi avaliada pelo teste de Correlação de Spearman. Em todas as análises o nível de significância admitido foi $p < 0,05$.

4.5 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS:

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEPE-UFMG), sob o número **512/11**, obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS n^o 196/96 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

5. RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS:

Foram encontrados 45 casos de AP de glândulas salivares, diagnosticados no período compreendido entre os anos de 1978 e 2011, porém apenas 35 casos apresentaram dados em qualidade e quantidade suficiente de material para serem incluídos nas etapas seguintes do estudo. As características clínicas e histopatológicas podem ser vistas na Tabela 2.

TABELA 2:

Características clínico-patológicas dos casos de AP avaliados

Características	Número de pacientes (%)
Gênero	
Feminino	22 (62,86)
Masculino	13 (37,14)
Idade (anos)	
≤ 30	14 (63,64)
> 30	19 (36,36)
Localização	
Palato	29 (82,86)
Outras	6 (17,14)
Classificação Histológica	
I	27 (77,15)
II	2 (5,71)
III	4 (11,43)
IV	2 (5,71)

A maioria dos pacientes era do sexo feminino (22/35, 62,86%) e (13/35, 37,14%) do sexo masculino. Estes pacientes apresentaram idade variando entre 16 a 86 anos, com média de 39,5 anos, ressaltando que dois casos não tiveram a idade

registrada no prontuário. A década mais acometida foi a terceira década de vida, entretanto, a maioria dos casos ocorreram acima dos 30 anos.

A região de palato foi o local mais acometido (29/35, 82,86%), seguido da mucosa jugal (3/35, 8,57%), soalho bucal (2/35, 5,71%) e lábio (1/35, 2,86%).

Quanto à classificação histológica segundo Seifert *et al.* (1976), 27 tumores (77,15%) foram classificados como tipo I, 2 (5,71%) como tipo II, 4 (11,43%) como tipo III e 2 (5,71%) como tipo IV (FIG. 1).

5.2 IMUNOEXPRESSÃO DA MT NO AP

Todos os casos de AP examinados apresentaram marcação pela MT. Em uma mesma lesão era possível observar, coloração intensa, fraca ou negativa das células. Algumas células apresentaram marcação apenas citoplasmática ou nuclear e em outras era observada marcação nuclear e citoplasmática. Essa heterogeneidade caracteriza o padrão de mosaico (Muramatsu *et al.*, 2000; Cardoso *et al.*, 2002).

Quanto à distribuição da marcação de acordo com a arquitetura tumoral, nas áreas estromais observou-se marcação citoplasmática focal ou difusa das células mioepiteliais. Nos ninhos de células epiteliais, as células centrais foram as que exibiram maior marcação, enquanto nas áreas de metaplasia escamosa as células periféricas foram as mais evidenciadas pela MT. Nas estruturas ductais, observou-se intensa marcação nas células periféricas, com padrão de marcação nuclear e citoplasmático; já as células luminiais apresentaram marcação menos intensa e apenas citoplasmática. Alguns ductos foram negativos para a MT (FIG. 2A).

As glândulas salivares normais adjacentes aos tumores expressaram, com frequência moderada, marcação nuclear forte das células ductais periféricas e

citoplasmática fraca das células ductais luminais. Células acinares ora mostraram marcação citoplasmática e nuclear das células periféricas, ora foram negativas para a MT.

Tabulados os índices de marcação, foram evidenciados três padrões distintos de marcação: em 23 casos (65,72%), o número de células com coloração nuclear e citoplasmática foi maior do que o de células com marcação apenas citoplasmática (6 casos -17,14%), e do que o de células com marcação nuclear (6 casos -17,14%).

Feita a análise semiquantitativa da MT usando o método *Quickscore*, dos 35 tumores avaliados, 2 não apresentaram positividade (índice 0); 15 tumores foram fracamente positivos (índices 1 a 3) e 18 foram fortemente positivos (índices 4 a 12). Ao final, pela análise dicotomizada, 18 tumores foram positivos (índices 4 a 12) e 17 negativos (índices 0 a 3).

Nenhuma associação significativa entre a positividade para metalotioneína e os subtipos histológicos de AP foi encontrada ($p \geq 0,05$) (FIG. 3), entretanto, foi demonstrado que 13 dos 27 tumores do tipo I, apresentaram os maiores índices de marcação pela MT e foram considerados fortemente positivos. Neste mesmo grupo foram também encontrados dois casos com os menores índices (0), sendo negativos.

A expressão da MT no AP não esteve associada também com nenhuma característica clínica (Tabela 2).

5.3 IMUNOEXPRESSÃO DA MT NAS GLÂNDULAS SALIVARES NORMAIS

Imunorreatividade para a MT também foi observada nas glândulas salivares normais presentes em amostras de hiperplasias fibrosas, porém alguns casos foram negativos. Nos ductos, observou-se marcação citoplasmática fraca das células luminais

ductais e forte marcação nuclear e citoplasmática das células basais e mioepiteliais. As células mioepiteliais que circundam os ácinos e ductos apresentaram, por vezes, forte marcação nuclear. No geral, as células acinares foram negativas para a MT (FIG. 2B).

Cinco dos doze casos não mostraram imunorreatividade para a MT nas glândulas salivares normais. Outros três casos foram fracamente positivos (índices 1 a 3). Apenas três casos obtiveram índice 4 e foram classificados como fortemente positivos. A análise dicotomizada não mostrou, entretanto, diferenças na expressão da MT entre as glândulas normais e os APs ($p \geq 0,05$) (FIG. 4).

5.4 IMUNOEXPRESSÃO DE Bcl-2 NO AP

Oito casos de AP não apresentaram imunorreatividade para a Bcl-2. Os tumores que se mostraram positivos, exibiram uma forte marcação citoplasmática focal ou difusa de cordões e ninhos das células epiteliais. Os ductos presentes exibiram marcação citoplasmática forte e contínua das células basais, enquanto nas células ductais luminiais observou-se uma marcação mais fraca e descontínua. Por vezes, os ductos presentes não foram positivos, mas o infiltrado inflamatório circundante foi fortemente corado pela Bcl-2 (FIG. 2C).

Não houve expressão de Bcl-2 nas glândulas normais adjacentes ao tumor, mas o infiltrado inflamatório circundante corou-se positivamente.

Pela avaliação, utilizando o método *Quickscore*, obtiveram-se índices finais que variaram de 0 a 9. Dos 35 tumores, 11 obtiveram índices entre 0 e 3 e foram considerados negativos, enquanto 24 apresentaram índices entre 4 e 9, sendo positivos para Bcl-2. Nenhuma associação significativa entre os índices de Bcl-2 e os subtipos

histológicos de AP foi encontrada ($p \geq 0,05$) (FIG. 5). Foi observado que os dois tumores do tipo IV foram negativos para Bcl-2.

Nenhuma associação foi encontrada entre a expressão de Bcl-2, idade do paciente, gênero ou localização da lesão.

5.5 IMUNOEXPRESSÃO DE Bcl-2 NAS GLÂNDULAS SALIVARES NORMAIS

A positividade para Bcl-2 foi evidenciada nos ductos e não houve expressão nos ácinos. Frequentemente todo o ducto apresentou marcação, sendo que as células basais e mioepiteliais tiveram expressão mais forte e contínua do que as células luminiais ductais. Algumas células exibiram uma marcação citoplasmática mais intensa. Houve marcação de algumas células mioepiteliais que circundam os ácinos. As poucas células inflamatórias presentes também coraram-se positivamente para Bcl-2 (FIG. 2D). Não houve associação entre a expressão de Bcl-2 no AP e glândulas normais ($p \geq 0,05$) (FIG. 6).

5.6 CORRELAÇÃO MT/Bcl-2

Apesar de não ter sido encontrada significância estatística, foi observada uma correlação positiva moderada entre MT e Bcl-2 ($p = 0.0047 < 0.05$, $r = 0.466$).

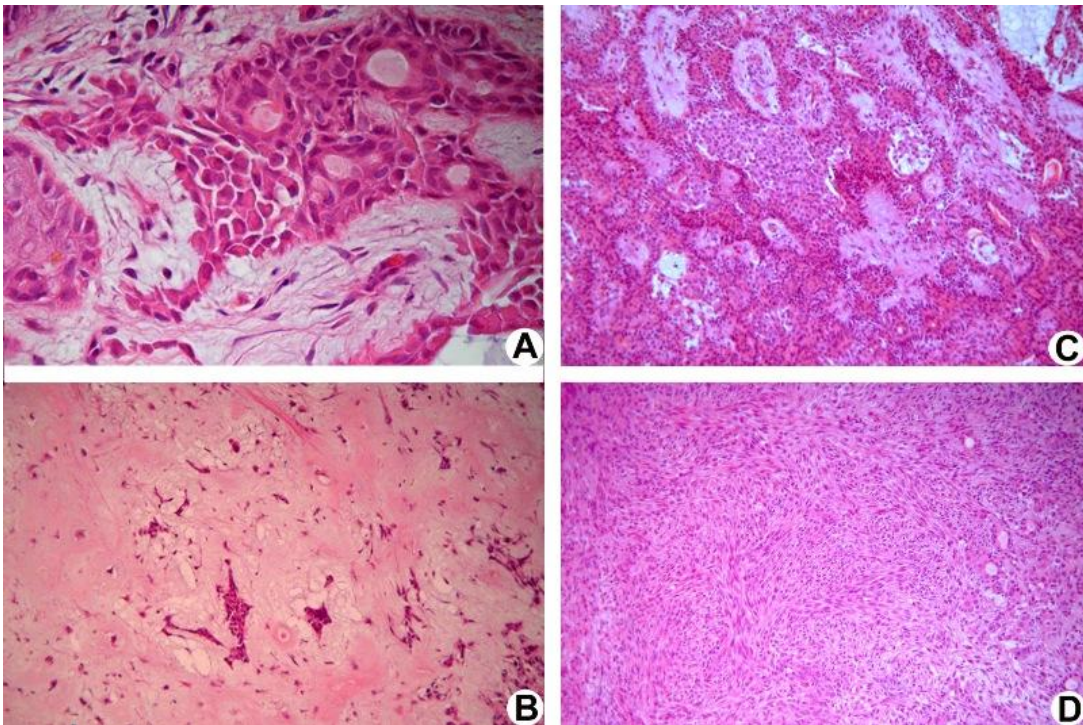


Figura 1. Subtipos histológicos de APs (Seifert *et al.*, 1976). A - tipo I. B - tipo II. C - tipo III. D - tipo IV (HE, 100 x).

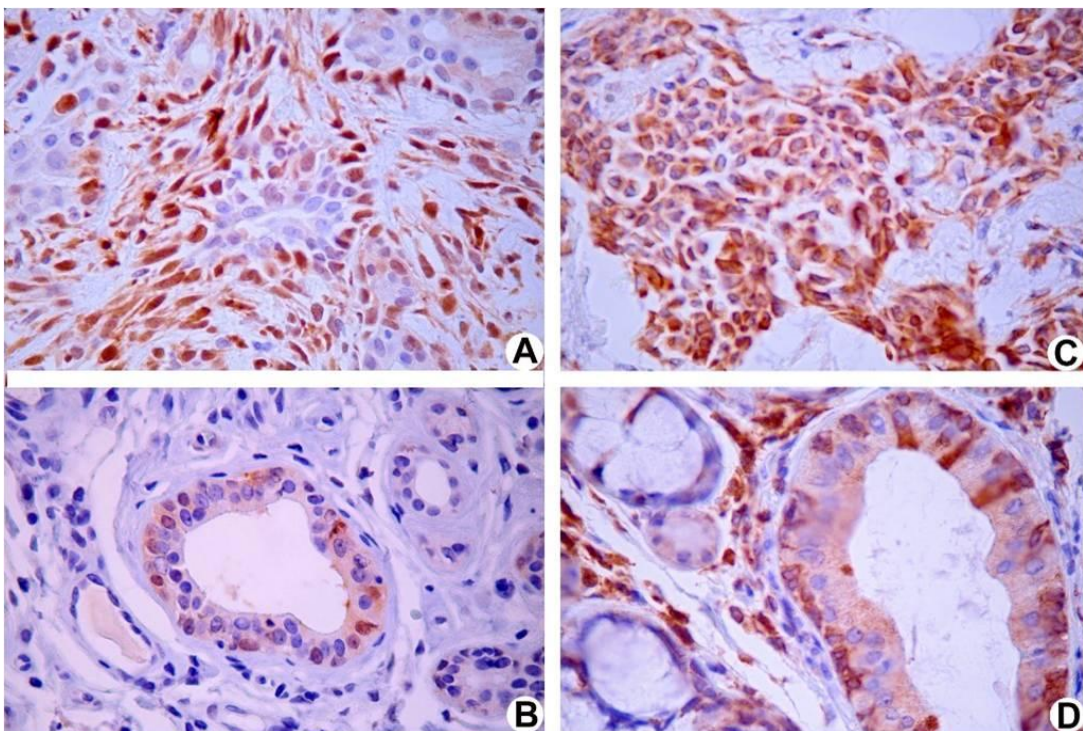


Figura 2. Imunomarcações encontradas nos casos de APs e GNs. A - MT no AP. B – MT nas GNs. C – Bcl-2 no AP. D – Bcl-2 nas GNs (marcação imunoistoquímica, 100x).

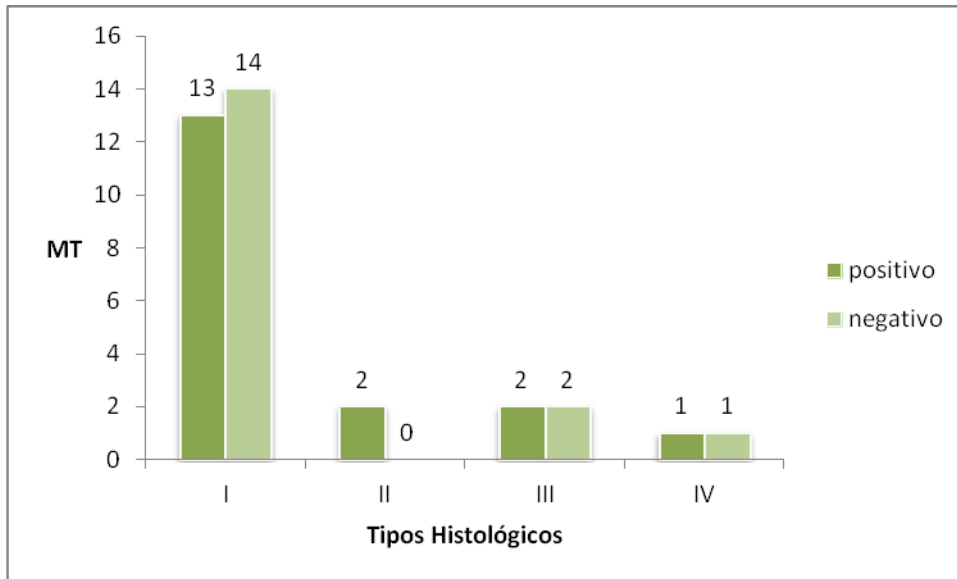


Figura 3. Distribuição da positividade para MT entre os diferentes subtipos histológicos de AP

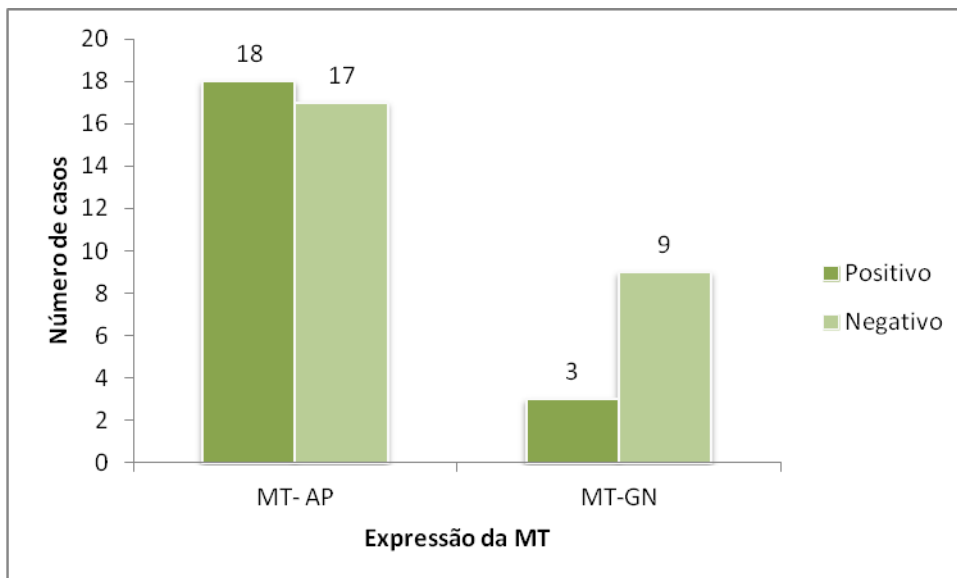


Figura 4. Positividade para MT nos APs e GNs avaliados

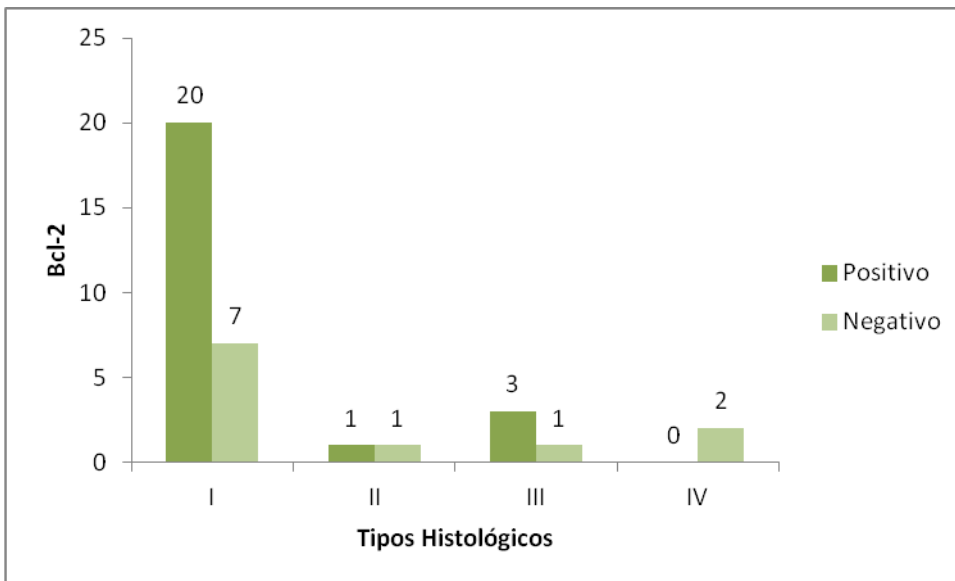


Figura 5. Distribuição da positividade para Bcl-2 entre os diferentes subtipos histológicos de AP

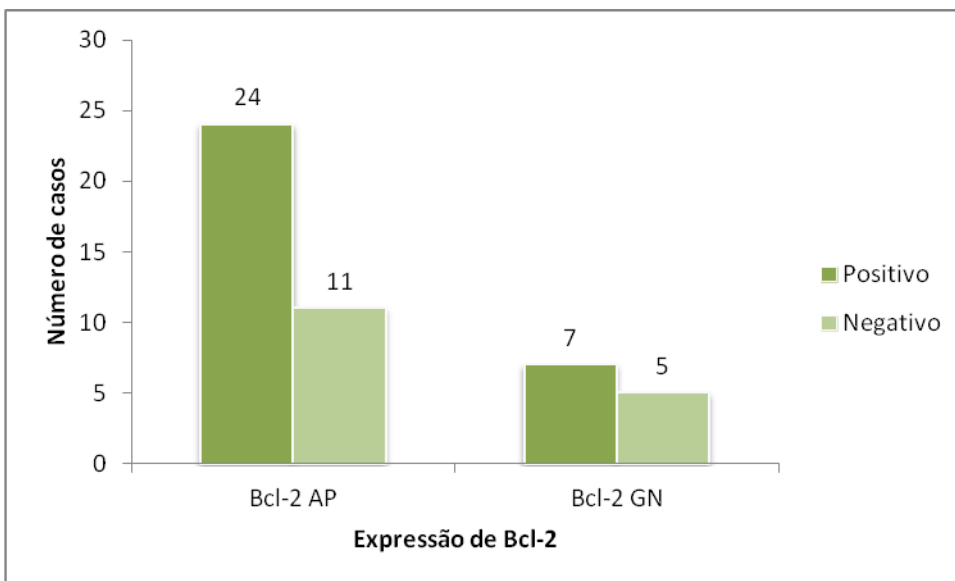


Figura 6. Positividade para MT nos APs e GNs avaliados

5.7 ARTIGO

O artigo a seguir faz parte dos resultados e discussão apresentados (artigo a ser submetido para publicação no periódico Acta Histochemica):

Title: Immunohistochemistry expression of Metallothionein in Pleomorphic Adenoma of minor salivary glands: a role in the apoptosis control?

Running title: Metallothionein in pleomorphic adenoma

Authors:

Alessandra de Castro Miranda Viana^a

Daniela Cotta Ribeiro^a

Taynara Nunes Guedes Florêncio^a

Vanessa Torres Santos^a

Maria Cássia Ferreira Aguiar^a

^a Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, Brazil

***Corresponding author**

Maria Cássia Ferreira de Aguiar, PhD

Universidade Federal de Minas Gerais - Faculdade de Odontologia

Departamento de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas

Avenida Antônio Carlos, 6627, Sala 3201, Pampulha

CEP: 31.270-901 - Belo Horizonte, MG – Brasil.

Telephone number: +55 31 34092476 - Fax number: +55 31 34092430

E-mail: cassiafa@ufmg.br

Abstract

Pleomorphic adenoma is the most common benign neoplasm of both major and minor salivary glands. The histological features are diversified and characterized by the involvement of epithelial-myoepithelial structures. Metallothionein is a cysteine rich protein present in myoepithelial cells of several benign and malignant neoplasms. Metallothionein has its function associated with DNA protection, oxidative stress and apoptosis. The purpose of this study was to evaluate the expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands. Additionally, we investigated the association of the clinicopathological features of the lesions with metallothionein, and specifically, its correlation with Bcl-2 in an attempt of evaluate the role of metallothionein in the control of apoptosis in the pleomorphic adenomas. Thirty-five cases of pleomorphic adenoma were selected and immunohistochemistry was performed for Bcl-2 and metallothionein proteins. The proteins were quantified by the QuickScore method. The sample showed epidemiological characteristics similar of those described in the literature. We did not find association between the clinicopathologic characteristics of pleomorphic adenomas and the proteins studied, but a correlation between Bcl-2 and metallothionein was demonstrated. The results suggest that metallothionein may have a role in the control of apoptosis in pleomorphic adenoma.

Keywords: pleomorphic adenoma, metallothionein, apoptosis, immunohistochemistry.

Introduction

Metallothionein (MT) is a highly conserved cysteine-rich protein that occurs in 4 isoforms. MTs I and II are the best characterized MTs and are expressed in many tissues, including normal and tumoral epithelial and mioepithelial cells of salivary glands (Sunardy-Widyaputra et al., 1995; Yamada et al., 2000; Hecht et al., 2002; Alves et al., 2007). MT shows multiple functions. These proteins are present during the differentiation of human salivary gland tissues (Hetch et al., 2002), however, their exact role in salivary gland tumors is not well known yet.

The Plemorphic Adenoma (PA) shows a relentless growing reflecting low proliferation index (Alves et al., 2002; Aoki et al., 2004). It is not known if the histological variability of the tumor is associated with its growth speed. The growth rate of a tumor depends on the balance between proliferation and loss of tumor cells. Studies have demonstrated that MT can influence tumor growth by modulating cell proliferation and death, especially apoptosis (Zhang and Takenaka., 1998; Li et al., 2003; Yamasaki et al., 2006; Nielsen et al., 2006).

Many other proteins modulate apoptosis, such as Bcl-2, a proto-oncogene that inhibits apoptosis through its protein (Abd-Elhamid and Elshafei, 2009).

In the present study we described the immunoexpression of MT in PA of salivary glands and investigated the correlation of this protein with Bcl-2. Additionally we also verified the association of MT with clinico-pathological features of the tumor and described their immunohistochemical pattern also in the normal salivary glands, associated and non associated with the tumor.

Materials and Methods

Tumor samples

Formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens from PAs of the salivary glands were selected from the files of the Oral Pathology Department of the Federal University of Minas Gerais (UFMG), Minas Gerais, Brazil. Histopathologic diagnosis was confirmed in new hematoxylin-eosin-stained sections. Thirty-five cases were included in this study and classified in 4 subtypes (Seifert et al., 1989): I, stroma accounts for 30% to 50% of the tumor; II, stroma accounts for more than 80%; III, stroma accounts for less than 30%; and IV, stroma accounts for less than 30% but is predominantly made up of a monomorphic epithelial cellular component of plasmocytoid or hyaline appearance.

Twelve samples of normal salivary glands obtained from patients undergoing surgery for fibrous hyperplasia were used as control. Ethical approval for the use of human tissue samples was obtained from the Institutional Ethics Committee.

Immunohistochemistry

Paraffin-embedded sections 3 μm thick were dewaxed in xylene and rehydrated in alcohol. Antigen retrieval was performed with boiling Tris-EDTA pH 8.0 (ethylenediamine tetraacetic acid buffer) for 30 min in a water bath at 96°C for MT. For Bcl-2, the first steps, including the antigen retrieval were substituted employing Trilogy (Cell Marque, Rocklin, CA, USA). The dilution employed was 1:100 and the retrieval was made in a steamer. Endogenous peroxidase activity was blocked with 3% H_2O_2 for 30

min. The sections were then incubated with the following primary antibodies: monoclonal mouse anti-horse MT (clone E9, DakoCytomation, USA; 1:100), monoclonal mouse Bcl-2 (clone 124, DakoCytomation, USA; 1:100), for 1 h at 37°C. The primary antibodies were detected using the LSAB (Dako, USA) for MT and Dako Advance™ HRP (Dako, USA). Reaction products were visualized with the Dako Liquid DAB+ Substrate-Chromogen System and then counterstained with hematoxylin. Negative controls were subjected to the same procedure but omitting the primary antibodies. Positive controls were adopted as recommended by primary antibody suppliers.

Evaluation of staining

The immunostaining was evaluated by two observers (Florencio and Santos) in a blinded manner without any knowledge of the clinical data. Under a light microscope, the sections were scanned at low power to select the area with the highest degree of staining, or “hotspots”, in which the positive cells were counted in 10 fields at 400x magnification (Alves et al., 2007). The cell quantification of these 10 fields was done in a unique axis (horizontal or vertical) (De Sousa et al., 2012; Gleber-Netto et al., 2012). The semi-quantitative analysis was performed employing the Quickscore method (Detre et al., 1995). The Quickscores categories were based on both the intensity and the proportion of brown staining cells. For MT the staining intensity in the cells was scored as 1, 2, or 3 corresponding to the presence of negative weak, intermediate and strong brown staining respectively (category A). The proportion of stained cells was assigned from 0 to 4 (0= negative; 1= >0-25%; 2= ≥25-50%; 3=≥50-75%, 4= ≥ 75%), and named category B. The product (A x B) was the multiplicative Quickscore. After the Quickscore

assessment MT was classified in two groups, values fo 0 to 3 were negative, and values of 4 to 12 positive (Yamasaki et al., 2006). For MT, cellular patterns of immunolocalization were also described.

For Bcl-2 we also performed the multiplicative Quickscore method with the same values for category A, and values 0= negative; 1= <20%; 2= 20-50%, 3= >50% for category B (Nikitakis et al., 2009). The Quickscore assessment was classified in two groups, values 0 to 3, negative, and values 4 to 9 positive.

Statistical analysis

Analyses were performed using SPSS software version 17.0 (SPSS, Inc., Chicago, IL/USA). Normal distribution was assessed by the Shapiro-Wilk test. Comparative analysis was performed using Fisher Exact Test. The correlation between MT and Bcl-2 were examined by the Spearman test. Differences were considered statistically significant at p-values <0.05.

Results

Clinical, histological and IHC features are summarized in table 1. Tumors were prevalent in woman (62.86%) and the mean age was 39.5 years-old. The most common affected site was the palate.

MT expression

MT was immunoexpressed in all tumors with a remarkable variation of staining intensity. MT was localized both in the cytoplasm and nucleus and frequently followed the distribution of myoepithelial (MECs) cells in the stromal and ductiform areas. In the epithelial nests presenting squamous metaplasia, only the peripheral cells were stained (Fig. 1A).

The normal glands adjacent to the tumor and the ones no associated with the lesion showed the same pattern: a strong nuclear staining of MECs surrounding the intercalated ducts (Fig. 1B), but the indices were lower than that observed in tumors. Five samples of normal salivary glands no associated with the tumor were negative for MT.

No association was found among clinico-pathological features (gender, age and site of tumor) and MT immunoexpression in PA. To verify the association of MT with histological features, tumors were divided in two groups, stroma rich PAs (type I and II), and stroma poor PAs (type III and IV) but no association was also demonstrated.

Bcl-2 expression

In PA, Bcl-2 immunoexpression was positive in 27 of 35 cases (77.14%) and the localization of Bcl-2 was cytoplasmatic in MEC cells, including myxomatous stromal and plasmocytoid cells (Fig. 1C). Peripheral cells in the ductiform areas were also positive. Normal glands adjacent to the tumor were all negative for Bcl-2, however in the normal

glands not associated with the tumor, ducts were stained, with focal basal cells presenting a strong positivity for Bcl-2 (Fig. 1D).

Correlation between MT and Bcl-2

When the Quickscore was applied, in 35 cases of PA, 18 tumors were scored as positive and 17 tumors as negative. For Bcl-2, 24 tumors were scored as positive, and 11 tumors scored as negative. There was a correlation between MT positivity and Bcl-2 expression ($p = 0.0047 < 0.05$, $r = 0.466$).

Discussion

In the present study we described the expression of MT in the cells of PA of the minor salivary glands. Since MT I and II are considered constitutively expressed in epithelial tissues (Nielsen et al., 2006; Cardoso et al., 2009; Thirumoorthy et al., 2011) positivity was considered only for tumors exhibiting indices equal or higher than 4. Taking this in consideration, 18 tumors (51.4%) were considered overexpressing MT. This number is lower than that described by Sunardhy-Widyaputra et al. (1995), but is more representative of a real rising of MT expression in the tumors.

Some studies have shown that the subcellular distribution of MT may be related to its function (Chan and Cherian, 1993; Coyle et al., 2002; Cherian et al., 2003). The localization of MT in the cells of PA was nuclear and cytoplasmatic. There were 4 tumors with predominant cytoplasmic MT localization and 6 tumors with nuclear restricted localization.

MT immunoexpression was not associated with any clinical or histological features of the tumor. Some authors have showed that stroma-rich PAs are significantly larger than others (Cesinaro et al., 1994; Alves et al., 2002;), although others have found contradictory results (Chau and Raden, 1989). In our series, most of the tumors were stroma rich (subtypes I and II). We did not find different expressions of MT or Bcl-2 among the different histological subtypes that justify differences in the growth of these variants.

Positivity for MT was striking in cells that are attributed a mioepithelial differentiation. There is increasing evidence that the myoepithelial cells play a key role in the organizational development of the glandular tissues, and that the change of myoepithelial cell function is a key step in the development of the tumors (Adriance et al., 2005). Although the biologic significance of MT in MEC of glandular tissues is not yet clearly understood, MT may be necessary for the growth and differentiation of these actively growing cells. In these case, MT serve as an intracellular zinc storage, a important element necessary for the synthesis and metabolism of proteins during an increased cellular metabolism (Sunardhi-Wydiaputra et al., 1995).

Notwithstanding, MT presents other multiple functions, including the control of cell proliferation and death, especially apoptosis (Zhang and Takenaka, 1998; Li et al., 2003; Yamasaki et al., 2006; Nielsen et al., 2006). AP are featured by a slow growth with low proliferative index (Lazzaro and Cleveland, 2000), however, very little is know about the control of apoptosis in this lesion.

PLGA1 and PLGA2 (Pleomorphic adenoma gene product), a transcription factor with zinc finger domains, is upregulated in PA and can inhibit apoptosis (Declercq et al., 2003). PLGA1 immunoreactive cells in PA also express Bcl-2. The mechanisms through

which PGLA1 and PGLA2 may be involved in anti-apoptosis are not known yet, but might be controlled by MT through its zinc storage control.

Sixty-eight percent of PA were positive for Bcl-2, protein that promotes cell survival in slowly growing tumors (Yin et al., 2000). In this study we demonstrated correlation between MT and Bcl-2 which suggest that MT take part in the control of apoptosis in AP of salivary glands. Many other studies have reported associations of apoptosis and the expression of MT in variable diseases (Zhang and Takenaka, 1998; Li et al., 2003, Helal et al., 2009; Mc Gee et al., 2010).

Experiments with neurons have demonstrated that MT was capable of reduce a Bcl-2 dependent pathway of apoptosis (Mc Gee et al., 2010), however MT can interact with a range of other molecular pathways that directly or indirectly regulate the apoptotic cascade (Nielsen et al., 2006). So, expansions of the present study searching an association of MT with other key apoptotic proteins remain to be clarified.

Acknowledgments

Funding was provided by the Research Foundation of the State of Minas Gerais (FAPEMIG- CDS APQ-1580) and the National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) (512/2011) and from the Pró-Reitoria da Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais. Dr. Aguiar and is research fellow of CNPq.

References

- Abd-Elhamid ES, Elshafei MM. Immunohistochemical localization of mdm-2, p27Kip1 and bcl-2 in Warthins tumor of the parotid gland. *Diagn Pathol* 2009;4:14.
- Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissel MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res* 2005;7:190-7.
- Alves SM, Cardoso SV, De Fátima Bernardes V, Machado VC, Mesquita RA, Vieira Do Carmo MA. Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Oral oncology* 2007;43:252-6.
- Alves FA, Perez DE, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. Pleomorphic adenoma of submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical feateure of 60 cases in Brazil. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;28:1400-3.
- 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;40:954-9.
- Cardoso SV, Silveira-Júnior J, De Carvalho Machado V, De-Paula A, Loyola AM, Aguiar MCF, et al. Expression of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29:1189-93.
- Cesinaro AM, Crisculol M, Collina G, et al. Salivary gland tumors: revision of 391 cases according to the new WHO classification. *Pathologica* 1994;86:602-5.
- Chan HM, Cherian MG. Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats. *Biochem Cell Biol* 1993;71:1330-40.
- Chau MNY, RADDEN BG. Intra-oral Salivary Gland neoplasms: a Retrospective Study of 98 Cases. *J. Oral Pathol* 1986;15:339-42.

- Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogens. *Mutation Research* 2003;533:201-9.
- Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Cellular and Molecular Life Sciences Metallothionein: The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci* 2002;59:627-47.
- Declercq J, Hensen K, Van De Ven WJ, Chavez M. PLAG proteins: how they influence apoptosis and cell proliferation. *Ann N Y Acad Sci* 2003;1010:264.
- Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol* 1995;48:876-78.
- De Sousa SF, Gleber-Netto FO, de Oliveira-Neto HH, Batista AC, Nogueira Guimarães Abreu MH, de Aguiar MC. Lymphangiogenesis and Podoplanin Expression in Oral Squamous Cell Carcinoma and the Associated Lymph Nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2012 Apr 10. [Epub ahead of print] PMID:22495364
- Gleber-Netto FO, Florêncio TN, de Sousa SF, Abreu MH, Mendonça EF, Aguiar MC. Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *J Oral Pathol Med* 2012; doi: 10.1111/j.1600-0714.2012.01153.x.
- Hecht D, Jung D, Prabhu VV, Munson PJ, Hoffman MP, Kleinman HK. Metallothionein promotes laminin-1-induced acinar differentiation in vitro and reduces tumor growth in vivo. *Cancer Res* 2002;62:5370-4.
- Helal GK, Aleisa AM, Helal OK, Al-Rejaie SS, Al-Yahya AA, Al-Majed AA, Al-Shabanah OA. Metallothionein induction reduces caspase-3 activity and TNFalpha levels with preservation of cognitive function and intact hippocampal neurons in carmustine-treated rats. *Oxid Med Cell Longev* 2009;2:26-35.

- Lazzaro B, Cleveland D. p53 and Ki-67 expression in small oral biopsy specimens of salivary gland tumors. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol, Oral Radiol, Oral Endod* 2000;89:613-17.
- Li Y, Wo JM, Cai L, Zhou Z, Rosenbaum D, Mendez C, et al. Association of metallothionein expression and lack of apoptosis with progression of carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Exp Biol Med* 2003;228:286-92.
- McGee HM, Woods GM, Bennett B, Chung RS. The two faces of metallothionein in carcinogenesis: photoprotection against UVR-induced cancer and promotion of tumour survival. *Photochemical and Photobiological Sciences* 2010;9:586-96.
- Nielsen AE, Bohr A, Penkowa M. The balance between life and death of cells: Roles of Metallothioneins. *Biomarker Insights* 2007;2:99-111
- 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.
- Seifert G, Langrock I, Donath. Pathomorphologische SubKlassifikation der pleomorphen Speicheldrusenadenome. *HNO* 1976; 24:415-26.
- Sunardhi-Widyaputra S, Van Den Oord J, Van Houdt K, Deley M, Van Damme B. Identification of metallothionein and parathyroid hormone-related peptide (PTHrp)-positive cells in salivary gland tumor. *Pathol Res Pract* 1995;191:1092-8.
- Thirumoorthy N, Shyam Sunder A, Manisenthil Kumar K, Senthil Kumar M, Ganesh G, Chatterjee M. A review of metallothionein isoforms and their role in pathophysiology. *World J Surg Oncol* 2011;9:54.

Yamasaki Y, Smith C, Weisz D, Van Huizen I, Xuan J, Moussa M, et al. Metallothionein expression as prognostic factor for transitional cell carcinoma of bladder. *Urology* 2006;67:530-5.

Yin HF, Okada N, Takagi M. Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. *Pathol Int* 2000;50:603-9.

Zhang XH, Takenaka I. Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal cell carcinoma. *Br J Urol* 1998;8:9-13.

Table:**TABLE 1: Histological, clinical, and IHC data from 35 pleomorphic adenomas of the salivary glands**

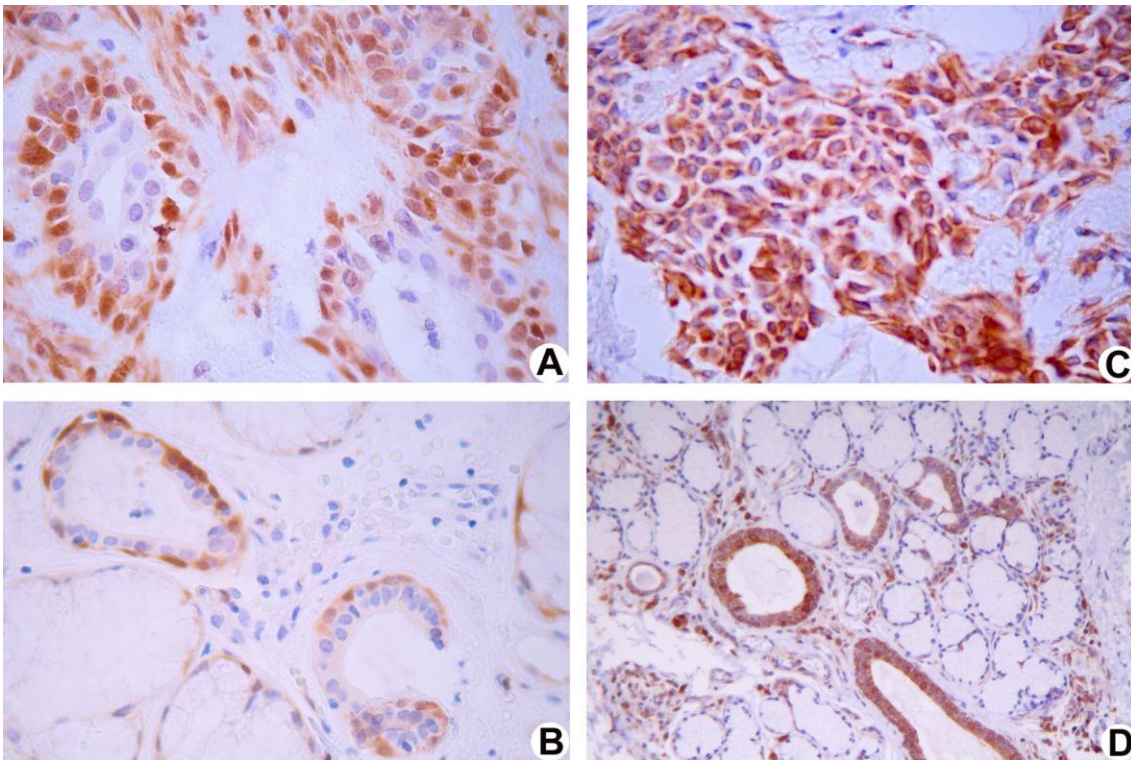
Case	Histological Subtype	Sex	Age (years)	Affected site	MT staining index	Bcl-2 staining index
1	I	Female	19	Lip	2	1
2	I	Female	16	Palate	4	6
3	I	Female	55	Palate	0	9
4	I	Male	25	Palate	2	9
5	I	Male	31	Palate	6	9
6	I	Female	40	Palate	4	4
7	I	Female	86	Palate	2	1
8	I	Female	54	Palate	12	9
9	I	Female	30	Palate	1	9
10	III	Male	22	Palate	1	9
11	I	Female	55	Floor of the mouth	1	3
12	IV	Female	34	Palate	9	0
13	III	Female	0	Palate	1	0
14	I	Male	49	Floor of the mouth	4	9
15	I	Female	34	Palate	9	9
16	I	Male	56	Palate	0	0
17	I	Female	28	Palate	3	6
18	I	Female	36	Palate	2	6
19	III	Male	29	Palate	6	9
20	I	Female	19	Palate	9	9
21	I	Male	35	Palate	9	9
22	I	Male	20	Palate	2	0
23	II	Female	78	Palate	4	0
24	I	Female	27	Palate	4	4
25	I	Female	76	Palate	9	9
26	I	Male	0	Palate	2	0
27	I	Female	67	Palate	9	9
28	I	Female	49	Palate	2	6
29	I	Male	38	Palate	1	0
30	I	Female	59	Palate	4	9
31	I	Male	34	Palate	8	9
32	I	Male	23	Palate	1	4
33	IV	Female	28	Bucal mucosa	1	0
34	III	Male	26	Bucal mucosa	9	6
35	II	Female	26	Bucal mucosa	12	9

Figure legends:

Figure 1 – Immunohistochemical findings in samples of pleomorphic adenomas. **A** – MT expression in the tumor (Immunohistochemical stain, original magnification x100). **B** – MT expression in the normal salivary glands (Immunohistochemical stain, original magnification x100). **C** – Bcl-2 expression in the tumor (Immunohistochemical stain, original magnification x100). **D** – Bcl-2 expression in the normal salivary glands (Immunohistochemical stain, original magnification x100).

Figures:

Figure 1:



6.DISSCUSSÃO

O AP é a neoplasia benigna mais frequente tanto em glândulas salivares maiores quanto menores. Esta neoplasia apresenta crescimento lento, que pode se estender por anos, especialmente nas glândulas salivares maiores, levando ao desenvolvimento de grandes lesões (Eveson & Cawson, 1985). O crescimento das neoplasias depende, entre outros fatores, de um equilíbrio entre proliferação e morte celular (Fenech, 2002). No caso do AP, sabe-se que o crescimento lento está associado a baixos índices proliferativos (Alves *et al.*, 2002), entretanto, até o momento, o papel da apoptose neste comportamento não foi totalmente esclarecido.

Neste trabalho, procurou-se investigar a expressão da MT em uma amostra de APs de glândula salivar menor, buscando a sua associação com características clínico-patológicas das lesões, e em especial, sua correlação com Bcl-2, em uma tentativa de averiguar o papel da MT no controle da apoptose nos APs. Apesar de trabalhos mostrarem a expressão da MT em neoplasias glandulares, o papel desta proteína nestas lesões ainda carece de investigações.

Este estudo foi realizado com 35 casos de AP de glândulas salivares menores. Os dados clínicos foram obtidos a partir da ficha de biópsia do arquivo do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial (LPB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Nossos resultados mostraram maior frequência da lesão no sexo feminino, corroborando com outros estudos (Chidzonga, 1995; Loyola *et al.*, 1995). Os pacientes apresentaram idades mais precoces que aquelas relatadas na literatura; apesar da maioria das lesões ter ocorrido após os 30 anos, foi na 3ª década de vida que se encontrou maior número de casos (10 casos). Loyola *et al.* (1995) relatam que os APs apresentam dois picos de incidência, sendo mais comum por volta

da 3ª década de vida e outra acima dos 50 anos de idade; enquanto Nardone *et al.* (2002) afirmam que o mais comum é que ocorra acima de 40 anos.

O palato foi a localização mais comum, estando de acordo com os relatos prévios da literatura, que indicam o palato como o principal sítio anatômico para os APs de glândulas salivares menores (Loyola *et al.*, 1995; Toida *et al.*, 2005). Depois do palato, as localizações mais comuns encontradas foram mucosa jugal, soalho bucal e lábio, diferentes de outros estudos que depois do palato, indicam lábio superior e mucosa jugal como locais de maior ocorrência do AP (Eveson *et al.*, 2005; Pires *et al.*, 2007).

O AP é um tumor de grande diversidade histopatológica. Em nossos casos observamos células epiteliais e mioepiteliais tipicamente dispostas em lençóis, cordões, ninhos e nas estruturas ductiformes. Áreas de diferenciação escamosa também foram visíveis. Além disso, alguns tumores eram delimitados por uma cápsula fibrosa, geralmente delgada e incompleta. Para Souza *et al.* (1994) a variabilidade morfológica exibida pelos tumores de glândulas salivares é atribuída à célula mioepitelial, pois as neoplasias de pâncreas, não demonstram tal variação morfológica por não apresentar este tipo de célula. Embora não seja considerada a célula de origem de todos os tumores de glândulas salivares, acredita-se na importância da célula mioepitelial na constituição e crescimento de vários tumores epiteliais salivares (Takai *et al.*, 1995; Alos *et al.*, 1996).

A classificação do AP em quatro diferentes subtipos foi proposta por Seifert *et al.* (1976). De acordo com estes autores e com outros, os diferentes subtipos refletem a participação da célula mioepitelial. Em geral, APs de glândula menor tendem a ser mais celularizados, pobres em estroma. Estas observações foram confirmadas por nossos

resultados, sendo o subtipo clássico (tipo I) o mais encontrado, diferentemente do estudo de Chau & Radden. (1989), que encontraram maior prevalência de casos do tipo III (celularizado). Estes autores estudaram a relação entre os tipos histológicos de APs e lesões não encapsuladas, não encontrando, contudo, diferenças significativas entre elas. Quando são considerados os APs de glândula salivar maior, alguns estudos mostram que o tipo mixóide é o mais comumente encontrado, seguido do celular e clássico (Seifert *et al.*, 1976; Stennert *et al.*, 2009). Estas diferenças podem ser explicadas pelo fato de nossa amostra constar de casos localizados em glândulas salivares menores, onde as lesões tendem a ser mais celularizadas, enquanto que os APs que ocorrem em glândula salivar maior comumente são ricos em estroma. Outros autores sugerem que os APs são altamente celularizados nos estágios iniciais de seu desenvolvimento (Naeim *et al.*, 1976). É válido lembrar que maior parte de nossa amostra vem de biópsia incisional, podendo não representar a maior parte da lesão.

A expressão imunoistoquímica da MT já foi descrita no AP e em outras neoplasias de glândula salivar (Sunadardhi-Widyaputra *et al.*, 1995). No presente trabalho, a imunoexpressão para MT foi avaliada tanto em glândulas normais quanto nas lesões tumorais. Nas glândulas salivares normais, encontramos tanto casos imunorreativos para a MT, quanto não reativos. Nos casos com imunoexpressão, a MT foi observada nos ductos excretores com marcação predominantemente citoplasmática, sendo que as células basais apresentaram também marcação nuclear. Nos ductos intercalados, houve marcação apenas nas células mioepiteliais, tanto nuclear quanto citoplasmática, porém não houve marcação nas células mioepiteliais que circundam os ácinos.

Trabalhos mostraram que a MT é um ótimo marcador de células mioepiteliais de glândulas mamárias normais (Haerslev *et al.*, 1994; Jin *et al.*, 2001). De maneira semelhante, também foi encontrada marcação das células mioepiteliais pela MT em glândulas salivares normais (Van den Oord, 1993; Muramatsu *et al.*, 2000). Porém Shrestha *et al.* (1996), detectaram marcação da MT em células mioepiteliais de tumores, mas não em células mioepiteliais de glândulas salivares normais. In vitro, a MT foi relacionada à maturação de células acinares de glândulas salivares (Hecht *et al.*, 2002). A superexpressão do gene MT-I em células da linhagem de glândulas salivares leva a uma diferenciação morfológica dessas células, aumentando o tamanho do ácino formado (Hecht *et al.*, 2002).

Nos APs do nosso estudo, foram observados diferentes padrões de marcação para a MT, semelhantes àqueles descritos por Muramatsu *et al.* (2000). A marcação em “mosaico”, que denota diferenças na intensidade de marcação entre as células de uma mesma área, pode ser devido a características fenotípicas das células (Cardoso *et al.*, 2002). No AP, pode-se supor que essa heterogeneidade de marcação possa estar relacionada com o grau de diferenciação das células mioepiteliais, pois as células mioepiteliais que formam a camada externa de ductos apresentaram intensa marcação. A maioria dos tumores apresentou marcação simultânea da MT no citoplasma e núcleo. Os tumores do tipo I exibiram, em geral, forte marcação nuclear. A localização da MT na célula pode estar relacionada à suas funções fisiológicas.

Trabalhos mostram que a MT é localizada principalmente no citoplasma, mas pode ser transferida para o núcleo durante a proliferação e diferenciação celular (Tsujikawa *et al.*, 1994). No núcleo, confere proteção contra o estresse oxidativo e danos ao DNA, afeta a regulação genômica de outras proteínas ligadas ao DNA,

podendo regular o suprimento de Zn para enzimas e fatores de transcrição envolvidos na divisão celular (Chubatsu & Meneghini, 1993; Coyle *et al.*, 2002; Cherian *et al.*, 2003). A localização citoplasmática da MT exerce efeito supressor dos danos oxidativos da citotoxicidade dos metais pesados, enquanto sua localização nuclear não mostrou esses efeitos supressores. Já a MT nuclear mostrou proteção contra danos no DNA causados por radiação ultravioleta e peróxido de hidrogênio, no entanto, outros estudos mostraram efeitos antiapoptóticos da MT quando localizada no núcleo (Abdel-Mageed & Agrawal, 1998). *In vitro*, já foi demonstrado que durante o estágio inicial de diferenciação de miotúbulos, a MT é translocada para o núcleo e quando esses se diferenciam completamente, o conteúdo de MT diminuiu, sendo localizada no citoplasma. Tais mudanças na localização subcelular dos miotúbulos foram acompanhadas pelo aumento da apoptose nos mesmos (Apostolova *et al.*, 1999).

Para todas as avaliações de associação, foram estabelecidos índices de marcação, tanto para a MT quanto para a Bcl-2 pelo método semi-quantitativo *Quickscore* (Detre *et al.*, 1995), que avalia intensidade e proporção de células marcadas e estabelece um índice final multiplicativo. Este método tem sido usado como um método eficaz e rápido para avaliar outros tipos tumorais (Detre *et al.*, 1995; McClugage *et al.*, 1999; Yamasaki *et al.*, 2006). Como a MT é constitutivamente expressa em epitélio, consideramos como positividade apenas os casos em que o índice final foi maior que 4. Em todas as avaliações não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes.

A Bcl-2 é uma proteína que inibe diretamente a apoptose bloqueando as Caspases, e indiretamente impedindo a liberação de citocromo C (Mignotte & Vayssiere, 1998). Em tumores de glândulas salivares, já foi demonstrado que a

superexpressão de Bcl-2 leva a uma inibição da apoptose (Jia *et al.*, 2004) e que no caso de APs, há uma maior expressão dessa proteína nas células mioepiteliais (Aoki *et al.*, 2004). No carcinoma mucoepidermóide, foi mostrado que nos padrões císticos ou sólidos, a Bcl-2 foi fortemente positiva na periferia dos ninhos tumorais (Yin, Okada, Takagi, 2000).

No presente estudo, a expressão imunohistoquímica de Bcl-2, foi avaliada nos casos de APs e nas glândulas salivares normais. A maioria dos tumores foram positivos à essa proteína. Os ductos presentes exibiram marcação citoplasmática forte e contínua das células basais e mioepiteliais, enquanto nas células ductais luminiais observou-se uma marcação mais fraca e descontínua. Não houve expressão de Bcl-2 nas glândulas normais adjacentes ao tumor, mas o infiltrado inflamatório circundante corou-se positivamente.

Em glândulas salivares normais presentes nos casos de hiperplasia, a positividade para Bcl-2 foi evidenciada nos ductos e não houve expressão nos ácinos. Frequentemente todo o ducto apresentou marcação, sendo que as células basais tiveram expressão mais forte e contínua. Algumas células exibiram uma marcação citoplasmática mais intensa. Houve marcação de algumas células mioepiteliais que circundam os ácinos.

Nenhuma associação foi encontrada entre a expressão da Bcl-2 e as características clinicopatológicas, porém encontramos uma correlação entre a expressão da MT e Bcl-2.

Os papéis das MTs em processos fisiopatológicos levaram a muitos estudos de sua expressão em tumores (Zhang *et al.*, 1998; Miles *et al.*, 2000; Cherian *et al.*, 2003; Theocharis *et al.*, 2003; Kennette *et al.*, 2005; 2006; Qu *et al.*, 2006). Alguns trabalhos

mostraram correlação inversa entre a expressão da MT e a apoptose em neoplasias malignas (Sundelin *et al.*, 1997; Deng *et al.*, 1998; Jayasurya *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2003). A MT-II foi uma das proteínas relacionadas ao gene supressor de tumor, gene 2 relacionado com o câncer de esôfago (ECRG2). Os resultados do estudo mostraram que células transfectadas apenas com o gene ECRG2 tem inibido a proliferação celular e estimulado a apoptose. A transfecção da MT-II promove a proliferação celular e inibe a apoptose (Cui *et al.*, 2003). No entanto, outros estudos revelaram correlação positiva (Zhang & Takenaka, 1998; Dziegiel *et al.*, 2004; Dumańska *et al.*, 2004) e um estudo não mostrou correlação (Jin *et al.*, 2002). Com relação a apoptose, não há ainda certeza sobre a forma pela qual a MT atua, mas há sugestões de que isso ocorra via Bcl-2 (Shimoda *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2009).

A correlação encontrada entre a expressão de Bcl-2 e MT sugere que a MT possa proteger as células neoplásicas da apoptose, permitindo a sua sobrevivência e o crescimento tumoral, ainda que em ritmo lento. Por outro lado, a prevenção da apoptose pode permitir a perpetuação e surgimento de erros genéticos que poderiam predispor ao desenvolvimento da malignidade nos APs (Yañez *et al.*, 1999). Este é um aspecto que permanece para ser investigado.

Esta simples correlação não nos permite fazer inferências sobre associações entre MT e Bcl-2, podendo ser apenas casual. Poderíamos, supor que a MT está interferindo na apoptose via Bcl-2, mas há outras proteínas relacionadas à apoptose que podem ser influenciadas pela MT e que não foram analisadas neste trabalho. Apesar desta limitação, os papéis da MT na apoptose são bem descritos: **1-** regulação da concentração de zinco celular, estimulando o fator de transcrição antiapoptótico zinco dependente, o fator nuclear Kappa B (NF- κ B) (Abdel-Mageed & Agrawal, 1998); e

2- interagindo com proteínas envolvidas com a apoptose, podendo inibi-la através da indução de oncogenes antiapoptóticos (Bcl-2 e c-myc), ou por inibição de proteínas supressoras tumorais proapoptóticas (caspase-1 e -3) ou a liberação do citocromo c (Shimoda *et al.*, 2003; Pedersen *et al.*, 2009).

Estudos apontam maior participação da MT III na inibição da apoptose em neurônios (Ma *et al.*, 2011; Kim *et al.*, 2003), no entanto, também foi mostrado a influência das MT I e II na prevenção da morte neuronal (Amborjn *et al.*, 2008). Se por um lado a MT leva à resistência à apoptose, esta proteína, como reservatório de zinco também pode induzir proliferação celular nestes tumores, uma vez que este elemento é necessário para a síntese e metabolismo de proteínas e ácidos nucleicos. Superexpressão de MT têm sido relatados tanto em tecidos que proliferam rapidamente como no caso de neoplasias, quanto em células em processo de regeneração (Moffatt & Denizau, 1997; Cardoso *et al.*, 2002; Cardoso *et al.*, 2009).

Assim, os resultados deste trabalho sugerem que a expressão da MT no AP possa ter, entre outras funções, um papel no controle da apoptose. Se este papel se mantêm em neoplasias de glândulas maiores, e se pode se influenciado pela participação da célula mioepitelial nos diferentes subtipos histológicos de AP, não pudemos confirmar com a amostra avaliada. Além da análise de maior número de casos, seria interessante a investigação da correlação da MT com outras proteínas que possam estar envolvidas na apoptose e ou na proliferação celular.

7. CONCLUSÕES

- 1- A MT foi expressa em todos os APs analisados, e com maior intensidade nas células mioepiteliais que formam a camada externa de ductos. Glândulas adjacentes ao tumor também mostraram imunorreatividade.
- 2- Bcl-2 foi expressa na maioria dos APs e não houve expressão de Bcl-2 nas glândulas normais adjacentes ao tumor.
- 3- A maior parte da nossa amostra foi composta por tumores clássicos (tipo I), e as proteínas MT e Bcl-2 não apresentaram associação com os subtipos histológicos, nem com as características clínicas do AP.
- 4- Nas glândulas salivares normais, a MT foi expressa com imunorreatividade variável. Já na Bcl-2, a positividade foi evidenciada na maioria dos casos.
- 5- Houve correlação entre a expressão imunoistoquímica de MT e Bcl-2, sugerindo um papel para a MT no controle da apoptose no AP de glândula salivar.

|

8. REFERÊNCIAS

1. Abdel-Magded AB, Agrawal KC. Activation of nuclear factor K β : Potential role in metallothionein-mediated mitogenic response. *Cancer Res.* 1998;58:2335-8.
2. Adriance MC, Inman JL, Petersen OW, Bissel MJ. Myoepithelial cells: good fences make good neighbors. *Breast Cancer Res.* 2005;7:190-7
3. Alos L, Cardesa A, Bombi J, *et al.* Myoepithelial tumors of salivary glands: a clinicopathologic, immunohistochemical, ultrastructural and flow-cytometric study. *Semin Diagn Pathol.* 1996;13:13-47
4. Apostolova MD, Ivanova IA, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis during differentiation of myoblasts to myotubes: protection against free radical toxicity. *Toxicol. Appl. Pharm.* 1999;159(3):175-84.
5. Aschner M, West AK. The role of MT in neurological disorders. *J. Alzheimers Dis.* 2005;8:139-45.
6. Alves FA, Perez DE, Almeida OP, Lopes MA, Kowalski LP. Pleomorphic adenoma of submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002;128(12):1400-3.
7. Alves SM, Cardoso SV, De Fátima Bernardes V, Machado VC, Mesquita RA, Vieira Do Carmo MA. Metallothionein immunostaining in adenoid cystic carcinomas of the salivary glands. *Oral oncology.* 2007;43(3):252-6.
8. Ambjorn M, Asmussen JW, Lindstam M, Gotfryd K, Jacobsen C, Kiselyov VV, Moestrup SK, Penkowa M, Bock E, Berezin V. Metallothionein and a peptide modeled after metallothionein, EmtinB, induce neuronal differentiation and survival through binding to receptors of the low-density lipoprotein receptor family. *J. Neurochem.* 2008;104:21-37.

9. Aoki T, Tsukinoki K, Karakida K, Ota Y, Otsuru M, Kaneko A. Expression of cyclooxygenase-2, Bcl-2 and Ki-67 in pleomorphic adenoma with special reference to tumor proliferation and apoptosis. *Oral Oncol.* 2004;40(9):954-9.
10. Araújo VC, *et al.* Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Appl. Immunol.* 2000;8:195-202.
11. Aschner M, West AK. The role of MT in neurological disorders. *J. Alzheimers Dis.* 2005;8:139-45.
12. Asmussen JW, Ambjorn M, Bock E, Berezin V. Peptides modeled after the alpha-domain of metallothionein induce neurite outgrowth and promote survival of cerebellar granule neurons. *Eur. J. Cell Biol.* 2009;88:433-43.
13. Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press. 2005;221-4.
14. Barsky SH. Myoepithelial mRNA expression profiling reveals a common tumor-suppressor phenotype. *Exp Mol Pathol.* 2003;74:113-122.
15. Broughton BR, Reutens DC, Sobey CG. Apoptotic mechanisms after cerebral ischemia. *Stroke.* 2009;40(5):331-9.
16. Cai L, Wang Y, Zhou G, Chen T, Song Y, Li X, *et al.* Attenuation by metallothionein of early cardiac cell death via suppression of mitochondrial oxidative stress results in a prevention of diabetic cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2006;48(8):1688-97.

17. Cardoso SV, Barbosa HM, Candellori IM, Loyola AM, Aguiar MCF. Prognostic impact of metallothionein on oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2002; 441(2):174-8.
18. Cardoso SV, Silveira-júnior J, De Carvalho Machado V, De-Paula A, Loyola AM, Aguiar MCF, *et al.* Expression of metallothionein and p53 antigens are correlated in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2009;29(4):1189-93.
19. Chan HM, Cherian MG. Ontogenic changes in hepatic metallothionein isoforms in prenatal and newborn rats. *Biochem Cell Biol.* 1993;71(3-4):1330-40.
20. Chau MNY, Radden BG. Intra-oral Salivary Gland neoplasms: a Retrospective Study of 98 Cases. *J. Oral Pathol.* 1986;15:339-42.
21. Chauvin P, Cherian MG, Wysocki G, Pringle G. A comparison of metallothionein expression in human normal and neoplastic salivary gland tissue using immunohistochemistry. *Toxicologist.* 1992;12:379.
22. Cherian MG, Kang Y. Metallothionein and liver cell regeneration. *Exp 1269 Biol Med.* 2006;231(2):138-44.
23. Cherian MG, Jayasurya A, Bay BH. Metallothioneins in human tumors and potential roles in carcinogens. *Mutation Research.* 2003;533:201-9.
24. Chidzonga MM, Perez VML, Alavarez ALP. Pleomorphic adenoma of the salivary glands. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79(6):747-9.
25. Coyle P, Philcox JC, Carey LC, Rofe AM. Cellular and Molecular Life Sciences Metallothionein : The multipurpose protein. *Cell Mol Life Sci.* 2002;59:627-47.
26. Cusimano EM, Knight AR, Slusser JG, Clancy RL, Pierce JD. Mitochondria: the hemi of the cell. 2009;31(1):54-62.

27. Dardick I. Salivary gland tumor pathology 1996 Tokyo: IGAKU-SHOIN Medical Publishers.
28. Davis SR, Cousins RJ. Recent Advances in Nutritional Sciences Metallothionein Expression in Animals: A Physiological Perspective on Function. 2000;1(21):1085-8.
29. Deng DX, Chakrabarti S, Waalkes MP, Cherian MG. Metallothionein and apoptosis in primary human hepatocellular carcinoma and metastatic adenocarcinoma. *Histopathology*. 1998;32(4):340-7.
30. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995;48(9):876-8.
31. Dziegieł P. Expression of metallothioneins in tumor cells. *Polish Journal of Pathology*. 2004;55(1):3-12.
32. Dumańska M, Dziegieł P, Sopol M, Wojnar A, Zabel M. Evaluation of apoptosis, proliferation intensity and metallothionein (MT) expression in comparison with selected clinicopathological variables in primary adenocarcinomas of the large intestine. *Folia Morphol*. 2004;63(10):107-10.
33. Dutsch-Wicherek M, Sikora J, Tomaszewska R. The possible biological role of metallothionein in apoptosis. *Frontiers in Bioscience*. 2008;13:4029-38.
34. Ebadi M, Leushen MP, El-Rafaey H, Hamada FM, Rojas P. The antioxidant properties of zinc and metallothionein. *Neurochem. Int*. 1996;29(2).
35. Ellis GL, Auclair P. Tumors of Salivary Glands, in Armed Forces Institute of Pathology, *Atlas of Tumor Pathology* 1996;155-373.

36. Eveson J, Cawson R. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary glands: a demographic study of 336 cases. *J Oral Pathol.* 1985;14(6):500-9.
37. Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR, El-Naggar AK. Tumours of the salivary glands: introduction. In *Pathology & Genetics Head and Neck Tumours*. Edited by Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. Lyon: IARC Press. 2005:212-15.
38. Fenech M. Biomarkers of genetic damage for cancer epidemiology. *Toxicology.* 2002;181-182:411-16.
39. Filho GB, Pereira FE, Guimarães RC. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular In: *Bogliolo Patologia. Geraldo Brasileiro Filho. 7.ed.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.
40. Fisher EH, Davie EW. Recent excitement regarding metallothionein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95(7):3333-4.
41. Fordice J, Kershaw W, El-Naggar A, Goepfert H. Adenoid Cystic Carcinoma of the Head and Neck Predictors of Morbidity and Mortality. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999;125:149-52.
42. Fujita S, Shibata Y, Takahashi H, Tsuda N. Apoptosis-induced and suppressed cells in salivary gland adenoid cystic carcinoma: correlation with histological growth patterns. *Oral Diseases.* 1999;5:117-22.
43. Furuse C, Souza SCOM, Nunes FD, Magalhães MHG, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol.* 2005;13:57-65.
44. Gallicchio LM, Flaws JA, Fowler BE, Ioffe OB. Metallothionein expression in invasive and in situ breast carcinomas. *Cancer Detect Prev.* 2005;29(4):332-7.

45. Gallo O, Franchi A, Bianchi S, Boddi v, Giannelli E, Alajmo E. p53 oncoprotein expression in parotid gland carcinoma is associated with clinical outcome. *Cancer* 1995;75:2037-44.
46. Haerslev T, Jacobsen K, Nedergaard L, Zedeler E. Immunohistochemical detection of metallothionein in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases. *Patholl Res Pract.* 1994;190(7):675-81.
47. Haq F, Mahoney M, Koropatnick J. Signaling events for metallothionein induction. *Mutation research.* 2003;533(1-2):211-26.
48. Hamer DH. Metallothionein. *Ann. Rev. Biochem.* 1986;55:913-51.
49. Hecht D, Jung D, Prabhu VV, Munson PJ, Hoffman MP, Kleinman HK. Metallothionein promotes laminin-1-induced acinar differentiation in vitro and reduces tumor growth in vivo. *Cancer Res.* 2002;62:5370-4.
50. Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407:770-6.
51. Hubner G, Klein HJ, Kleinsasser O, Schiefer HG. Role of myoepithelial cells in the development of salivary gland tumors. *Cancer.* 1971;27:1255-61.
52. Irie Y, Mori F, Keung W, Mizushima Y, Wakabayashi K. Expression of neuronal growth inhibitory factor (metallothionein-III) in the salivary gland. *Physiol Res.* 2004;53(6):719-23.
53. Jasani B, Schmid KW. Significance of metallothionein overexpression in human tumours. *Histopathology.* 1997; 31(3): 211-4.
54. Jayasurya A, Bay BH, Yap WM, Tan NG. Correlation of metallothionein expression and apoptosis in nasopharyngeal cancer. *Br. J. Cancer.* 2000;82:1198-203.

55. Jayasurya A, Bay BH, Yap WM, Tan NG, Tan BKH. Proliferative potential in nasopharyngeal carcinoma: correlations with metallothionein expression and tissue zinc levels. *Carcinogenesis*. 2000;21:1809-12.
56. 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;54(4):217-23.
57. Jin R, Bay B, Chow V, Tan P. Metallothionein 1F mRNA expression correlated with histological grade in breast carcinoma. *Breast Cancer Res Treat*. 2002;23(1):81-6.
58. Kawai k, Liu SX, Tyurin VA, Tyurina YY, Borisenko GG, Jiang JF, Croix CMS, Fabisiak JP, Pitt BR, Kagan VE. Antioxidant and antiapoptotic function of metallothioneins in HL-60 cells challenged with copper nitrilotriacetate, *Chem. Res. Toxicol*. 2000;13:1275-86.
59. Kennette W, Collins OM, Zalups RK, *et al*. Basal and zinc-induced metallothionein in resistance to cadmium, cisplatin, zinc, and tertbutyl hydroperoxide: studies using MT knockout and antisense downregulated MT in mammalian cells. *Toxicol. Sci*. 2005;88:602-13.
60. Kerr JFR. Definition of apoptosis and overview of its incidence. In: Lavin M,
61. Watters D. Programmed cell death: the cellular and molecular biology of apoptosis. Harwood Academic Publishers. 1993;1-15.
62. Ko YH, Lee MA, Hong YS, Lee KS, Jung C, Kim YS, *et al*. Prognostic factors affecting the clinical outcome of adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Japanese J Clin Oncol*. 2007;37(11):805-11.

63. Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, Hausame NJ. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--a 20 years experience. *Int j oral maxillofac sug.* 2004;33(1):25-31.
64. Kim CH, Kim JH, Lee J, Ahn YS. Zinc-induced NFkB inhibition can be modulated by changes in the intracellular metallothionein level. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2003;190(2):189-96.
65. Kondo Y, Woo ES, Michalska AE, Choo KHA, Lazo JS. Metallothionein null cells have increased sensitivity to anticancer drugs. *Cancer Res.* 1995;55:2021-3.
66. Kuan CY, Kuida K. Cell death in mammalian development. In: Yin XM, Dong Z., editors. *Essential of apoptosis.* New Jersey: Humana Press Inc. 2003;163-75.
67. 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;11(12):2205-15.
68. Li Y, Wo JM, Cai L, Zhou Z, Rosenbaum D, Mendez C, *et al.* Association of metallothionein expression and lack of apoptosis with progression of carcinogenesis in Barrett's esophagus. *Exp Biol Med (Maywood).* 2003;228(3):286-92.
69. Loyola A, Araujo V, Sousa S, Araujo N. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31(3):197-201.
70. Ma F, Wang H, Chen B, Wang F, Xu H. Metallothionein 3 attenuated the apoptosis of neurons in the CA1 region of the hippocampus in the senescence-accelerated mouse/PRONE8 (SAMP8). *Arq Neuropsiquiatr.* 2011;69:105-111

71. Maret W. Metallothionein redox biology in the cytoprotective and cytotoxic functions of zinc. *Experimental Gerontology*. 2007;43(5):363-9.
72. Margaritescu C, Raica M, Simionescu C, Mogoanta L, Surpateanu M, Jaubert F, *et al.* Tumoral stroma of salivary pleomorphic adenoma - histopathological, histochemical and immunohistochemical study. *Rom J Morphol Embryol*. 2005;46:211-23.
73. Margoshes M, Vallee BL. A cadmium protein 1443 from equine kidney cortex. *J Am Chem Soc*. 1957;2(8):4813-14.
74. McCluggage WG, Maxwell P, Hamilton PW, Jasani B. High metallothionein expression is associated with features predictive of aggressive behaviour in endometrial carcinoma. *Histopathol*. 1999;34:51.
75. Michalska E, Choo KH. Targeting and germ-line transmission of a null mutation at the metallothionein I and II loci in mouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1993; 90:8088-92.
76. Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondria and apoptosis. *European Journal of Biochemistry*. 1998;252:1-15.
77. Miller RT, Kubier PHT, Reynolds BHT, Henry TB, Turnbow HB. Blocking of Endogenous Avidin-Binding Activity in Immunohistochemistry: The Use of Skim Milk as an Economical and Effective Substitute for Commercial Biotin Solutions. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 1999;7(1):63-5.
78. Miles AT, Hawksworth GM, Beattie JH, *et al.* Induction, regulation, degradation, and biological significance of mammalian metallothioneins. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol*. 2000;35:35-70.

79. Moffatt P, Denizeau F. Metallothionein in physiological and physiopathological process. *Drug Metab. Rev.* 1997;29(1-2):261-307.
80. Muramatsu Y, Hasegawa Y, Fukano H, Ogawa T, Namuba M, Mouri K, *et al.* Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses. *Anticancer Res.* 2000;20(1A):257-64.
81. Naeim F, Forsberg MI, Waisman J, Coulson WF. Mixed tumours of the salivary glands. *Arch Pathol Lab Med.* 1976;100:271-5.
82. Nardone M, Ferrara G, Nappi O, Di maria D, Villari G. Pleomorphic adenoma in unusual anatomic sites: case reports and review of literature. *Acta Otorhinolaryngologica Italica.* 2002;22(3):158-63.
83. Nartey N, Cherian MG, Banerje ED. Immunohistochemical localization of metallothionein in human thyroid tumors. *The American journal of pathology.* 1987;129(1):177-82.
84. 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.
85. Nielsen AE, Bohr A, Penkowa M. The balance between life and death of cells: Roles of Metallothioneins. *Biomarker Insights.* 2007;2:99-111.
86. Nordberg M, Nordberg GF. Noisy-le-grand. *Cell Mol Biol.* 2000;46(2):451-63.
87. OH YS, Eisele DW. Salivary Glands Neoplasms. Em: Bailey BJ, Johnson JT, Newlands SD. *Head & Neck Surgery - Otolaryngology.* Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins 2006;1516-33.

88. Palmiter RD. The elusive function of metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1998; 95(15):8428-30.
89. Pedersen M, Larsen A, Stoltenberg M, Penkowa M. The role of metallothionein in oncogenesis and cancer prognosis. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry.* 2009;44(1):29-64.
90. Penkowa M. Metallothioneins are multipurpose neuroprotectants during brain pathology. *FEBS J.* 2006;273(9):1857-70.
91. Penkowa M, Tio L, Giralt M, *et al.* Specificity and divergence in the neurobiologic effects of different metallothioneins after brain injury. *J. Neurosci. Res.* 2006;83:974-84.
92. 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; 42(2):139-46.
93. Pires FR, *et al.* Intra-oral minor salivary gland tumors: a clinicopathological study of 546 cases. *Oral Oncol.* 2007;43(5):463-70.
94. Qu W, Fuquay R, Sakurai T, *et al.* Acquisition of apoptotic resistance in cadmium-induced malignant transformation: specific perturbation of JNK signal transduction pathway and associated metallothionein overexpression. *Mol. Carcinog.* 2006; 45:561-71.
95. Quaife CJ, Findley SD, Erickson JC, Froelick GJ, Kelly EJ, Zambrowicz BP, Palmiter RD. Induction of a new metallothionein isoform (MT-IV) occurs during differentiation of stratified squamous epithelia, *Biochemistry* 1994;33:7250-9.
96. Romero-Isart N, Vasak M. Advances in the structure and chemistry of metallothioneins. *J. Inorg. Biochem.* 2002;88:388-96.

97. Sato M, Konkoh M. Recent studies on metallothionein: protection against toxicity of heavy metals and oxygen free radicals. *Tohoku J Exp Med.* 2002;196(1):9-22.
98. Seifert G, Langrock I, Donath K. Pathomorphologische Subklassifikation der pleomorphen Speicheldrüsenadenome. *HNO* 1976;24:415-26.
99. Seifert G, Rieb H, Donath K. Klassifikation der Tumoren der Keimdrüsen Speicheldrüsen. Patho-histologische Analyse von 160 Tumoren. *Laryngol. Rhinol. Otol.* 1980; 59:379-400.
100. Silva, Marco Túlio Brazão. Carcinoma Adenóide Cístico de Glândula Salivar: Estudo Clinicopatológico e da Expressão de Metalotioneína. 2010. 112f. Dissertação (mestrado em odontologia). Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, 2010.
101. Shimoda R, Achanzar WE, Qu W, Nagamine T, Takagi H, Mori M, *et al.* Metallothionein is a potential negative regulator of apoptosis. *Toxicol Sci.* 2003;73(2):294-300.
102. Shrestha H, Takagi Y, Takai K, Suzuki M. Immunoreactive metallothionein in salivary gland neoplasms. *Acta histochem cytochem.* 1996;29(1):7-16.
103. Stennert E, Guntinas-Lichius O, Klussmann JP, Arnold G. Histopathology of Pleomorphic Adenoma in the Parotid Gland: A Prospective Unselected Series of 100 Cases. *Laryngoscope.* 2001;111(12):2195-200.
104. Sternlicht MD, Safarians S, Rivera SP, Barsky SH: Characterizations of the extracellular matrix and proteinase inhibitor content of human myoepithelial tumors. *Lab Invest.* 1996;74:781-96.

105. Suhy DA, Simon KD, Linzer DIH, O'Halooran TV. Metallothionein is part of a zinc-scavenging mechanism for cell survival under conditions of extreme zinc deprivation. *J. Biol. Chem.* 1992;274(14):9183-92.
106. Sunardhi-Widyaputra S, Van Den Oord J, Van Houdt K, Deley M, Van Damme B. Identification of metallothionein and parathyroid hormone-related peptide (PTHrp)-positive cells in salivary gland tumor. *Pathol Res Pract.* 1995;191(11):1092-8.
107. Sundelin K, Jadner M, Norberg-Spaak L, Davidsson A, Hellquist HB. Metallothionein and fas (CD95) are expressed in squamous cell carcinoma of the tongue. *Eur J Cancer.* 1997;1860-4.
108. Takai Y, Dardick I, Mackay A, *et al.* Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas. Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin, and glial fibrillary acidic protein. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995;79:33-41.
109. Theocharis SE, Margeli AP, Koutselinis A. Metallothionein: a multifunctional protein from toxicity to cancer. *Int. J. Biol. Markers.* 2003;18:162-9.
110. Theocharis SE, Margeli AP, Klijanienko JT, Kouraklis GP. Metallothionein expression in human neoplasia. *Histopathology.* 2004;45(2):103-18.
111. Thyss R, Virolle V, Imbert V, Peyron JF, Aberdam D, Virolle T. TNF-kappaB/Egr-1/Gadd45 are sequentially activated upon UVB irradiation to mediate epidermal cell death. *EMBO J.* 2005;24:128-37.
112. Toida M, Shimokawa K, Makita H, Kato K, Kobayashi a, Kusunoki Y, Hatakeyama D, Fujitsuka H, Yamashita T, Shibata T. Intraoral minor salivary

- gland tumors: a clinicopathological study of 82 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34:528-32.
113. Tsujikawa K, Suzuki N, Sagawa K, Itoh M, Sugiyama T, Kohama Y, *et al.* Induction and subcellular localization of metallothionein in regeneration rat liver. *Eur J Cell Biol.* 1994;63:240-6.
114. Van Der Oord JJ, Sunardhi-Widyaputra S, Van Damme B, De Ley M. Monoclonal antibody to liver metallothionein: a novel marker for myoepithelial cells. *Pathol. Res. Pract.* 1993;189(10):1187-90.
115. Van Der Oord JJ, De Ley M. Distribution of metallothionein: in normal and pathological human skin. *Arch. Dermatol. Res.* 1994;286(1):62-8.
116. Wang GW, Klein JB, Kang YJ. Metallothionein inhibits doxorubicin-induced mitochondrial cytochrome c release and caspase-3 activation in cardiomyocytes, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001;298:461-8.
117. Williams GT. Programmed cell death: apoptosis and oncogenesis. *Cell.* 1991;65:1097-8.
118. Wohrl W, Häcker G. Extent and limitation of the control of nuclear apoptosis by DNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1999;254:552-8.
119. Yamasaki Y, Smith C, Weisz D, Van Huizen I, Xuan J, Moussa M, *et al.* Metallothionein expression as prognostic factor for transitional cell carcinoma of bladder. *Urology.* 2006;67(3):530-5.
120. Yañez M, Roa L, García M, Ibacache G, Villaseca M. Bcl-2 gene protein expression in salivary gland tumors. *Rev. Med. Chil.* 1999;127:139-42.

121. Yap X, Tan H, Huang J, Lay Y, Yip GW, Tan P, *et al.* Over expression of metallothionein predicts chemoresistance in breast cancer. *J Pathol.* 2009;217(4):563-70.
122. Yeudall WA, Jakus J. Cyclin kinase inhibitors add a new dimension to cell cycle control. *Oral Oncol, Eur J Cancer.* 1995;31B(5):291-8.
123. Yin HF, Okada N, Takagi M. Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. *Pathol Int.* 2000; 50(8):603-9.
124. Zhang B, Satoh B, Nishimura M, Suzuki N, Sone JS, Aoki Y, Tohyama C. Metallothionein deficiency promotes mouse skin carcinogenesis induced by 7,12-dimethylbenz[a]anthracene. *CancerRes.* 1998;58:4044-6.
125. Zhang XH, Takenaka I. Incidence of apoptosis and metallothionein expression in renal cell carcinoma. *Br. J. Urol.* 1998;81:9-13

9. ANEXOS

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DA UFMG



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 Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

Av. Pres. Antônio Carlos, 6627 - Unidade Administrativa II - 2ª andar - São Carlos - CxP.31270-901 - BH-MG
Telefax: (031) 3409-4592 - e-mail: coep@pqa.ufmg.br

INSTRUÇÕES PARA PUBLICAÇÃO DE ARTIGO NA ACTA HISTOCHEMICA

Instructions to authors

For a full and complete Guide for Authors, please go to: <http://www.elsevier.de/acthis>

acta
histochemica

10. APÊNDICES

Características clínico-patológicas dos casos avaliados

Caso	Classificação histológica	Gênero	Cor	Idade	Localização
1	I	F	melanoderma	19	Lábio
2	I	F	melanoderma	16	palato
3	I	F	feoderma	55	palato
4	I	M	melanoderma	25	palato
5	I	M	melanoderma	31	palato
6	I	F	leucoderma	40	palato
7	I	F	melanoderma	86	Palato
8	I	F	leucoderma	54	palato
9	I	F	melanoderma	30	palato
10	III	M	feoderma	22	palato
11	I	F	leucoderma	55	soalho bucal
12	IV	F	feoderma	34	palato
13	III	F	leucoderma	0	palato
14	I	M	leucoderma	49	soalho bucal
15	I	F	melanoderma	34	palato
16	I	M	feoderma	56	palato
17	I	F	melanoderma	28	palato
18	I	F	leucoderma	36	palato
19	III	M	feoderma	29	palato
20	I	F	feoderma	19	palato
21	I	M	melanoderma	35	palato
22	I	M	feoderma	20	palato
23	II	F	melanoderma	78	palato
24	I	F	melanoderma	27	palato
25	I	F	feoderma	76	palato
26	I	M	melanoderma	0	palato
27	I	F	melanoderma	67	palato
28	I	F	leucoderma	49	palato
29	I	M	leucoderma	38	palato
30	I	F	leucoderma	59	palato
31	I	M	feoderma	34	palato
32	I	M	leucoderma	23	palato
33	IV	F	feoderma	28	mucosa jugal
34	III	M	leucoderma	26	mucosa jugal
35	II	F	feoderma	26	mucosa jugal

Índices de imunomarcção da MT x classificação histopatológica do AP

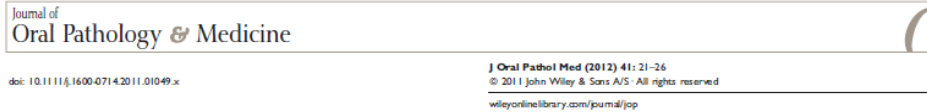
So	Classificação histológica	Índices MT
1	I	2
2	I	4
3	I	0
4	I	2
5	I	6
6	I	4
7	I	2
8	I	12
9	I	1
10	III	1
11	I	1
12	IV	9
13	III	1
14	I	4
15	I	9
16	I	0
17	I	3
18	I	2
19	III	6
20	I	9
21	I	9
22	I	2
23	II	4
24	I	4
25	I	9
26	I	2
27	I	9
28	I	2
29	I	1
30	I	4
31	I	8
32	I	1
33	IV	1
34	III	9
35	II	12

Índices de imunomarcção da Bcl-2 x classificação histopatológica do AP

Caso	Classificação histológica	Índices Bcl-2
1	I	1
2	I	6
3	I	9
4	I	9
5	I	9
6	I	4
7	I	1
8	I	9
9	I	9
10	III	9
11	I	3
12	IV	0
13	III	0
14	I	9
15	I	9
16	I	0
17	I	6
18	I	6
19	III	9
20	I	9
21	I	9
22	I	0
23	II	0
24	I	4
25	I	9
26	I	0
27	I	9
28	I	6
29	I	0
30	I	9
31	I	9
32	I	4
33	IV	0
34	III	6
35	II	9

Produções e participações durante o mestrado:

Publicações:



Midkine expression in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia

Bruno Correia Jham¹, Nadia Lago Costa², Janine Mayra Silva³, Alessandra Castro de Miranda³, Jose Carlos Oliveira⁴, Tarcília Aparecida Silva³, Aline Carvalho Batista²

¹Department of Microbiology, Immunology, Parasitology and Pathology, Institute of Tropical Pathology and Public Health, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; ²Department of Stomatology (Oral Pathology), Dental School, Federal University of Goiás, Goiânia, Brazil; ³Department of Oral Surgery and Pathology, Dental School, Federal University of Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; ⁴Division of Head and Neck, Araújo Jorge Hospital, Association of Cancer Combat of Goiás, Goiânia, Brazil

Open Journal of Stomatology, 2011, 1, 202–206

doi:10.4236/ojst.2011.14031 Published Online December 2011 (<http://www.SciRP.org/journal/ojst/>).

OJST

Oral spindle cell lipomas

Patrícia C. Caldeira¹, Vanessa F. Bernardes¹, Alessandra C. Miranda¹, Déborah C. Telles², Rodrigo M. R. Batista³, Carlos A. Ribeiro⁴, Tarcília A. Silva¹

¹Department of Oral Pathology and Surgery, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil;

²Hospital of Clinics, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil; <http://www.SciRP.org/journal/ojst/OJSTOralspindlecelllipomas>

³Association against Cancer of the Midwest, Belo Horizonte, Brazil; PatriciaC.Caldeira1@gmail.com

⁴Roberto Alvarenga Institute, Belo Horizonte, Brazil.

Email: tarcilia@ufmg.br

Received 9 September 2011; revised 3 November 2011; accepted 24 November 2011.

▪ **2011- 28ª SBPqO**

Participação do pôster apresentado: “Carcinogênese bucal induzida pelo 4NQO em língua de camundongos GATA -\ e BALB c. Santos TPM, Bessoni RLC, Silva JM, Silva TA, Mendonça EF, Viana ACM, Teixeira MM, Batista AC.

Local: Águas de Lindóia, SP.

▪ **2010- 27ª SBPqO**

Apresentação de pôster: “Expressão comparativa do Midkine em leucoplasia e carcinoma de células escamosas de Boca. Viana ACM , Silva JM, Silva TA, Mendonça EF.

Local: Águas de Lindóia, SP.

▪ **2010- Curso de curta Duração:**

Curso Teórico-Prático “Workshop de Imunoistoquímica”.

Local: Faculdade de Medicina-UFMG – Dept. de Anatomia Patológica.

Carga horária: 08 horas

V614i Viana, Alessandra de Castro Miranda
2012 Imunolocalização da metalotioneína no adenoma pleomórfico de glândula salivar: correlações clínico-patológicas / Alessandra de Castro Miranda Viana. 2012.
T 103 f.: il.
Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar
Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.
1. Adenoma pleomorfo - Teses. 2. Apoptose – Teses. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. III. Título.

BLACK D047

Elaborada pela biblioteca da Faculdade de Odontologia da UFMG

SISBB - SISTEMA DE INFORMACOES BANCO DO BRASIL
18/09/2012 - AUTO-ATENDIMENTO - 15.06.11
3491603491

COMPROVANTE DE AGENDAMENTO
CLIENTE: ALESSANDRA CASTRO MIRANDA
AGENCIA: 3491-6 CONTA: 42.450-1

=====
Convenio GRU-GUIA RECOLHIM. UNIAO
Codigo de Barras 85890000000-0 30000254288-8
30009222172-5 17985000104-9
Data do pagamento 18/09/2012
Valor em Dinheiro 30,00
Valor em Cheque 0,00
Valor Total 30,00

Pagamento agendado.

Atenção: Esta transação está sujeita a avaliação
de segurança e será processada após análise.
O comprovante definitivo somente sera emitido
apos a quitacao.

