



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, CXCR4 E DENSIDADE MICROVASCULAR
EM ADENOMAS PLEOMÓRFICOS E CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

RODOLFO DE ABREU CAROLINO

Campina Grande/PB

2017

RODOLFO DE ABREU CAROLINO

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, CXCR4 E DENSIDADE MICROVASCULAR
EM ADENOMAS PLEOMÓRFICOS E CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez

Campina Grande/PB

2017

É expressamente proibido a comercialização deste documento, tanto na forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano do trabalho.

C292i Carolino, Rodolfo de Abreu.
Imunoexpressão de CXCL12, CXCR4 e densidade microvascular em adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares [manuscrito] / Rodolfo de Abreu Carolino. - 2017.
113 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez ,
Coordenação do Curso de Odontologia - CCBS."

1. Adenomas pleomórficos. 2. Carcinomas mucoepidermóides. 3. Neoplasias das Glândulas salivares.

21. ed. CDD 616.994 31


RODOLFO DE ABREU CAROLINO

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, CXCR4 E DENSIDADE MICROVASCULAR
EM ADENOMAS PLEOMÓRFICOS E CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES
DE GLÂNDULAS SALIVARES.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba como um dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: 31/07/2017

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez – UEPB
Membro titular (Orientador)



Profa. Dra. Polianna Muniz Alves - UEPB
Membro titular (1º Examinador)



Prof. Dr. Pedro Paulo de Andrade Santos – UFRN
Membro titular (2º Examinador)

AGRADECIMENTOS



AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida, pela força, coragem, capacidade e por sempre colocar pessoas maravilhosas em meu caminho.

À minha família que sempre me amou e me apoiou em todas as minhas decisões, principalmente a meus Pais, Geraldo Carolino e Eclivaneide Abreu, que são a minha base, fortaleza, refúgio e segurança. Agradeço intensamente por eles não medirem esforços para minha formação.

A meu Professor Orientador Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez por confiar e acreditar em mim, e acreditar que nosso projeto daria certo. Eu só tenho a agradecer e demonstrar a alegria de trabalhar com Professor Manuel que é um homem sério, digno e honrado. Agradeço pela disponibilidade de sempre, pelas dúvidas sanadas, pelos ensinamentos, pelas nossas conversas e por me tratar de forma tão próxima e humana. Deus abençoe nossas relações pessoais e acadêmicas.

A Professora Dra. Pollianna Muniz Alves que me guia e transmite ensinamentos desde a época da graduação. Agradeço muito pela ajuda, pelas dúvidas sanadas, pela atenção e pelo carinho com que sempre me trata. Inteligência e responsabilidade são sinônimos de Polliana Muniz, e sua forma de atuar é espelho para muita gente.

Ao Professor Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka por sua orientação durante todo o curso da pesquisa e pelos ensinamentos dentro e fora de sala de aula. Agradeço também pelo seu incentivo e constante dedicação a este trabalho e por coordenar o Laboratório de Histopatologia de forma tão responsável, digna, construtiva e comprometida. Faz gosto perceber a sua felicidade e dedicação para com este projeto e programa.

À Professora Dra. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro pelos seus sorrisos de sempre, pelo carinho com que atende os alunos e por me auxiliar e transmitir seus ensinamentos no laboratório.

À Professora Dra. Aline Carvalho Batista por sua contribuição significativa na pesquisa, por sua parceria com nosso programa, por sua confiança e pela prontidão em nos atender quando solicitado.

Ao Professor Dr. Elismauro Francisco Mendonça por suas contribuições nesta pesquisa e no nosso programa de Pós Graduação.

Agradeço ao Programa de Pós Graduação em Odontologia da UEPB por me acolher e me fazer crescer tanto, em tão pouco tempo. Agradeço a Professora Patrícia Meira, como coordenadora do programa, pela sua responsabilidade, prontidão e compromisso com o curso.

Aos meus amigos e companheiros de laboratório Maraíza, Fabiana, Luan, Luana, Arlley, Geisa, Emanuene e Amanda, pelo companheirismo de sempre, pela amizade e pela ajuda durante as fases de pesquisa laboratorial.

A “Equipe de Patologia” do PPGO que é uma verdadeira família.

Aos meus amigos de mestrado Ana Pricilia, Diego, Erick, Ernani, Fabiana José de Alencar, Isabella, Luan, Luana, Niebla e Tomás, por toda união durante curso, por ser uma turma tão carinhosa e divertida, por fazer da jornada bem mais fácil, por ser tão marcante e especial no PPGO.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, em especial a Dra. Ana Flávia Granville-Garcia, Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Dra. Edja Maria e Dra. Josinete Vieira Pereira.

A Dionele, Pamela, Dione, Denize e Ana Luzia pelo auxílio e trabalho ético e maravilhoso que elas têm cumprido na nossa instituição. Em especial a Denize e Ana, sem elas a pesquisa não teria êxito.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma a realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

Ao **Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba/PB** e ao **Programa de Pós-Graduação em Odontologia** na pessoa de Patrícia Meira Bento.

À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás – FO/UFG** – na pessoa da professora Aline Carvalho Batista.

Ao **Hospital Napoleão Laureano** na pessoa do Diretor Dr. Ivo Sérgio Borges

Ao **Hospital Araújo Jorge/Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ/ACCG)** na pessoa de Professor Elismauro Francisco Mendonça.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes)** pela concessão de bolsa de Mestrado.

Ao **Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (Procad)** pela interação entre UEPB, UFMG e UFG e, dessa forma, permitir o intercâmbio e realização da dissertação.

“A beleza de ser um eterno aprendiz...”

RESUMO



RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em adenomas pleomórficos (APs) e carcinomas mucoepidermóides (CMEs) das glândulas salivares, relacionando-a a parâmetros clínicos e patológicos e à atividade angiogênica tumoral por meio da densidade microvascular (DMV). Através do método da imunoperoxidase, com anticorpos anti-CXCL12, anti-CXCR4 e anti-CD31, sob microscopia de luz, foram estabelecidos percentuais de células neoplásicas imunomarcadas nas regiões intratumorais e peritumorais de uma amostra de APs e CMEs de glândulas salivares. A maioria dos APs e todos os CMES foram positivos para CXCL12, com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,003$) na expressão dessa proteína em relação ao tipo de neoplasia. Correlação positiva foi constatada na expressão da CXCL12 entre as regiões intratumoral e peritumoral da amostra. Tanto os APs como os CMEs foram positivos para CXCR4, com discreta diferença estatisticamente significativa na expressão dessa proteína na região peritumoral em relação ao tipo de neoplasia. Correlação positiva foi também observada na expressão da CXCR4 entre as regiões intratumoral e peritumoral da amostra. Foi constatada diferença estatisticamente significativa da DMV ($p < 0,001$) em relação ao tipo de neoplasia, destacando-se CMEs. Houve correlação positiva da DMV entre as regiões intratumoral e peritumoral dos APs e CME. Houve expressão semelhante da CXCL12 e do CXCR4 nos tumores, no entanto, o complexo CXCL12/CXCR4 parece não ser um fator preponderante para atividade angiogênica tumoral. A maior DMV intratumoral em CMEs e peritumoral em APs provavelmente sejam influenciadas por outros fatores ou fenômenos sinérgicos à ativação do complexo CXCL12/CXCR4.

Palavras chave: Adenoma pleomórfico, Carcinoma mucoepidermóide, CXCL12, CXCR4, CD31.

ABSTRACT



ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of the CXCL12 chemokine and its CXCR4 receptor in pleomorphic adenomas (PAs) and mucoepidermoid carcinomas (MECs) of the salivary glands, relating it to clinical and pathological parameters and to tumor angiogenic activity through microvascular density (MVD). Through the immunoperoxidase method, with antibodies anti-CXCL12, anti-CXCR4 and anti-CD31, under light microscopy, it has been established percentages of neoplastic cells immunostained in the intratumoral and peritumoral regions of PAs and MECs of salivary glands. Most of the PAs and all of the MECs were positive for CXCL12, with a statistically relevant difference in the expression of this protein related to the neoplasia type. A positive correlation was observed in the CXCL12 expression between the intratumoral and peritumoral regions of the sample. All of the APs and MECs were positive for CXCR4, showing a discrete statistically relevant difference in the expression of this protein in the peritumoral region related to the neoplasia type. Positive correlation of CXCR4 expression was observed between the intratumoral and peritumoral regions of the sample. It was found a statistically relevant difference of the MDV in relation to the neoplasia type, mainly about the MECs. Positive correlation of MDV was observed between the intratumoral and peritumoral regions of PAs and MECs. There was similar expression of the CXCL12 and the CXCR4, but the CXCL12/CXCR4 complex does not appear to be a meaningful factor in relation to the angiogenic tumoral activity. The most intratumoral MDV in MECs and peritumoral in APs probably suffer the influence of other factors or synergistic phenomena to the CXCL12/CXCR4 complex activation.

Key words: Pleomorphic adenoma, Mucoepidermoid carcinoma, CXCL12, CXCR4, CD31.

LISTA DE QUADROS E TABELAS



LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Classificação Histomorfológica dos adenomas pleomórficos segundo os critérios de classificação estabelecidos por Seifert et al (1976).....	25
Quadro 2	Classificação de Seifert et al. (1976) segundo a dicotomização de Viana et al (2013).....	25
Quadro 3	Estadiamento para carcinoma de glândula salivar maior proposto por <i>American Joint Committee on Cancer*</i>	27
Quadro 4	Estadiamento clínico TNM para carcinoma de glândula salivar maior proposto por <i>American Joint Committee on Cancer.*</i>	28
Quadro 5	Características e critérios utilizados no sistema de gradação para carcinoma mucoepidermoide de glândulas salivares proposto por Brandwein et al (2001).....	28
Quadro 6	Variáveis Dependentes do Estudo.....	45
Quadro 7	Variáveis Independentes do Estudo.....	46
Quadro 8	Especificidades dos Anticorpos.....	51
Tabela 1	Caracterização da amostra em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	67
Tabela 2	Mediana e variação das percentagens de positividade para CXCL12, CXCR4 e DMV na região intratumoral em relação aos parâmetros clinicopatológicos da amostra avaliada.....	68
Tabela 3	Mediana e variação das percentagens de positividade para CXCL12, CXCR4 e DMV na região peritumoral em relação aos parâmetros clinicopatológicos da amostra avaliada.....	69
Tabela 4	Análise das correlações imunoistoquímicas de CXCL12, CXCR4 e DMV em regiões intra e perivasculares da amostra avaliada.....	70

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS



LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAJC	<i>The American Joint Committee</i>
AP	Adenoma Pleomórfico
α-SMA	Do Inglês traduzido como Actina alfa-músculo liso
CAC	Carcinoma adenoide cístico.
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CEC	Carcinoma de células escamosas
CD31	Do Inglês, traduzido como <i>Cluster of Deferentiation 31</i>
CD105	Do Inglês, traduzido como <i>Cluster of Deferentiation 105</i>
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
CME	Carcinoma Mucoepidermoide.
CNF	Carcinoma de nasofaringe
CPE	Células Progenitoras endoteliais
CXCR4:	Do inglês <i>CXC chemokine receptor-4</i> , traduzido como Receptor de quimiocina CXC 4.
DAB:	Do inglês <i>diaminobenzidine</i> , traduzido como Diaminobenzidina.
DMV	Densidade microvascular.
CE	Células endoteliais
EPC	Células endoteliais precursoras
EPK	Do inglês <i>eukaryotic Protein Kinase</i>
FAK:	Do inglês <i>quinase adhesion focal</i> , traduzido como quinase de adesão focal.
FGF-2:	Do Inglês <i>fibroblast growth fator</i> (bFGF) – Traduzido como Fator de crescimento fibroblástico.
GDP:	Guanosina difosfato.
GTP:	Guanosina Trifosfato.
HIF:	Do inglês <i>hypoxia inducible fator</i> , traduzido como Fator indutor de hipóxia.
Ig	Imunoglobulinas

IL-1:	Do inglês <i>Interleukin 1</i> , traduzido como interleucina 1.
MEC:	Matriz extracelular.
MMP:	Do inglês <i>Matrix metalloproteinases</i> , traduzido como Metaloproteinase de matriz.
mRNA	Do inglês Ácido ribonucleico mensageiro
MUC-1:	Do inglês <i>expression of mucin gene 1</i> traduzido como Gene de expressão de mucina 1.
MDV	Do inglês “ <i>microvascular density</i> ” traduzido: Micro Densidade vascular
NK	Do inglês <i>Natural Killer</i>
OMS:	Organização Mundial de Saúde.
PECAM	Molécula de adesão endotelial plaquetária
PROAP:	Programa de apoio a pós-graduação.
PROCAD:	Programa Nacional de Cooperação Acadêmica.
SDF1:	Do inglês <i>stromal cell derived factor-1</i> , traduzido como Fator derivado de células do estroma 1, também conhecido como CXCL12.
TGF-α:	Do inglês <i>Transforming growth factor alpha</i> , traduzido como Fator transformador de crescimento alfa.
TNF:	Do inglês <i>Tumor necrosis factor</i> , traduzido como Fator necrose tumoral.
TNM	Sigla do sistema de estadiamento para tumores, T-tamanho, N-Nodal, M-Metástase.
TSG	Tumores de Glândulas Salivares.
UEPB:	Universidade Estadual da Paraíba.
VEGF:	Do inglês <i>Vascular endothelial growth factor</i> , traduzido como Fator de crescimento endotelial vascular.
WHO:	Do inglês <i>World Health Organization</i> , traduzido como Organização Mundial da Saúde.

LISTA DE FIGURAS



LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica dos marcadores utilizados. A) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em AP (Novolink™, Santa Cruz Biotechnology, 400x). B) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CME (Novolink™, Santa Cruz Biotechnology, 400x). C) Imunoexpressão epitelial de CXCR4 em AP (Reveal™, Santa Cruz Biotechnology, 200x). D) Imunoexpressão epitelial de CXCR4 em CME (Reveal™, Santa Cruz Biotechnology, 400x) E) Imunoexpressão celular endotelial de CD31 em AP (Reveal™, Novocasta, 200x). F) Imunoexpressão celular endotelial de CD31 em CME (Reveal™, Novocasta, 200x)

SUMÁRIO



SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS	22
1.1 Neoplasias de glândulas Salivares	22
1.2 Adenoma Pleomórfico	23
1.3 Carcinoma Mucoepidermoide	25
1.4 Quimiocinas e Angiogênese Tumoral	29
2 OBJETIVOS	40
2.1 Objetivo Geral	40
2.2 Objetivos Específicos	40
3 MATERIAIS E MÉTODOS	43
3.1 Caracterização do Estudo	43
3.2 População do Estudo	43
3.3 Amostra	43
3.4 Critérios De Seleção Da Amostra	44
3.5.1 Critérios de Inclusão.....	44
3.5.2 Critérios de Exclusão.....	44
3.5 Coleta dos dados Epidemiológicos	44
3.6 Estudo Histomorfológico	44
3.7 Variáveis do Estudo	45
3.8 Estudo Imunohistoquímico	47
3.8.1 Método imunohistoquímico para o anticorpo policlonal CXCI12.....	47
3.8.2 Método imunohistoquímico para os anticorpos monoclonais CXCR4 e CD31.....	49
3.8.3 Especificidades dos anticorpos.....	51
3.9 Análise do perfil Imunohistoquímico	51
3.10 Análise Estatística	53
3.11 Considerações Éticas	54
4 ARTIGO	57
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	81
6 REFERÊNCIAS	83
ANEXOS	95

CONSIDERAÇÕES INICIAIS



1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1.1 Neoplasias de glândulas salivares

As glândulas salivares são órgãos exócrinos anexos ao o sistema digestório que produzem secreção e contribuem na lubrificação de tal sistema. Tais estruturas são divididas em glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares e sublinguais) e glândulas salivares menores (FAVA et al, 2001; NEMETZ et al, 2006). Estas glândulas podem ser acometidas por diversas alterações, incluindo as neoplasias benignas e malignas. Dentre estas, destacam-se os carcinomas de glândulas salivares que são consideradas lesões raras e os adenomas pleomórficos que são as lesões que apresentam as maiores taxas de ocorrência (ARAYA et al, 2015; KELLER et al, 2017).

As neoplasias de glândulas salivares mais frequentes constituem tema de interesse no campo da Patologia oral, sendo objeto de estudos em diversas regiões geográficas do mundo (CARDOSO et al, 2009; MOGHADAM et al, 2015; DEL SIGNORE, MEGWALU, 2017; RAYESS et al, 2017).

A literatura aponta que a incidência de neoplasias de glândulas salivares varia de 0,4 a 3,5 casos em cada 100 mil pessoas, e tais tumores representam de 1 a 4% de todas as neoplasias em humanos (JAHANGIRNEZHAD et al, 2013; ARAYA, 2015). As referidas lesões representam menos de 6% dos tumores da região de cabeça e pescoço em adultos e aproximadamente 8% ocorrem na população infantil (ELLIES et al, 2006; AL-KHATEEB, ABABNEH, 2007; ANSARI, 2007; TIAN, WANG, LI, 2010), e podem chegar a 20% quando a faixa etária se estende até a adolescência (LEVI et al, 2017).

Majoritariamente as neoplasias de glândulas salivares ocorrem em pacientes com média de idade de 45 anos (39 a 49 anos) (ANSARI, 2007; ZAMARRO, ROYO, ROYO, 2009, DHANUTHAI et al, 2013; GAO, 2016). Boa parte dos dados epidemiológicos aponta que a população feminina é a mais acometida, com percentual que varia de 54% a 67% (ITO et al, 2005; JONES et al, 2008; MELLO et al, 2012; ISRAEL, 2016), sendo a glândula parótida a mais afetada (MELLO et al, 2012; ISRAEL et al, 2016; DEL SIGNORE, MEGWALU, 2017).

1.2 Adenoma Pleomórfico

O Adenoma pleomórfico (AP) destaca-se entre as neoplasias de glândulas salivares por ser a lesão mais frequente, representando 60% de todos os tumores glandulares salivares. Esta neoplasia apresenta evidente predomínio no sexo feminino e a média de idade do diagnóstico é 46 anos, entretanto, ocasionalmente observa-se lesões em pacientes mais jovens (MELLO et al, 2012; STRUB et al, 2012; COMOGLU et al, 2017).

O AP possui crescimento lento, tendo a glândula parótida como o maior sítio de acometimento (80%), seguido da glândula submandibular (10%) (BOUAITY et al, 2016; SANDO et al, 2016; VALSTAR et al, 2017) e glândulas salivares menores, principalmente a região de palato, sendo que as neoplasias localizadas nesta região apresentam menor probabilidade de recorrência do que na parótida (FERREIRA et al, 2014; VALSTAR et al, 2017).

Tumores menores, usualmente, apresentam-se como massas firmes e móveis que tendem a tornar-se imóveis com curso clínico da lesão (SAHOO, RANGAN, GADAD, 2013). Clinicamente são assintomáticos (na maioria dos casos), mas há relatos de sintomatologia dolorosa, espasmos musculares e tendência a paralisia facial, para os que acometem a glândula parótida, principalmente após a cirurgia e nos tumores mais profundos com mais 3cm de diâmetro (BITTAR et al, 2016; MACHADO et al, 2017).

O AP é caracterizado como tumor encapsulado, composto por uma variedade de células epiteliais e mioepiteliais entremeadas por estroma de natureza e composição variável. A cápsula usualmente é bem circunscrita, e por vezes apresenta alguma descontinuidade em alguma área e invasão de células tumorais (BARNES et al, 2005; CARDESA et al, 2006).

O quadro histopatológico é caracterizado por células epiteliais e mioepiteliais dispostas em um “estroma” variável, que pode ser mixomatoso, hialino, fibroso, condroide, com material osteoide ou adiposo. As células mioepiteliais podem apresentar-se fusiformes, anguladas, ovoides, poligonais ou plasmocitoides. O arranjo celular pode ser em forma de ductos, ninhos, estruturas císticas, ilhas ou cordões. Tais organizações celulares e estromais resultam em distintos padrões com grande variedade arquitetural (MĂRGĂRITESCU et al, 2005; ITO et al, 2009).

Com o desenvolvimento tumoral, em lesões antigas, observa-se o aumento do estroma hialino/mixoide e diminuição do componente epitelial (BARNES et al, 2005; CARDESA et al, 2006). No entanto, relata-se que 45% dos casos de AP apresentam padrão predominantemente celular, 29% dos casos quantidade proporcional dos padrões celular e mixoide (mixomatoso) e apenas 16% predominantemente celularizados. Curiosamente, 32,5% dos casos mostraram diferenciação escamosa (FERREIRA et al, 2014).

Menos da metade dos APs apresentam uma proporção igual ou quase igual entre os componentes epiteliais e mesenquimais (VEGARI et al, 2012). Não obstante, Seifert et al (1976) classificaram tais tumores em 4 subtipos baseados na diferenciação celular e quantidade de estroma conforme o Quadro 1. O tipo I, conhecido como padrão clássico, apresenta equilíbrio entre a quantidade de células epiteliais e componentes estromais. No Tipo II há um predomínio do componente estromal, e em contraste, o tipo III também denominado de celularizado, caracterizado pelo predomínio do componente celular epitelial. O tipo IV, embora semelhante ao tipo III, exibe uma diferenciação monomórfica do componente epitelial.

De forma complementar à classificação supracitada citada, Viana et al (2013) dicotomizaram os subtipos de APs em dois grandes grupos: A e B. Nos quais o “Grupo A” compreende os subtipos I e II da classificação de Seifert et al (1976) e o “grupo B” compreende os subtipos III e IV (quadro 2).

A lesão pode atingir grandes dimensões causando morbidades e deformidades faciais. Além disto, o AP pode apresentar uma taxa variável de recorrência (2,5% à 32,5%), provavelmente pela extensão do tecido neoplásico a partir das áreas de descontinuidade da cápsula ou pela presença de tumores satélites. O tratamento de melhor escolha é a ressecção cirúrgica. Raramente, tal neoplasia pode sofrer transformação maligna, dando origem a um carcinoma ex adenoma pleomórfico (HAMADA et al, 2004; STRUB et al, 2012; MACHADO et al, 2017).

Quadro 1. Classificação Histomorfológica dos adenomas pleomórficos segundo os critérios de classificação estabelecidos por de Seifert et al (1976).

Classificação de Seifert et al (1976)	Características Histopatológicas
Tipo I	50% de estroma e 50% de células epiteliais (clássico)
Tipo II	Predominância de estroma (estromal)
Tipo III	Celularizado, 70% células
Tipo IV	Celularizados com arranjo predominante monomórfico das células

Quadro 2. Classificação de Seifert et al. (1976) segundo a dicotomização de Viana et al (2013).

Dicotomização	Tipos Histológicos
Grupo A	Tipos I e II
Grupo B	Tipos III e IV

1.3 Carcinoma Mucoepidermoide

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é o tumor maligno mais comum em glândula salivar (maiores e menores), sendo evidenciado aumento na incidência destas lesões em glândulas salivares maiores, especialmente os tumores de até 2cm em parótida (NEVILLE et al, 2009; GHAZALI; FLASHBURG; DEL, 2017; SIGNORE; MEGWALU, 2017), podendo também acometer mama, tireoide e glândulas lacrimais. Ocorre em qualquer faixa etária, com média de idade de 45 anos e é responsável por 10 a 11,5% de todos os casos de tumores em glândulas salivares ou 36,6% dos tumores malignos nessas glândulas (ANSARI, 2007; GAO et al, 2016).

A glândula parótida é mais afetada (45%), seguida por submandibular (7%) e sublingual (1%) e há uma maior ocorrência em pacientes do sexo feminino, compreendendo 54,9% dos casos (GHOSH-LASKAR et al, 2011; GUEVARA-CANALES et al, 2016, REN et al, 2017). Inicialmente pode apresentar-se como tumefação não associada à sintomatologia dolorosa, todavia quando presente, caracteriza-se por otorreia, parestesia, paralisia facial, disfagia, sangramento e

trismo. Na região intraoral pode-se observar uma lesão de coloração azul-avermelhada, semelhante a lesão vascular. Na região palatina os tumores podem ter formato papilar, e por vezes o osso subjacente apresenta aspecto radiográfico de roído de traça (BARNES et al, 2005; GUEVARA-CANALES et al, 2016).

O quadro histopatológico do tumor é caracterizado pela proliferação de células epidermoides, mucosas e células intermediárias. A proporção dos tipos celulares e o seu arranjo arquitetural são variáveis entre tumores, inclusive entre regiões de um mesmo carcinoma mucoepidermoide. Alguns tumores apresentam limites definidos, mas por vezes, ocorre infiltração no parênquima glandular. Podem ser observados espaços císticos limitados por células mucosas, intermediárias e em menor grau por células epidermoides poligonais, raramente ceratinizadas (AUCLAIR, ELLIS, 1991; BARNES et al, 2005, QANNAM et al, 2016).

O CME exibe uma variação quanto a agressividade biológica que pode estar relacionada com o estadiamento clínico, bem como os graus histopatológicos de malignidade (BRANDWEIN et al, 2001; MCHUGH et al, 2012; BAI et al, 2013).

O estadiamento clínico do CME de glândula salivar maior usa como base características como tamanho da lesão, envolvimento linfonodal e metástase (ELLIS, AUCLAIR, 1996). Criado pelo Comitê Conjunto Americano de Câncer (*The American Joint Committee - AJC*) e a União Internacional para o Controle do Câncer, o sistema de estadiamento do câncer através dos parâmetros tumor-nodo-metástase (TNM) utiliza critérios demonstrados nos quadros 3 e 4. Este sistema foi criado para a avaliação de neoplasias malignas, e usado também para glândulas salivares maiores. Para os tumores de glândulas salivares menores, o tamanho da lesão, associado à localização, apresenta-se como o critério de maior aplicabilidade, visto que envolvimento linfonodal e metástase são menos frequentes (TRANTAFILLIDOU et al, 2006; QANNAM et al, 2016).

Dentre os sistemas de gradação histopatológica observados na literatura, os critérios descritos por Brandwein et al (2001) consideram o componente cístico, invasão neural, necrose, número de mitoses, invasão linfática, vascular ou óssea, padrão de invasão, além de atipia nuclear, os que conferem maior acurácia à gradação com relação a outros sistemas. Desta forma, o CME é classificado em tumor de baixo, intermediário ou alto grau de malignidade conforme quadro 5.

Quadro 3. Estadiamento para carcinoma de glândula salivar maior proposto por *American Joint Committee on Cancer**

T – Tumor primário
Tx Tumor primário não pode ser avaliado.
T0 Sem evidência de tumor primário.
T1 Tumor de até 2 cm em seu maior diâmetro.
T2 Tumor maior que 2 cm mas menor que 4 cm em seu maior diâmetro.
T3 Tumor maior que 4 cm mas menor que 6 cm em seu maior diâmetro.
T4a - O tumor tem qualquer tamanho e invade estruturas próximas, como o osso da mandíbula, pele, canal auditivo ou nervo facial. Isto é conhecido como doença moderadamente avançada.
T4b - O tumor tem qualquer tamanho e invade estruturas próximas, como a base do crânio ou outros ossos nas proximidades ou que circundam a artéria carótida. Isto é conhecido como doença avançada.
N – Doença linfonodal
Nx Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
N0 Sem evidência clínica de nódulos linfáticos palpáveis ou suspeitos.
N1 Linfonodo único suspeito, palpável, ipsilateral, de até 3 cm em seu maior diâmetro.
N2 Linfonodo único suspeito, palpável, ipsilateral, maior que 3 cm e menor que 6 cm; linfonodos ipsilaterais suspeitos múltiplos, nenhum maior que 6 cm; linfonodos múltiplos suspeitos, contralaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
N2a Linfonodo único suspeito, palpável, ipsilateral, maior que 3 cm e menor que 6 cm em seu maior diâmetro.
N2b Linfonodos ipsilaterais suspeitos múltiplos, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
N2c Linfonodos múltiplos suspeitos, contralaterais ou bilaterais, nenhum maior que 6 cm em seu maior diâmetro.
N3 Linfonodos suspeitos palpáveis, maiores que 6 cm em seu maior diâmetro
M – Doença metastática
Mx Metástases à distância não podem ser avaliadas.
M0 Sem evidência de metástase à distância.
M1 Evidência clínica ou radiológica de metástase à distancia

* Greene, Page, Fleming (2002).

Quadro 4. Estadiamento clínico TNM para carcinoma de glândula salivar maior proposto por *American Joint Committee on Cancer*.*

Estágio I	T1	N0	M0
Estágio II	T2	N0	M0
Estágio III	T3	N0	M0
	T3	N1	M0
	T2	N1	M0
	T1	N1	M0
Estágio IV	Qualquer T	N2	M0
	Qualquer T	N3	M0
	Qualquer categoria com T4		
	Qualquer categoria com M1		

* Dados modificados de Beahrs et al (1988).

Quadro 5. Características e critérios utilizados no sistema de gradação para carcinoma mucoepidermoide de glândulas salivares proposto por Brandwein et al (2001).

CARACTERÍSTICAS	Pontos
Componente cístico < 25%	2
Atipia nuclear pronunciada	2
Invasão Perineural	3
Necrose	3
> 4 mitoses/10 HPF	3
Invasão tumoral em pequenos ninhos e ilhas	3
Invasão vascular e/ou linfática	3
Invasão Óssea	3
GRAU DE MALIGNIDADE	Pontos
Baixo	0
Intermediário	2-3
Alto	4 OU MAIS

*HPF – high power fields (campos de maior aumento, 400x)

1.4 Quimiocinas e Angiogênese Tumoral

O curso clínico e desfecho final de muitos pacientes com tumores de glândulas salivares não pode ser previsto com certo grau de segurança baseado apenas nas características clínicas e histopatológicas da lesão. Desta maneira, faz-se necessário o uso de marcadores de prognóstico que visem a melhor caracterização do comportamento tumoral, identificação do perfil do paciente e da fisiopatologia da doença (BARNES et al, 2005; BEN-IZHAK et al, 2007).

Nesse contexto, as quimiocinas ou citocinas pró-inflamatórias, que representam importantes reguladores das interações e adesões celulares, podem contribuir na elucidação de informações importantes durante o curso clínico das lesões neoplásicas, tendo em vista que as células tumorais epiteliais produzem quimiocinas, dentre as quais CCL2 e CXCL12 [Fator-1 derivado de células do estroma (SDF1)] (BALKWILL, 2004, DORING et al, 2014).

As quimiocinas, ou citocinas quimiotáticas, constituem uma família de aproximadamente 50 proteínas, de 8 a 12kD. São divididas em quatro classes, baseado no número e localização dos resíduos de cisteína N-terminais (KUFAREVA et al, 2015). As principais classes de quimiocinas são as CC (β), em que os resíduos de cisteína são adjacentes, e classe CXC (α) quando existe um aminoácido intercalado entre os resíduos de cisteína (ROBBINS et al, 2005; DEVRIES et al, 2006; ABBAS et al, 2011).

Quimiocinas de classe CC e CXC são produzidas pelos leucócitos, células endoteliais, epiteliais e fibroblastos, podendo ter produção induzida pelo TNF e IL- 1. A classe CC regula células T, B e recrutamento de outras células da medula óssea, tais como monócitos e células dendríticas. A quimiocina CXC regula o recrutamento de linfócitos e neutrófilos (DEVRIES et al, 2006; ROSTÈNE, 2007; HEMBRUFF et al, 2009).

A quimiocina CXCL12 é uma proteína de aproximadamente 8 kDa, formada por cerca de 68 aminoácidos e tem como função a quimiotaxia de linfócitos T e monócitos, além de regular o ciclo celular e sobrevivência de demais células hematopoiéticas (WANG et al, 2006; KORTESIDIS et al, 2015; PAWIG et al, 2015). É constitutivamente expressa em vários órgãos: pulmão, fígado, cérebro, rins, coração, medula óssea, músculo esquelético e pele (DORING et al, 2014). Além destas estruturas, a expressão do CXCL12 pode ser observada em tecidos que

sofreram danos como enfarte cardíaco, isquemia, danos tóxicos ao fígado, hemorragia excessiva, irradiação do corpo e quimioterapia (HEMBRUFF, 2009; TEICHER, FRICKER, 2010).

A maioria das quimiocinas liga-se a vários receptores, e o mesmo receptor pode ligar-se a mais de uma quimiocina. Por vezes determinados receptores (como o CXCR4) se ligam a quimiocinas específicas como o CXCL12 (BALKWILL, 2004; TEICHER, FRICKER, 2010).

A proteína CXCR4 é um receptor transmembranar acoplado a proteína G, formado por cerca de 3502 aminoácidos. É um regulador crítico do processo de recrutamento de células progenitoras endoteliais durante o desenvolvimento e hematopoese (WANG et al, 2006; WEN et al, 2008), sua expressão é significativa em células hematopoiéticas, cerebrais, pulmonares, cardíacas, hepáticas, renais, endoteliais, da microglia, neuronais, células progenitoras endoteliais e de músculo liso (GUPTA et al, 1998; HORI et al, 1998; MURDOCH, MONK, FINN, 1998).

De forma semelhante à CXCL12, o CXCR4 é constitutiva e amplamente expresso em diversas células e tecidos. Ao ligar-se ao CXCR4, a CXCL12 age estimulando modificações no citoesqueleto e polimerização de filamentos de miosina e actina (TEICHER, FRICKER, 2010; NASSER et al, 2011; KUFAREVA et al, 2015). As células neoplásicas que expressam CXCR4 funcional apresentam potencial de migrar e invadir na presença de CXCL12. Nos tecidos normais, as fibras de actina se ancoram nas áreas de adesões focais (ligações entre a célula e a matriz extracelular (MEC), formadas por quinase de adesão focal (FAK) e vinculina, as quais ligam as integrinas para o citoesqueleto de actina) possibilitando a tração celular e reorganização da MEC. Os sinais produzidos modificam a conformação das integrinas de superfície celular, aumenta a afinidade com os respectivos ligantes e permite a migração celular (TEICHER, FRICKER, 2010; NASSER et al, 2011; KUFAREVA et al, 2015). Além disto, a CXCL12 e seu receptor CXCR4 regulam a migração de células progenitoras hematopoiéticas da medula óssea e linfócitos para os locais da inflamação, tendo assim, importante papel na resposta inflamatória e na hematopoese (ZOU et al, 1998; SHARMA et al, 2014).

Além disto, outro fenômeno crucial para o desenvolvimento tumoral é a formação de vasos e suprimento sanguíneo. A formação de vasos sanguíneos é um fenômeno crucial em estágios embrionários (vasculogênese) e diante de condições fisiológicas na vida adulta (ALBRECHT, PEPE, 2011; SAWADA et al, 2014), mas

também está envolvida no desenvolvimento de tumores sólidos, favorecendo seu crescimento e disseminação no tocante a tumores malignos (WELTI et al, 2013). Foi relatado que o CXCL12 desencadeia a atividade angiogênica tumoral, mediando a regulação positiva do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (WAG et al, 2005). Além de que os receptores destas quimioquinas CXCR1, CXCR2 e CXCR4 são expressos nas células endoteliais (SHING et al, 2011), nas células do fígado fetal (BURNS et al, 2006) e placenta (TRIPATHI et al, 2009).

Tais características sugerem que, como o CXCR4 desempenharia um papel na regulação da angiogênese, trânsito de células-tronco e mediação de metástases específicas de órgãos com câncer (SUN et al, 2010). Assim, o eixo CXCL12 / CXCR4 também desempenha um papel importante na migração celular, angiogênese e progressão tumoral de alguns tipos de câncer, como de pâncreas (BILLADEAU et al, 2006) e mama (XU et al, 2015).

O CXCR4 é sobreexpresso em vários tipos de neoplasias, incluindo o câncer de mama e de pâncreas (NASSER et al, 2011; SHEN et al, 2013). A expressão desse receptor de quimiocina tem sido correlacionada com o pior prognóstico, como observado em alterações malignas de órgãos sólidos (BALKWILL, 2004; BRYANT et al, 2015).

O CXCL12 tem capacidade de mobilizar e recrutar as células neoplásicas para locais neo-angiogênicos, promovendo a revascularização do tecido isquêmico e o crescimento do tumor (BALKWILL, 2004). O aumento da migração celular para locais que expressem CXCL12 é dependente da ativação do Fator de indução de hipóxia (HIF) e estabilização da transcrição do CXCR4 nos tumores malignos. Mutações em genes que alterem os níveis de HIF e VEGF podem aumentar temporariamente a expressão do CXCR4 nas células que não expressam normalmente este receptor (ZEELLENBERG, 2001).

Os fibroblastos associados a tumores produzem e liberam diversos fatores de sinalização e componentes extra-celulares importantes para a progressão tumoral, incluindo CXCL12 ou fator 1 α (SDF-1 α) (GUO et al, 2016). Neste contexto, Sun et al (2010) sugerem que a secreção de CXCL12 por fibroblastos e expressão de CXCR4 em células tumorais, dentro de áreas hipóxicas de tumores, desencadeia crescimento, motilidade e invasividade de tais células. Sendo assim, os autores enfatizam a importância destas proteínas na progressão do tumor através da secreção de CXCL12, em detrimento a tecidos normais da próstata. Begley et al

(2005) também demonstraram que CXCL12 em tumores de próstata pode induzir o recrutamento de progenitores endoteliais, que permitem a angiogênese tumoral. Além disso, os gradientes de CXCL12 atraem células tumorais positivas para CXCR4 para nichos distantes de sua origem (BEGLEY et al, 2005, KAPLAN, et al, 2005, YILMAZ et al, 2006).

Kryczek et al (2005) demonstraram a interação entre CXCL12 e o VEGF. O VEGF regula a expressão do CXCR4 em células endoteliais, agindo de forma sinérgica à migração de tais células quando mediadas por CXCL12. Estes autores relatam que a hipóxia sincronicamente induz as células tumorais a produzirem CXCL12 e VEGF. Portanto, a hipóxia tumoral desencadeia a produção de CXCL12 (junto a outros fatores) para formar um eixo angiogênico sinérgico *in vivo*. Sinais induzido por hipóxia seriam fatores cruciais para iniciar a via angiogênica ativa mediada por proteínas e fatores de crescimento. Assim, interromper este eixo sinérgico seria uma importante manobra na luta contra o câncer (KRYCZEK et al, 2005).

O aumento da migração celular para locais que expressam CXCL12 é dependente da ativação do Fator de indução de hipóxia (HIF) e estabilização da transcrição do CXCR4 nos tumores malignos. Mutações em genes que alterem os níveis de HIF, VEGF e estrogênio podem aumentar temporariamente a expressão do CXCR4 nas células que não expressam normalmente este receptor. De forma semelhante o CXCL12 estimula a indução de outras citocinas pro-inflamatórias (TNF- α) quando células tumorais do ovário cultivadas apresentam condições de sobrevivência abaixo do ideal, acarretando no estabelecimento de redes e promoção de crescimento tumoral (BALKWILL et al, 2004; TEICHER et al, 2010).

É sabido que a CXCL12 e seu receptor CXCR4 têm sido associados à metástases e aumento do crescimento tumoral através de mecanismos tais como proliferação, sobrevivência, angiogênese, migração e resistência a fármacos em diferentes neoplasias (TOULLEC et al, 2010; SINGH et al, 2010; COSTA; SCHOLER-DAHIREL; MECHTA-GRIGORIOU, 2014), além de que a expressão do CXCR4 é um fator prognóstico independente para a recidiva e sobrevida em pacientes com alguns tipos de câncer, como os de mama (XU et al, 2013; ZHANG et al, 2014).

Partindo dessas premissas, Lefort et al (2017) testaram a atividade antitumoral dos inibidores de CXCR4 em dois tipos diferentes de câncer de mama,

dicotomizados de acordo com sua resposta a tratamentos convencionais, e observaram que alguns inibidores de CXCR4 foram capazes de diminuir o crescimento tumoral de um tipo de tumor, através da diminuição da angiogênese. Em contraste, os mesmos inibidores não foram capazes de reduzir o crescimento tumoral dos outros modelos e poderiam aumentar a disseminação metastática em 25% dos casos, sendo caracterizados por expressão elevada de CXCL12. O teor de miofibroblastos foi afetado após a inibição de CXCR4 em todos os modelos analisados (mesmo nos modelos resistentes) argumentando que apenas o impacto do anti-CXCR4 no estroma não é suficiente para inibir o crescimento tumoral. A migração de células neoplásicas dependentes de CXCL12 também foi associada a macrófagos e sua conversão cruzada com células tumorais, além destes tumores não demonstrarem qualquer variação na composição de células hematopoiéticas circulantes no sangue periférico, ou em tumores, na presença de inibidores de CXCR4.

Wang et al (2014) estudaram as relações de fibroblastos associados a câncer nasofaríngeos e quimiocinas relacionadas a angiogênese, através de análise imunohistoquímica de alfa-actina para músculo liso (α -SMA), fator-1 derivado do estroma (SDF-1) e seu receptor CXCR4 em comparação a cânceres primários de nasofaringe (CNF) e tecidos com alterações crônicas da nasofaringe. Além disso, investigaram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) a microvasos positivos para CD34, através da densidade Microvascular (DMV). As intensidades imunorreativas de CXCL12 (SDF-1) e CXCR4 foram significativamente maiores nas células do CNF. A DMV foi significativamente maior no estroma de tecidos de CNF em comparação com os tecidos com alterações crônicas na nasofaringite. Esse estudo sugeriu que tumores associados a fibroblastos e células tumorais do CNF podem aumentar a atividade angiogênica de forma dependente da expressão de VEGF e SDF-1, culminando no recrutamento de células progenitoras endoteliais (EPCs) da medula óssea para o estroma tumoral.

Sorrentino et al (2016) estudaram os fibroblastos associados a tumores (FAP), examinando a expressão de CXCL12 em amostras de melanoma usando um anticorpo específico (Bay60-6583). Seus resultados mostraram que a expressão de CXCL12 foi maior nos tecidos de ratos tratados com Bay60-6583 em comparação com controles. As células positivas CXCL12 foram FAP positivas, confirmando que os fibroblastos constituíram uma fonte importante de CXCL12 nas condições

experimentais. CXCL12 e seu receptor CXCR4 mostraram também ser importantes para angiogênese tumoral. Tal estudo utilizou um antagonista seletivo do receptor CXCR4 denominado AMD3100. O AMD3100 foi administrado a ratos portadores de melanoma nas regiões peritumorais, afim de se avaliar diretamente o envolvimento da via CXCL12 /CXCR4 em efeitos mediados por receptores de tirosina no ambiente tumoral, minimizando possíveis efeitos sistêmicos dessa molécula. O tratamento com AMD3100 bloqueou os efeitos pró-tumorais de Bay60-6583 e reduziu significativamente o crescimento do tumor nos ratinhos portadores de melanoma. O crescimento de melanoma em ratos que foram tratados com um antagonista do receptor de tirosina (Bay60-6583) foi atenuado pela inibição da via CXCL12 / CXCR4 (através do AMD3100). Este estudo concluiu que CXCL12/CXCR4 estão envolvidos na angiogênese e na supressão imune. O tratamento de camundongos com AMD3100 reduziu o número de células CD31+ induzidas por Bay60-6583.

Muller et al (2005) compararam tipos heterogêneos de carcinomas de cabeça e pescoço com relação a sua disseminação metastática. Para análise da expressão dos receptores de quimiocinas, mediante citometria de fluxo, utilizou-se diferentes reagentes para mais de 10 tipos de receptores do grupo CXC. A análise de abrangência foi a nível de mRNA e proteínas dos receptores de quimiocinas. A análise imunohistoquímica foi realizada nas amostras de tecidos para as proteínas do CXCR4 e CXCR7. Observou-se que o CEC expressou predominantemente de forma homogênea os receptores para quimiocinas em linfonodos, incluindo receptor de quimiocina CXCR7 e CXCR5. Enquanto que estes receptores estiveram ausentes ou pobremente expressos nas células do carcinoma adenoide cístico CAC, estes expressaram principalmente o CXCR4. Além disso o ensaio imunohistoquímico com CXCL12 demonstrou relação com o suprimento na taxa de apoptose induzida por cisplatina, sugerindo que a sinalização via CXCR4 pode ser parte de um mecanismo de sobrevivência de células tumorais. Tal estudo demonstrou que as células destes carcinomas exibem um perfil distinto de expressão de receptores de quimiocinas.

Partindo do pressuposto que mecanismos responsáveis pelo comportamento metastático das células dos tumores de glândulas salivares não estão totalmente compreendidos. Uchida et al (2012) investigaram o papel da expressão do CXCR4 no comportamento metastático de tumores de glândulas salivares por imunohistoquímica, bem como a expressão do mRNA e proteínas associadas a tal receptor por meio RT-PCR quantitativa e Western Blot, respectivamente. A

expressão de mRNA e da proteína CXCR4 foi frequentemente regulada positivamente em 5 de 6 linhagens celulares destes tumores. A expressão funcional de CXCR4 foi demonstrada pela capacidade dessas linhagens celulares de tumores de glândulas salivares (TGS) migrarem através de um gradiente CXCL12 positivo. O CXCL12 rapidamente ativou cinase regulada por sinal extracelular (ERK) em tais células. A análise imunohistoquímica revelou que a expressão da proteína CXCR4 foi detectada no núcleo ou no citoplasma de células neoplásicas em 16 dos 20 carcinomas adenóides císticos (CAC) e em 4 dos 6 carcinomas mucoepidermóides. Um antagonista do CXCR4 (AMD3100) inibiu significativamente a metástase pulmonar das células do CAC e melhorou a perda de peso corporal e taxa de sobrevivência de ratos portadores de tumor. Os autores concluíram que a expressão do CXCR4 contribui para o potencial metastático nas neoplasias de glândulas salivares.

WEN et al (2008) citam que o silenciamento da expressão endógena do gene de CXCR4 em células de carcinomas mucoepidermóides de alto grau resultou na inibição da proliferação, adesão, quimiotaxia e invasão de tais células *in vitro*. Nesse estudo, os autores avaliaram a imunexpressão de CXCR4 no CME com diferentes graus de malignidade, relatando que o CXCR4 foi significativamente expresso na linhagem de células com perfil metastático e de alto grau, no entanto a expressão do CXCL12, em todas as linhagens celulares foi semelhante. Este estudo demonstrou que o receptor CXCR4 é um fator potencial que controla a proliferação e a metástase das células com um fenótipo metastático.

1.5 CD31 e a Densidade Microvascular

O CD31, ou molécula de adesão de células endoteliais/plaquetárias (PECAM-1), é um receptor hemofílico transmembranar que é expresso por células endoteliais (ECs), plaquetas, células do sistema imune como granulócitos, macrófagos, células dendríticas (CD) e células *Natural killers* (NK) e seus precursores, demonstrado desde estudos mais clássicos a atuais (NEWMAN et al, 1990; MULLER et al, 1993, NEWTON et al, 1999; KIPPS, 2001; DREWES et al, 2015).

Membro da superfamília do gene das imunoglobulinas (Ig), este receptor apresenta massa molecular de 130 kDa e é glicosilado diferencialmente, envolvendo

sítios de glicosilação ligados em N e O (NEWMAN et al, 2003; PRIVRATSKY et al, 2010). Além de suas interações homotípicas, já foram descritas interações heterotípicas para CD31, incluindo o antígeno específico para neutrófilos CD177 (NB1) (SACHS et al, 2007) e a ADP-ribosil ciclase CD38 (DEAGLIO et al, 1998).

Todos os linfócitos do sangue periférico de recém-nascidos expressam tal molécula, mas uma gama variável de linfócitos (células T de memória) carecem desta expressão em sua superfície na idade adulta (KOHLENER, THIEL, 2009; FEDERICA et al, 2013). Sua principal função é interação ou adesão entre células endoteliais ou células endoteliais e leucócitos, interagindo com a integrina $\alpha V/\beta 3$ e glicosaminoglicanos, além de ativar a integrina de leucócitos (KIPPS, 2001; MULLER et al, 1993). O fato de CD31 ser expresso de forma restrita a células imunológicas, plaquetas e células endoteliais (ECs), sugere que células do sistema imunológico especificamente requerem a sua atividade (FEDERICA et al, 2013). Tendo em vista que ECs e plaquetas também foram descritos como tendo papéis importantes no sistema imunológico, as ECs são capazes de apresentar antígenos e plaquetas, estando envolvidas no recrutamento de células imunes (POBER, TELLIDES, 2012). Observa-se que presença de CD31 também contribui no estabelecimento de interações entre células/plaquetas - linfócitos com o endotélio ou com plaquetas, para modular respostas imunes na parede vascular e para recrutar ou extravasar células imunes em tecidos inflamados e neoplásicos (FEDERICA et al, 2013).

Contar vasos sanguíneos tumorais de glândulas salivares através de resultados imunoistoquímicos (IHC) é um método comum para mensurar a atividade angiogênica (SHIEH et al, 2009). Weidner et al (1991), a partir de estudos com câncer de mama, introduziram um método de contagem de vasos através das áreas com maior quantidade de células vasculares (*hotspot*) que expressam marcadores para EC como o CD31. A análise da densidade microvascular (DMV) até hoje tem sido utilizada para determinar a vascularização neoplásica. A angiogênese correlaciona-se com o prognóstico dos cânceres nos mais diversos órgãos, tais como mama (MORI et al, 2016), estômago (BĂDESCU et al, 2012), cólon (TERANISHI et al, 2007), bexiga urinária (EL-KOTT et al, 2006), bem como lesões de cabeça e pescoço (OTA et al, 2010). No entanto, a angiogênese dos tumores de glândulas salivares (TGS) mediada pela ação do complexo CXCL12/CXCR4 tem recebido atenção limitada na literatura.

Estudos sugerem que a DMV em TGS pode ser demonstrada através da imunoeexpressão de CD31 (SWELAM et al, 2005; DHANUTHAI et al, 2013). A DMV mensurada pela marcação do CD31 apresenta correlação superior em comparação com o CD105 (DHANUTHAI et al, 2013).

O aumento da DMV atua de forma importante em condições fisiológicas e patológicas. A angiogênese é um processo que compreende várias etapas. Sendo a demanda metabólica o principal fator que contribui para a densidade de vasos, que frequentemente aumenta durante a progressão tumoral (SHARMA et al, 2005; YANG et al, 2011).

O estudo de Moghadam et al (2015) concluiu que a demanda metabólica das células malignas explica o fato de que os carcinomas de glândulas salivares, independentemente do padrão e do tipo de célula, apresentaram DMV significativamente maior do que os AP. Além disso, DMV está correlacionado com a densidade celular da AP, provavelmente porque as áreas ricas em células precisam de mais oxigênio.

Através da expressão imunoistoquímica de CD105, Gleber-Netto et al (2012) avaliaram a DMV de carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores, e demonstraram que vasos neoformados constituem achados comuns nas áreas intratumorais e peritumorais do CME. Tais autores demonstraram que a angiogênese foi comumente mais observada nas áreas intratumorais do que nas áreas peritumorais. A DMV nas áreas intratumorais foi maior em pacientes jovens do que em idosos, e esteve associada a recorrência e disseminação nodal destas lesões. No entanto, este estudo não encontrou associação entre tipo de célula predominante e DMV em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores.

Tendo em vista a escassez de informações que analisem a expressão e influência da CXCL12/CXCR4 sobre a angiogênese tumoral e conseqüentemente sobre o comportamento biológico de neoplasias glandulares salivares, justifica-se a realização do presente estudo. Buscou-se correlacionar parâmetros clínico-patológicos de uma série de APs e CMEs com a imunoeexpressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em relação à atividade angiogênica tumoral mensurada mediante a análise da expressão do CD31, no intuito de obter informações que contribuam ao conhecimento do papel de tais proteínas na

angiogênese tumoral e no comportamento biológico e prognóstico dessas neoplasias.

OBJETIVOS



2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O presente estudo avaliou a expressão imunoistoquímica da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermoides de glândulas salivares, relacionando-a com parâmetros clinicopatológicos e à atividade angiogênica tumoral mediante a análise da densidade microvascular (MDV) mensurada através da expressão do CD31, no intuito de obter maiores informações que contribuam ao conhecimento do papel de tais proteínas na angiogênese tumoral e consequentemente no comportamento biológico e prognóstico dessas neoplasias.

2.2 Objetivos Específicos

- Caracterizar o perfil clínico e histopatológico de uma amostra de adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermoides;
- Analisar se existe relação entre os parâmetros clinicopatológicos da amostra avaliada e a expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4 e CD31;
- Analisar se existe relação entre a imunoexpressão de CXCL12/CXCR4 e a densidade microvascular obtida através da imunoexpressão de CD31 em adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermoides;
- Analisar se existe diferença da localização (intratumoral e peritumoral) da expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4 e densidade microvascular (CD31) em relação ao tipo de neoplasia de glândula salivar;
- Analisar se existe relação entre a expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4 e a densidade microvascular (CD31) considerando os tipos histológicos do adenoma pleomórfico;

- Analisar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4 e a densidade microvascular (CD31) e grau histológico de malignidade do carcinoma mucoepidermoide.

MATERIAIS E MÉTODOS



3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Caracterização do estudo

O presente estudo apresenta delineamento transversal com caráter descritivo probabilístico e correlacional dos parâmetros clinicopatológicos de uma série de adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermoides de glândulas salivares em relação a uma análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão imunohistoquímica das proteínas CXCL12, CXCR4 e CD31 nas lesões citadas.

3.2 População

Todos os casos de AP e CME registrados e diagnosticados nos Arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da UEPB – Campina Grande; do Arquivo de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano - João Pessoa-PB; do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG - Belo Horizonte - MG; do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG (LPD-FOUFMG) - Belo Horizonte-MG; da Associação de Combate ao Câncer Hospital Araújo Jorge - Goiânia-GO; e do Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Goiás, Goiânia-GO.

3.3 Amostra

A amostra foi intencional, baseada na quantidade de material disponível no bloco e constituída 25 amostras teciduais de APs e 25 CMEs proveniente de glândulas salivares maiores e menores.

3.4 Critérios de Seleção da Amostra

3.4.1 Critérios de inclusão

- Foram incluídos espécimes provenientes de ressecção cirúrgica, biopsia excisional de glândulas salivares maiores e menores cujos blocos em parafina estavam em bom estado e com quantidade suficiente de material necessário para análise;
- Foram incluídos os espécimes cujas fichas clínica estavam devidamente preenchidas.

3.4.2 Critérios de exclusão

- Excluiu-se os espécimes cujas fichas não estavam devidamente completas, referente aos dados clínicos dos pacientes.

3.5 Coleta dos dados Epidemiológicos

O procedimento de coleta dos dados epidemiológicos baseou-se nas informações constantes nas fichas de registro, prontuários e laudos de exame histopatológico da amostra, os quais foram transcritos para uma ficha padrão especialmente confeccionada para esta análise. Idade, sexo, cor de pele do paciente, localização anatômica da lesão, tamanho e características histopatológicas corresponderam às variáveis estudadas.

3.6 Estudo Histomorfológico

Todos os espécimes eram fixados em formol a 10% e embebidos em parafina. Para análise microscópica foram analisados cortes de 5µm corados em hematoxilina e eosina, e reavaliados quanto ao diagnóstico histológico. A análise morfológica foi realizada de acordo com os seguintes critérios: os casos de AP foram classificados de acordo com Seifert et al (1976) como tipo clássico (tipo I) os que apresentavam-se com cerca de 50% de estroma e 50% de células; tipo estromal (tipo II) os casos com predominância de estroma; tipo celularizado (tipo III) que

apresentavam predomínio (70%) de células, e tipo monomórfico (tipo IV) os casos celularizados com arranjo predominante monomórfico das células. Após a classificação, a amostra foi dicotomizada, sendo o grupo A composto pelos tipos I e II e o grupo B composto pelos tipos III e IV, de acordo com Miranda Viana et al (2013). Ainda os casos de CME foram classificados histomorfologicamente de acordo com Brandwein et al (2001), nos quais foram avaliados a quantidade de componente cístico, front de invasão, atipia nuclear, invasão linfática, vascular, neural e óssea, além de necrose e número de mitoses. Cada característica apresenta um valor de escore que varia de 2 a 3 pontos, ao final da soma dos escores o grau de malignidade foi dado: grau I apresenta valor 0, grau II varia de 2 a 3 pontos, e Grau III equivale a quatro ou mais pontos.

3.7 Variáveis do estudo

Quadro 6. Variáveis dependentes do estudo:

VARIÁVEIS DEPENDENTES			
VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO	TIPO
IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA CXCL12	Percentual da Imunomarcagem das células neoplásicas pelo anticorpo anti-CXCL12 em AP e CME em localização intra e peritumoral.	CXCL12CMEperINTRA CXCL12CMEpercPERI CXCL12APpercINTRA CXCL12APpercPERI	Quantitativa discreta
IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA CXCR4	Percentual da Imunomarcagem das células pelo anticorpo anti-CXCR4 em AP e CME em localização intra e peritumoral.	CXCR4CMEperINTRA CXCR4CMEpercPERI CXCR4APpercINTRA CXCR4APpercPERI	Quantitativa discreta
PERCENTUAL DE IMUNOMARCAÇÃO CATEGORIZADO da CXCL12	Categorização do percentual de marcação do anticorpo anti-CXCL12	0 - Negativo 1- Até 10% 2- De 11 a 50% 3- Mais de 50%	Qualitativa Ordinal
PERCENTUAL DE IMUNOMARCAÇÃO CATEGORIZADO do CXCR4	Categorização do percentual de marcação do anticorpo anti-CXCR4	0 - Negativo 1- Até 10% 2- De 11 a 50% 3- Mais de 50%	Qualitativa Ordinal
DENSIDADE MICROVASCULAR INTRATUMORAL PARA O AP E CME	Imunomarcagem citoplasmática das células endoteliais vasculares pelo anticorpo anti-CD31.	Vasos sanguíneos positivos para o anticorpo	Quantitativa Discreta
DENSIDADE MICROVASCULAR PERITUMORAL PARA O AP E CME	Imunomarcagem citoplasmática das células endoteliais vasculares pelo anticorpo anti-CD31.	Vasos sanguíneos positivos para o anticorpo	Quantitativa Discreta

Quadro 7. Variáveis independentes do estudo:

VARIÁVEIS INDEPENDENTES			
VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO	TIPO
SEXO.AP/CME	Características físicas que definem o sexo dos indivíduos	1 – masculino 2 – feminino	Qualitativa nominal
COR.AP/CME	Característica racial do indivíduo	1- Branco 2 - Não Branco	Qualitativa nominal
IDADE.AP/CME	Idade em anos	- Valor numérico	Quantitativa discreta
LOCALIZAÇÃO DO AP/CME	Categorização das regiões anatômicas nas quais os CMEs foram diagnosticados	1 – palato mole 2 – palato duro 3 - parótida 4 - Submandibular 5 - outra	Qualitativa Nominal
TAMANHO.AP/CME	Tamanho do tumor	- Valor Numérico	Quantitativa Contínua
METASTASE REGIONAL DO CME	Metástase linfonodal regional	1 - Sim 2 – Não	Qualitativa nominal
METASTASE A DISTÂNCIA DO CME	Metástase à distância	0 – Não 2 - M1 - Sim	Qualitativa nominal
GRADAÇÃO.CME	Gradação Histológica dos CMEs	1 – I (Baixo grau) 2 – II (grau intermediário) 3 – III (alto grau)	Qualitativa Ordinal
RADIOTERAPIA.CME	Informações dos pacientes submetidos a radioterapia	1 – Sim 2 – Não	Qualitativa nominal
DESFECHO.CME	Informações referentes ao desfecho do caso	1 – vivo 2 – morto	Qualitativa Nominal
CIRURGIA.CME	Informações dos pacientes submetidos a cirurgias adicionais	1 – sim 2 – não	Qualitativa Nominal
RECIDIVA.CME	Informações dos pacientes que apresentaram recidiva	1 – sim 2 – não	Qualitativa Nominal
SOBREVIDA.CME	Tempo em meses da sobrevida dos pacientes registrados nos prontuários até a data da análise	- Valor numérico	Quantitativa discreta
ESTADIAMENTO CLÍNICO DO CME (TNM)	Classificação dos tumores por meio de critérios clínicos TNM	1 - Estágio I 2 - Estágio II 3 - Estágio III 4 - Estágio IV (A, B e C)	Qualitativa ordinal
ESTADIAMENTO CLÍNICO (TNM) CATEGORIZADO	Categorização dos Estágios Clínicos de acordo com grau de estadiamento	1 - Estágio I/ II 2 - Estágio III/IV	Qualitativa nominal
ARRANJO.AP	Categorização dos APs de acordo com variações histomorfológicas nos estromas das lesões	1- ductiforme 2 - cístico 3 - ninhos e ilhas 4 – cordões 5 – sólido ou lençóis	Qualitativa Nominal
ESTROMA.AP	Categorização dos APs de acordo com variações histomorfológicas	1 – mixoide 2 - hialino	Qualitativa Nominal

	nos estromas das lesões	3-condroid/osteóide	
SEIFET.AP	Análise histomorfológica dos APs e subsequente categorização em 4 subtipos de acordo com as características histológicas	1 - Tipo I: 50% de estroma e 50% de células; 2 - Tipo II: Estromal - predominância de estroma; 3 - Tipo III: Celularizado - subtipos apresentavam predomínio, (70%), de células 4 - Tipo IV monomórfico	Qualitativa Ordinal
SEIFET.CAT.AP	Dicotomização dos APs, sendo o grupo A composto pelos tipos I e II e o grupo B composto pelos tipos III e IV, de acordo com Miranda Viana et al (2013)	1 – A: Clássico e estromal 2 – B: Celularizados	Qualitativa Nominal

3.8 Estudo Imunoistoquímico

3.8.1 Método imunoistoquímico para o anticorpo policlonal anti-CXCL12

Dos espécimes selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, foram obtidos cortes de 3 µm de espessura que foram estendidos em lâminas de vidro previamente preparadas com organossilano (*3-aminopropyltrithoxysilano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*). Para o anticorpo policlonal anti-CXCL12 foi utilizada a técnica da imunoperoxidase pelo método da imunoistoquímico da Estreptoavidina-biotina (*Novolink, Novocastra*).

Os cortes foram desparafinados e submetidos à recuperação antigênica e incubados com os anticorpos selecionados, de acordo com as especificações do fabricante. Para inativação da peroxidase endógena, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogénio. As reações foram desenvolvidas com diaminobenzidina (*Novolink, Novocastra*) 0.03% como cromógeno e o material foi contra-corado com hematoxilina (*Nonolink, Novocastra*).

Para verificação da efetividade da técnica foram utilizados como controle negativo, para todas as análises, foi obtido mediante a substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino a 1% (*BSA – Bovine Serum Albumin*) em solução tampão.

A técnica da imunoperoxidase baseada em polímeros de dextrano foi realizada conforme o protocolo do Laboratório de Patologia e Imunoistoquímica do

Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Goiás, Goiânia-GO, e segue abaixo:

- Desparafinização através de 2 banhos em xilol, sendo o primeiro banho em uma temperatura de 60°C durante 10 minutos, e o segundo em temperatura ambiente por um período de 10 minutos.
- Rehidratação em cadeia cendente de etanóis;
 - Álcool absoluto I (5 min),
 - Álcool absoluto II (5 min),
 - Álcool absoluto III (5 min),
 - Álcool 95° GL (5 min),
 - Álcool 70° GL (5 min),
- Lavagem do material em água corrente por 10 minutos e duas passagens por água destilada deionizada;
- Recuperação antigênica em solução de citrato pH 6,0 a temperatura de 97,5° em banho maria;
- Resfriamento dos cortes até atingir a temperatura ambiente;
- Passagem em água corrente durante 10 minutos;
- Imersão em água destilada, 2 vezes, com tempo de 5 minutos cada;
- Incubação dos cortes, durante 5 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- Lavagem em água corrente durante 10 minutos;
- Imersão em água destilada, 2 vezes, com tempo de 5 minutos cada;
- Imersão dos cortes em solução TBS, pH 7.4, por 2 vezes, durante 5 minutos cada;
- Incubação dos cortes com o anticorpo primário diluído conforme determinação do fabricante, preparados com albumina bovina (BSA) a 1%;
- Lavagem em TBS, pH 7.4– 2 trocas (5 minutos cada);
- Incubação do *Postprimary* (Novlink, novocastra) por 30min;
- Incubação do *Polymer* (Novolink, Novocastra) por 45 min;
- Lavagem em TBS, pH 7.4– 2 trocas (5 minutos cada)
- Aplicação do agente cromógeno diaminobenzidina (DAB), durante 7 minutos;
- Lavagem em água corrente e água destilada durante 10 minutos;

- Contracoloração utilizando hematoxilina (Novolink, Novocastra) durante 7 minutos;
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool 80° GL (3 minutos),
 - Álcool 95° GL (3 minutos),
 - Álcool absoluto I (3 minutos),
 - Álcool absoluto II (3 minutos),
 - Álcool absoluto III (3 minutos),
 - Álcool absoluto IV (3 minutos),
- Imersão em xilol I (2 minutos);
- Imersão em xilol II (2 minutos);
- Imersão em xilol III (2 minutos);
- Montagem em resina *Permount* (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.8.2 Método imunistoquímico para os anticorpos monoclonais CXCR4 e CD31

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas e desengorduradas e preparadas com adesivo à base de 3aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Polymer/HRP/ADVANCE) utilizando os anticorpos monoclonais das proteínas CXCR4 e CD31 conforme Quadro 8. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão. A técnica utilizada seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);

- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos)
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (QUADRO 4);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo secundário (*Complement*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP Conjugated*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);

- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em resina *Permout®* (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.8.3 Especificidades dos anticorpos

Quadro 8. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários a serem utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Diluição	Tempo de incubação	Recuperação antigênica
CXCL12	FL-93*	1:150	Overnight	Steamer, 90°C Citrato pH 6.0
CXCR4	12G5***	1:750	60 minutos	Sem recuperação
CD31	clone QBEnd-10***	1:100	Overnight	Steamer, 90°C Citrato pH 6.0

* Santa Cruz Biotechnology, **Santa Cruz Biotechnology; ***Novocastra

3.9 Análise do Perfil Imunoistoquímico

A análise imunoistoquímica foi realizada por um examinador previamente treinado. Os cortes histológicos foram examinados por microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) sob aumento de 200x para identificação de 10 campos com maior celularidade, as áreas foram fotomicrografadas (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) no aumento de 400x. As imagens obtidas foram transferidas para um computador, com o auxílio do AxioVisioRel 4.8.

O número de células positivas e negativas foi determinado em cada campo microscópico por meio do programa *ImageJ® (Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA)*, permitindo o posterior cálculo do percentual (Índice de Positividade) de células imunomarcadas em relação ao número total, adaptando assim, a técnica preconizada por Oliveira et al (2014). Para a análise do CXCL12 foi considerada marcação positiva citoplasmática e nuclear, para o CXCR4 foi considerada a marcação citoplasmática e para o CD31 foi considerada a marcação citoplasmática e/ou nuclear.

Em cada um dos 10 campos histológicos fotografados foram contadas 100 células aleatoriamente (com e sem imunomarcação), registrando o número de células positivas e de negativas em cada campo, seguidamente o número de células imunopositivas de cada campo será somado e obtido um índice de positividade (IP) em percentagem para as proteínas investigadas através da fórmula abaixo descrita:

$$IP = \frac{\text{Número de células positivas}}{1000 \text{ Células aleatórias}} \times 100$$

De posse do percentual de células imunopositivas em cada caso, a intensidade da positividade será classificada semi-quantitativamente considerando os seguintes escores (VERED et al, 2009):

- (-) Escore 0 – Negativo: quando nenhuma célula tumoral mostre positividade citoplasmática ou membranar;
- (+) Escore 1 – Baixo: quando 1 a 10% das células positivas exibam imunopositividade;
- (++) Escore 2 – Intermediário: quando 11 a 50% das células exibem positividade;
- (+++) Escore 3 – Alto: quando mais de 50% das células exibem positividade.

Foi considerada ainda a topografia celular da expressão da CXCL12, CXCR4 e CD31, ou seja, a presença de marcação acastanhada/marrom em membrana e/ou citoplasma.

A localização, ou seja, o local exato predominante da expressão imunohistoquímica das proteínas avaliadas será categorizada em: Células luminais, não luminais ou ambas.

Para determinação do índice angiogênico foi utilizada a técnica da densidade microvascular – DMV - (WEIDNER et al, 1991), sendo analisadas as áreas com maior número de vasos. As áreas de maior vascularização foram identificadas utilizando-se um aumento de 40x. Em seguida, a contagem dos vasos foi realizada em cinco campos, selecionados previamente como de elevada densidade vascular, com o microscópio de luz regulado para um aumento de 400x. De acordo com Weidner et al (1991) grupamentos celulares endoteliais imunopositivos, separados dos microvasos adjacentes e de outros elementos do tecido conjuntivo, foram considerados como um vaso unitário, assim como, também, os vasos contendo lúmen. Estruturas ramificadas foram contadas como vasos, mesmo com descontinuidade na sua estrutura. Os dados desta avaliação foram anotados em uma ficha desenvolvida para tal finalidade (APÊNDICE F).

3.10 Análise Estatística

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas.

Para a caracterização da amostra, valores médios e percentuais foram estabelecidos por meio de análise estatística descritiva. Os dados obtidos com as análises das DMVs e das imunoexpressões do CXCR4 e do CXCL12 foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças nas medianas das DMVs e dos percentuais de positividade para CXCR4 e CXCL12, entre APs e CMEs, foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. De maneira similar, as comparações das medianas em relação aos parâmetros clinicomorfológicos (tipo de glândula salivar, subtipo histopatológico dos APs e grau histopatológico de malignidade dos CMEs) foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Possíveis correlações entre as DMVs e as imunoexpressões de CXCR4 e CXCL12 foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

3.11 Considerações Éticas

O presente foi registrado na Plataforma Brasil e seguidamente submetido à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB. Tal estudo foi aprovado segundo o número de parecer: 1.435.401 (ANEXO A). Para a maioria dos casos selecionados, por serem material de arquivo e devido à dificuldade de obter contato com os pacientes, foi solicitada a dispensa do Termo de Consentimento Livre Esclarecido – TCLE.

As informações nesta pesquisa foram coletadas através dos prontuários dos pacientes e de cortes histológicos dos blocos parafinados pertencentes ao arquivo do Laboratório de Patologia do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB e do Hospital Napoleão Laureano (Apêndice A) e autorização de tais instituições será solicitada.

ARTIGO



4 ARTIGO A SER SUBMETIDO

A presente pesquisa foi desenvolvida após apresentação em qualificação no Programa de Pós-Graduação em odontologia da UEPB. Como resultado da mesma, segue o artigo intitulado “***Imunoexpressão de CXCL12, CXCR4 e densidade microvascular em Adenomas Pleomórficos e Carcinomas Mucoepidermóides de glândulas salivares***” que será apresentado como fruto desta dissertação.

Após as devidas considerações da banca de defesa desta dissertação, o artigo será colocado nas normas e traduzido para Inglês e posteriormente submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de Impacto: 1.859, Qualis para Odontologia: A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no anexo B.

IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, CXCR4 E DENSIDADE MICROVASCULAR EM ADENOMAS PLEOMÓRFICOS E CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES DE GLÂNDULAS SALIVARES

IMMUNO-EXPRESSION OF CXCL12, CXCR4 AND MICROVASCULAR DENSITY IN PLEOMORPHIC ADENOMAS AND CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES OF SALIVARY GLANDS

AUTORES:

Rodolfo de Abreu Carolino¹, Aline Carvalho Batista², Elismauro Francisco Mendonça², Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Maria Cássia Ferreira Aguiar³, Pollianna Muniz Alves¹, Manuel Antonio Gordón-Nuñez¹

1. Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, Brasil.

2. Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, Brasil.

3. Departamento de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brasil.

Autor correspondente:

Manuel Antonio Gordón-Nuñez

Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Tecnologia e Saúde, Curso de Odontologia. Rua Coronel Pedro Targino s/n -Centro. CEP: 58233-000- Araruna, PB – Brasil Telefone: (83) 33731040. E-mail: gordonnunez162531@gmail.com

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunohistoquímica da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em adenomas pleomórficos (APs) e carcinomas mucoepidermóides (CMEs) das glândulas salivares, relacionando-a a parâmetros clínicos e patológicos e à atividade angiogênica tumoral por meio da densidade microvascular (DMV). Através do método da imunoperoxidase, com anticorpos anti-CXCL12, anti-CXCR4 e anti-CD31, sob microscopia de luz, foram estabelecidos percentuais de células neoplásicas imunomarcadas nas regiões intratumorais e peritumorais de uma amostra de APs e CMEs de glândulas salivares. A maioria dos APs e todos os CMEs foram positivos para CXCL12, com diferença estatisticamente significativa na expressão dessa proteína em relação ao tipo de neoplasia. Todos os APs e CMEs foram positivos para CXCR4, com discreta diferença estatisticamente significativa na expressão dessa proteína na região peritumoral em relação ao tipo de neoplasia. Correlação positiva foi observada na expressão da CXCR4 entre as regiões intratumoral e peritumoral da amostra. Foi observada diferença estatisticamente significativa da DMV em relação ao tipo de neoplasia, destacando-se CMEs. Houve correlação positiva da DMV entre as regiões intratumoral e peritumoral dos APs e CME. Conclui-se que embora as neoplasias analisadas tenham comportamento biológico distinto, parecem exibir expressão semelhante da CXCL12 e CXCR4, no entanto, o complexo CXCL12/CXCR4 parece não ser um fator preponderante em relação à atividade angiogênica tumoral. A maior DMV intratumoral em CMEs e peritumoral em APs provavelmente sejam influenciadas por outros fatores ou fenômenos sinérgicos à ativação do complexo CXCL12/CXCR4 no intuito de garantir o aporte sanguíneo necessário para a progressão tumoral.

Palavras chave: Adenoma pleomórfico. Carcinoma mucoepidermóide. CXCL12, CXCR4, CD34.

ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of the CXCL12 chemokine and its CXCR4 receptor in pleomorphic adenomas (PAs) and mucoepidermoid carcinomas (MECs) of the salivary glands, relating it to clinical and pathological parameters and to tumor angiogenic activity through microvascular density (MVD). Through the immunoperoxidase method, with antibodies anti-CXCL12, anti-CXCR4 and anti-CD31, under light microscopy, it has been established percentages of neoplastic cells immunostained in the intratumoral and peritumoral regions of salivary glands PAs and MECs. Most of the PAs and all of the MECs were positive for CXCL12, with a statistically relevant difference in the expression of this protein related to the neoplasia type. All of the APs and MECs were positive for CXCR4, showing a discrete statistically relevant difference in the expression of this protein in the peritumoral region related to the neoplasia type. It was found a statistically relevant difference of the MDV in relation to the neoplasia type, mainly about the MECs. Positive correlation of MDV was observed between the intratumoral and peritumoral regions of PAs and MECs. We conclude that, although the analyzed neoplasias show a distinct biological behavior, they seem to present a similar expression of the CXCL12 and the CXCR4, but the CXCL12/CXCR4 complex does not appear to be a meaningful factor in relation to the angiogenic tumoral activity. The most intratumoral MVD in MECs and peritumoral in APs probably suffer the influence of other factors or synergistic phenomena to the CXCL12/CXCR4 complex activation, in order to ensure the blood flow needed for a tumoral progression.

Key words: Pleomorphic adenoma. Mucoepidermoid carcinoma. CXCL12, CXCR4, CD31.

INTRODUÇÃO

A patogenia dos tumores de glândulas salivares como o adenoma pleomórfico e o carcinoma mucoepidermoide precisa ser melhor elucidada. Recentes pesquisas utilizam marcadores imunistoquímicos que buscam auxiliar a caracterização do comportamento tumoral e identificação da fisiopatologia da doença^{1, 6, 8}. Tendo em vista que as células neoplásicas epiteliais podem produzir citocinas quimioatrativas, destaca-se a imunexpressão destas proteínas as quais representam importantes reguladores das interações celulares².

A quimiocina CXCL12 é constitutivamente expressa em vários tecidos: pulmão, fígado, cérebro, rim, medula óssea, músculo esquelético e pele². A proteína CXCR4 é considerada o receptor principal para a quimiocina CXCL12, sendo esta também constitutiva e amplamente expresso em diversas células e tecidos humanos³. Sua interação com o CXCL12 permite mobilizar e recrutar as células progenitoras endoteliais para locais neo-angiogênicos, promovendo a revascularização do tecido isquêmico e o crescimento do tumor^{6, 16}. Além disso, este complexo regula o ciclo celular e sobrevivência de células hematopoiéticas⁴. A expressão da proteína CXCL12 e seu receptor CXCR4 têm sido associada a eventos como o crescimento e metástases tumorais através de mecanismos tais como proliferação⁴, sobrevivência⁸, angiogênese⁶, migração e resistência a fármacos em diferentes neoplasias⁵.

A angiogênese constitui um evento que correlaciona-se com a patogenia e, conseqüentemente, com o prognóstico das neoplasias nos mais diversos órgãos, como lesões de cabeça e pescoço⁶. A análise da densidade microvascular (DMV) tem sido utilizada para determinar a atividade angiogênica neoplásica, no entanto, tal evento é pouco conhecido em tumores das glândulas salivares (TGS), quando considerada a relação à regulação que poderia ser exercida pela quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4.

Tendo em vista a escassez de informações na literatura que analisem a expressão e influência da CXCL12 e seu receptor CXCR4 sobre a angiogênese tumoral e conseqüentemente sobre o comportamento biológico de neoplasias glandulares salivares, buscou-se correlacionar parâmetros clinicopatológicos de uma série de APs e CMEs com a imunexpressão da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 em relação à atividade angiogênica tumoral, mensurada mediante a análise

da DMV, determinada pela expressão do CD31, no intuito de obter maiores informações que contribuam ao conhecimento do papel de tais proteínas na angiogênese tumoral e conseqüentemente no comportamento biológico e prognóstico dessas neoplasias.

METODOLOGIA

Espécimes

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (Protocolo 1.435.401).

A amostra foi constituída por 25 casos de APs e 25 CMEs pertencentes aos arquivos do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa-PB; do Laboratório de Histopatologia Oral da Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande-PB, do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da UFMG, Belo Horizonte-MG; do Laboratório de Patologia Bucomaxilofacial da Faculdade de Odontologia da UFMG (LPD-FOUFMG), Belo Horizonte-MG, da Associação de Combate ao Câncer Hospital Araújo Jorge, Goiânia-GO; e do Laboratório de Patologia da Universidade Federal do Goiás, Goiânia-GO.

A amostra foi de conveniência, não probabilística, sendo selecionados casos provenientes de biópsia excisional e ressecção cirúrgica que apresentavam material suficiente para análise. Os dados clínicos coletados de prontuários e fichas de biópsia constaram de gênero, idade, localização, bem como estágio clínico (TNM) para os CMEs.

Análise morfológica

Os espécimes fixados em formol a 10% e incluídos em parafina foram analisados sob microscopia ótica utilizando cortes de 5µm corados em hematoxilina e eosina, e avaliados por um pesquisador. A análise morfológica dos APs foi realizada de acordo com os critérios de Seifert⁷ et al. (1976), em tipo clássico (tipo I) os que apresentavam cerca de 50% de estroma e 50% de células; tipo estromal (tipo II) os casos com predominância de estroma; tipo celularizado (tipo III) que apresentavam predomínio (70%) de células, e tipo monomórfico (tipo IV) os casos celularizados com arranjo predominante monomórfico das células. Após a

classificação, a amostra foi dicotomizada de acordo com Miranda Viana et al.⁸, sendo o grupo A composto pelos tipos I e II e o grupo B composto pelos tipos III e IV. A classificação dos CMEs foi realizada de acordo com os parâmetros histomorfologicos preconizados por Brandwein et al.⁹, mediante avaliação do componente cístico, front de invasão, atipia nuclear, invasão linfática, vascular, neural e óssea, além de necrose e número de mitoses. Cada característica apresenta um valor de escore que varia de 2 a 3 pontos, ao final da soma dos escores o caso foi classificado em Grau de malignidade. O grau I apresenta valor 0, grau II varia de 2 a 3 pontos, e Grau III equivale a quatro ou mais pontos.

Análise Imunoistoquímica

Os espécimes incluídos em parafinas foram cortados a 3µm de espessura e coletados por lâminas de vidro revestidas por organossilano a 2% (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo.,USA), foram diafanizadas em xilol e reidratados em álcool. A recuperação antigênica foi realizada em citrato, pH 6,0 a 97,5°C em banho maria para o anti-CXCL12, em citrato, pH 6,0 a 97,5° em steamer para o anti-CD31, e sem recuperação para o anti-CXCR4. Para todos os casos, a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pelo peróxido de hidrogênio a 3% (NovolinkTM, Novocastra) por 5 minutos. Seguiu-se a incubação em solução proteinblock (NovolinkTM, Novocastra) por 5 minutos. Os cortes foram imersos em solução de citrato (pH 7.4) por 30 minutos em 97,5°C para recuperação antigênica.

Para o anticorpo CXCL12 (FL-93, 1:150, Santa Cruz Biotchenology), os cortes foram lavados em TBS, sendo incubados a 4°C em câmara úmida overnight. Seguiu-se a lavagem em TBS, e todos os casos foram submetidos à técnica da imunoperoxidase pelo método da imunoistoquímico da Estreptoavidina-biotina (NovolinkTM, Novocastra, USA). Os cortes foram incubados em 3,3'diaminobenzidine em solução cromógena (NovolinkTM, Novocastra) por 5min em temperatura ambiente e contra-corados em hematoxilina (NonovlinkTM, Novocastra), seguido de desidratação, diafanização e montagem. Os controles negativos foram obtidos por meio da omissão do anticorpo primário, com substituição por 1% PBS-BSA. Já para os Anticorpos CXCR4 (12G5, 1:750, Santa Cruz Biotchenology), e CD31 (QBEnd-10, 1:100, NovaCastra), após a incubação com os anticorpos primários por 60 Minutos e 18 horas respectivamente, as secções

de tecido foram lavadas com tampão TRIS e tratadas pela técnica polímero baseada em polímeros de dextrano (Reveal™, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, EUA). A diaminobenzidina foi utilizada para visualizar a atividade da peroxidase (Liquid DAB+ Substrato, Dako, Carpinteria, CA, EUA), que resultou em um produto de reação marrom/acastanhada. Os cortes foram contra corados com Hematoxilina de Harris. O controle negativo consistiu na omissão dos anticorpos primários. Cortes de linfonodos representaram o controle positivo para CXCL12, CXCR4, e cortes de granuloma piogênico representaram o controle positivo para o CD31.

A análise imunoistoquímica foi realizada por um examinador previamente treinado. Os cortes histológicos foram examinados por microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE) sob aumento de 200x para identificação de 5 campos intratumorais e 5 campos peritumorais de maior celularidade. As áreas foram fotomicrografadas (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) no aumento de 400x. As imagens obtidas foram transferidas para um computador, com o auxílio do AxioVisio Rel 4.8.

O número de células positivas e negativas foi determinado em cada campo microscópico por meio do programa ImageJ® (*Imaging Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*), permitindo o posterior cálculo do percentual de células positivas em relação ao número total. Para a análise do CXCL12 foi considerada marcação positiva citoplasmática e/ou nuclear, para o CXCR4 marcação citoplasmática e para o CD31 marcação citoplasmática/nuclear das células endoteliais.

Análise estatística

Os resultados obtidos com as análises clínicas, morfológicas e imunoistoquímicas foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS) (versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA), no qual foram realizadas as análises estatísticas.

Para a caracterização da amostra, valores médios e percentuais foram estabelecidos por meio de análise estatística descritiva. Os dados obtidos com as análises das DMVs e das imunoexpressões do CXCR4 e do CXCL12 foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças nas medianas das DMVs e dos percentuais de positividade para CXCR4 e CXCL12, entre APs e CMEs, foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. De maneira similar, as comparações das medianas em relação aos parâmetros clinicomorfológicos (tipo de glândula salivar, subtipo histopatológico dos APs e grau histopatológico de malignidade dos CMEs) foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Possíveis correlações entre as DMVs e as imunoexpressões de CXCR4 e CXCL12 foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

Análise clinicopatológica

A amostra consistiu de 25 APs e 25 CMEs provenientes de excisão cirúrgica, possibilitando analisar o espécime por inteiro, inclusive o front de invasão. Para os pacientes com APs as idades variaram dos 24 a 101 anos, com média de idade de 55,3. No grupo dos CMEs a idade dos pacientes variou de 19 a 83 anos, com média de 46,7 anos. A tabela 1 exhibe os dados clinicopatológicos que caracterizaram a amostra.

Em relação à classificação de Seifert et al⁷ e dicotomização de Miranda Viana et al⁸ predominaram os casos classificados no grupo A com 15 casos (60,0%),

seguido por 10 (40,0%) casos no grupo B. Em relação a classificação de Brandwein et al.⁹ para CMEs observou-se o predomínio de tipo histológico de alto grau presente em 44% da amostra.

Imunoexpressão de CXCL12

Na análise imunoistoquímica observou-se que nos APs houve positividade citoplasmática e nuclear para CXCL12 em 24 (96,0%) dos 25 casos avaliados (Figura 1A). Todos os casos de CMEs revelaram positividade citoplasmática e nuclear para CXCL12 (Figura 1B). Considerando a análise da região intratumoral dos APs e CMEs houve diferença significativa na expressão dessa proteína em relação ao tipo de neoplasia ($p=0,003$) (Tabela 2). Considerando os demais parâmetros clinicopatológicos avaliados na região intratumoral e todos os parâmetros da região peritumoral, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão dessa proteína nas duas lesões (Tabela 2 e 3).

A análise da correlação da expressão da CXCL12 em relação ao CXCR4 e a DMV nas regiões tumorais avaliadas mostrou correlação positiva, estatisticamente significativa, apenas entre as expressões da CXCL12 nas regiões intratumoral e peritumoral dos dois grupos de lesões avaliadas ($p<0,001$) (Tabela 4).

Imunoexpressão de CXCR4

Todos os casos de AP e CME exibiram positividade citoplasmática e nuclear para a proteína CXCR4 (Figuras 1C e 1D). Considerando os parâmetros clinicopatológicos avaliados nas regiões intratumoral e peritumoral, apenas houve discreta diferença estatisticamente significativa na expressão dessa proteína na região peritumoral em relação ao tipo de neoplasia (Tabelas 2 e 3).

A análise da correlação da expressão do CXCR4 em relação a CXCL12 e a DMV nas regiões tumorais avaliadas mostrou correlação positiva, estatisticamente significativa, apenas entre as expressões da CXCR4 nas regiões intratumoral e peritumoral dos dois grupos de lesões avaliadas (Tabela 4).

Microdensidade vascular

Todos os APs e CMEs exibiram positividade citoplasmática e nuclear em células endoteliais para CD31 nas regiões intratumorais e peritumorais (Figuras 1E e 1F). Considerando os parâmetros clinicopatológicos avaliados apenas foi observada diferença estatisticamente significativa da DMV em relação ao tipo de neoplasia, sendo esta mais marcante em ambas regiões dos CMEs ($p < 0,001$) (Tabelas 2 e 3). A análise da correlação da DMV em relação a CXCL12, CXCR4 e às regiões tumorais avaliadas mostrou correlação positiva, estatisticamente significativa, apenas para as DMVs intratumoral e peritumoral dos APs e CME ($p < 0,001$) (Tabela 4).

Tabela 1. Caracterização da amostra em relação aos parâmetros clinicopatológicos. Campina Grande / PB, 2017.

Parâmetros	n (%)
Adenomas pleomórficos	
Sexo	
<i>Masculino</i>	6 (24,0)
<i>Feminino</i>	19 (76,0)
Localização anatômica	
<i>Glândulas salivares maiores</i>	13 (52,0)
<i>Glândulas salivares menores</i>	12 (48,0)
Classificação histopatológica	
<i>Estromal</i>	6 (24,0)
<i>Clássico</i>	9 (36,0)
<i>Celularizado</i>	10 (40,0)
Carcinomas mucoepidermóides	
Sexo	
<i>Masculino</i>	12 (48,0)
<i>Feminino</i>	13 (52,0)
Localização anatômica	
<i>Glândulas salivares maiores</i>	8 (32,0)
<i>Glândulas salivares menores</i>	17 (68,0)
Grau histopatológico	
<i>Baixo grau</i>	7 (28,0)
<i>Grau intermediário</i>	7 (28,0)
<i>Alto grau</i>	11 (44,0)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

Tabela 2. Mediana e variação das percentagens de positividade para CXCL12, CXCR4 e MDV na aos parâmetros clinicopatológicos da amostra avaliada. Campina Grande / PB, 2017.

Parâmetros	DMV Mediana (variação)	P	CXCL12 Mediana (variação)	P
Tipo de lesão				
<i>Adenoma pleomórfico (n = 25)</i>	5,8 (2,6 – 9,2)	< 0,001	90,2 (0,0 – 99,6)	0,003
<i>Carcinoma mucoepidermoide (n = 25)</i>	18,0 (10,8 – 35,6)		97,1 (88,8 – 100,0)	
Histopatologia AP				
<i>Clássico/ estromal (n = 15)</i>	6,0 (2,6 – 8,8)	0,956	90,2 (0,0 – 99,6)	0,890
<i>Celularizado (n = 10)</i>	5,8 (4,2 – 9,2)		90,4 (49,9 – 99,3)	
Localização AP				
<i>Glândula maior (n = 13)</i>	6,8 (3,8 – 8,8)	0,053	96,1 (0,0 – 99,6)	0,060
<i>Glândula menor (n = 12)</i>	5,3 (2,6 – 9,2)		87,2 (49,9 – 99,3)	
Grau histopatológico CME				
<i>Baixo grau/ grau intermediário (n = 14)</i>	18,5 (12,8 – 35,6)	0,217	97,2 (92,2 – 99,6)	0,622
<i>Alto grau (n = 11)</i>	14,4 (10,8 – 29,0)		96,5 (88,8 – 100,0)	
Localização CME				
<i>Glândula maior (n = 8)</i>	18,6 (10,8 – 21,0)	0,977	97,2 (88,8 – 98,8)	0,771
<i>Glândula menor (n = 17)</i>	18,0 (12,8 – 35,6)		97,1 (92,2 – 100,0)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

Tabela 3. Mediana e variação das percentagens de positividade para CXCL12, CXCR4 e MDV na aos parâmetros clinicopatológicos da amostra avaliada. Campina Grande / PB, 2017.

Parâmetros	DMV Mediana (variação)	P	CXCL12 Mediana (variação)	P
Tipo de lesão				
<i>Adenoma pleomórfico (n = 25)</i>	8,6 (3,8 – 14,6)	< 0,001	93,2 (0,0 – 98,4)	0,634
<i>Carcinoma mucoepidermoide (n = 25)</i>	14,8 (5,2 – 18,0)		92,6 (88,7 – 97,6)	
Histopatologia AP				
<i>Clássico/ estromal (n = 15)</i>	8,4 (5,2 – 14,6)	0,934	93,6 (0,0 – 97,6)	0,212
<i>Celularizado (n = 10)</i>	8,9 (3,8 – 11,0)		89,1 (85,0 – 98,4)	
Localização AP				
<i>Glândula maior (n = 13)</i>	8,8 (5,8 – 14,6)	0,327	94,8 (0,0 – 98,4)	0,021
<i>Glândula menor (n = 12)</i>	7,5 (3,8 – 11,4)		90,2 (85,0 – 95,5)	
Grau histopatológico CME				
<i>Baixo grau/ grau intermediário (n = 14)</i>	14,8 (10,8 – 18,0)	0,978	93,1 (89,5 – 97,0)	0,381
<i>Alto grau (n = 11)</i>	14,8 (5,2 – 17,0)		91,6 (88,7 – 97,6)	
Localização CME				
<i>Glândula maior (n = 8)</i>	14,8 (12,2 – 18,0)	0,431	92,5 (88,7 – 95,4)	0,954
<i>Glândula menor (n = 17)</i>	14,8 (5,2 – 18,0)		92,6 (89,5 – 97,6)	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

Tabela 4. Análise das correlações imunoistoquímicas de CXCL12, CXCR4 e MDV em regiões intra e perivasculares da amostra avaliada. Campina Grande / PB, 2017.

ADENOMAS PLEOMÓRFICOS	n	r	P
DMV intratumoral x DMV peritumoral	25	0,670	< 0,001
DMV intratumoral x CXCL12 intratumoral	25	- 0,238	0,252
DMV intratumoral x CXCR4 intratumoral	25	0,200	0,337
DMV peritumoral x CXCL12 peritumoral	25	0,053	0,800
DMV peritumoral x CXCR4 peritumoral	25	- 0,044	0,836
CXCL12 intratumoral x CXCR4 intratumoral	25	0,027	0,898
CXCL12 peritumoral x CXCR4 peritumoral	25	0,183	0,381
CXCL12 intratumoral x CXCL12 peritumoral	25	0,762	< 0,001
CXCR4 intratumoral x CXCR4 peritumoral	25	0,475	0,017
CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES	N	r	P
DMV intratumoral x DMV peritumoral	25	0,751	< 0,001
DMV intratumoral x CXCL12 intratumoral	25	0,100	0,635
DMV intratumoral x CXCR4 intratumoral	25	- 0,375	0,065
DMV peritumoral x CXCL12 peritumoral	25	0,133	0,527
DMV peritumoral x CXCR4 peritumoral	25	- 0,223	0,283
CXCL12 intratumoral x CXCR4 intratumoral	25	- 0,317	0,123
CXCL12 peritumoral x CXCR4 peritumoral	25	- 0,012	0,956
CXCL12 intratumoral x CXCL12 peritumoral	25	0,684	< 0,001
CXCR4 intratumoral x CXCR4 peritumoral	25	0,410	0,042

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba.

DISCUSSÃO

O AP e CME são reconhecidos como os tumores glândulas salivares mais comuns da cavidade oral^{4, 10}. O presente estudo corrobora a literatura no tocante à maior prevalência dessas neoplasias em pacientes adultos (média de 45 anos para o AP e 53 anos para CME), com predisposição pelo sexo feminino^{10,11}, em ambos os tipos tumorais. Para este último fato, sugere-se uma provável influência de fatores hormonais na etiopatogenia das lesões^{11, 12}.

Como demonstra a literatura^{9,11}, o AP ocorreu com maior frequência em glândulas salivares maiores, como a parótida, com predominância dos subtipos clássico e estromal que compreendem o 'Grupo A' segundo a dicotomização de Mirana et al.⁸ Com relação ao CME, os dados desta pesquisa corroboram os achados de SARMENTO et al. (2016)¹³ no tocante à localização mais comum foram as glândulas salivares menores e classificação histológica mais prevalente foi o de alto grau de malignidade (44% da amostra), é importante destacar tais dados, pois a maioria dos casos de CMEs de alto grau metastatizam ou levam o paciente a óbito^{14, 15}.

Consideráveis esforços têm sido realizados para elucidar a função biológica de quimiocinas e seus receptores na atividade angiogênica e crescimento tumoral, bem como invasão e metástase, no que concerne a lesões malignas. Até o presente momento, o papel da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na regulação do crescimento e progressão neoplásica glandular salivar é pouco conhecido. Neste estudo, verificou-se que a expressão da CXCL12 e do CXCR4 foi elevada em todos os CMEs, mas com discreta menor expressão destas proteínas nos APs.

A proteína CXCL12, embora receba tal nome por ser produzido principalmente por componentes do estroma, é também produzida por células tumorais de forma parácrina e autócrina¹⁶, no presente estudo observou que a quimiocina foi intensamente expressa nas células tumorais e epiteliais glandulares, embora fracamente expressa nas células estromais, demonstrando que principalmente as células tumorais secretam a CXCL12.

A angiogênese constitui um dos eventos indispensáveis para o crescimento neoplásico¹⁷, permitindo a proliferação, crescimento, invasão e metástase tumoral²³. Através da análise da densidade microvascular – DMV¹⁸, observamos diferença significativa nas regiões intratumoral e peritumoral de APs e CMEs, evidenciando

maior densidade de vasos intra e peritumoral nos CMEs, fato que destaca o papel preponderante da angiogênese para a sobrevivência e proliferação neoplásica, principalmente nas malignas¹⁹. O presente estudo mostrou um aumento notável na média da DMV nos CMEs em relação aos APs, indicando que a vascularização contribui ou reflete no comportamento biológico em tumores de glândulas salivares. O aumento da procura por suprimento sanguíneo devido a aceleração do crescimento, ou seja, a demanda metabólica, poderia explicar esse achado²⁰.

A expressão da proteína CXCL12 e do CXCR4 não mostrou associação à DMV na amostra aqui analisada, podendo-se inferir que tais proteínas parecem não participar de forma isolada da regulação da atividade angiogênica nos tipos de neoplasias de glândulas salivares estudadas; no entanto, vale destacar que o tamanho da amostra pode ter alguma influência nos resultados obtidos. Além do antes citado, tem sido relatada a influência de outros fenômenos como hipóxia^{27, 28}, atuação de outros receptores de quimiocinas como o CXCR7²⁹ e a secreção de fatores de crescimento por células imunológicas^{21, 23, 31}, além da regulação exercida pela quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na angiogênese em tumores das glândulas salivares.

A ocorrência de correlação positiva entre a DMV intratumoral e a DMV peritumoral dos APs e CMEs poderia sugerir que durante o processo de crescimento tumoral, os fenômenos de sinalização para formação vascular na região intratumoral são equivalentes aos que ocorrem nas regiões peritumorais, provavelmente no intuito de manter a viabilidade e proliferação celular na massa tumoral por inteiro, bem como, garantir o crescimento tumoral dos APs através da expansão neoplásica e dos CMEs através da infiltração e progressão metastática.

Foi observado um valor negativo no coeficiente de correlação entre o CXCR4 e a DMV intratumoral com valor de "P" limítrofe para o CME, fato que poderia ser corrigido com modificação do tamanho da amostra. Esta tendência a correlação negativa entre a expressão do CXCR4 e a DMV intratumoral sugere que este receptor poderia não estar envolvido nas vias de sinalizações angiogênicas nessa neoplasia, podendo sua quimiocina, a CXCL12, utilizar de algum outro receptor para regular tal atividade tumoral, como o CXCR7²².

É importante destacar a diferença estatisticamente significativa da expressão da proteína CXCL12 e do CXCR4 nas regiões intra e peritumorais da amostra avaliada, com discreto aumento da expressão da CXCL12 nas áreas peritumorais

dos APs, além de maior expressão do CXCR4 nas áreas intra e peritumorais dos CMEs. Estes dados podem sugerir que em ambas neoplasias essa quimiocina e seu receptor parecem exercer algum papel importante na patogenia tumoral. Provavelmente nos CMEs o CXCR4 exibiria uma maior expressão na superfície celular neoplásica, ficando disponível para interagir constantemente com sua quimiocina preferencial, a CXCL12 e regular os eventos celulares neoplásicos.

Face ao antes exposto, vale salientar que em crescimentos neoplásicos, o aumento populacional e a competitividade celular por nutrientes e oxigênio podem propiciar a instalação de áreas hipóxicas, as quais podem representar risco para a sobrevivência celular neoplásica, principalmente nas regiões intratumorais do CME. Nesse sentido, sabe-se que o fator-1 induzido por hipóxia responde às baixas concentrações de oxigênio nos tecidos e aumenta a expressão de CXCR4, de modo que em regiões hipóxicas de neoplasias em expansão, os níveis de receptores de quimiocinas podem ser aumentados para facilitar a sobrevivência da população celular tumoral^{24, 25}.

No presente estudo a ocorrência de correlação entre a expressão de CXCL12 nas áreas intratumorais e peritumorais e a também correlação entre a expressão CXCR4 nas áreas intratumorais e peritumorais observada nos dois tipos de neoplasias analisadas, leva a concordar com Hernández-López et al.²⁶, que embora analisou outros tipos de células seus resultados denotam que tais proteínas estariam regulando eventos celulares importantes para a patogenia e comportamento biológico. Provavelmente no AP essas proteínas estariam envolvidas em mecanismos relacionados à manutenção de uma população celular, garantia do crescimento tumoral, enquanto que no CME poderiam manter uma via de sinalização que permita a proliferação e aumento da sobrevivência celular²⁷.

Os resultados do presente estudo evidenciaram uma associação estatisticamente significativa da expressão de CXCL12 nas regiões peritumorais de APs em relação à localização dessas neoplasias, com destaque para as que acometiam glândulas salivares maiores. Pode-se inferir que em glândulas salivares maiores, usualmente existe grande quantidade de tecido conjuntivo e principalmente observa-se uma organização mais sólida no componente estromal do que nas glândulas menores, precisando, hipoteticamente, maior expressão da quimiocina para regulação dos eventos celulares neoplásicos e com o microambiente peritumoral dessa neoplasia benigna glandular salivar.

Além do antes exposto, relata-se que os APs com maior quantidade de estroma parecem estar associados a maior recorrência, uma vez que a maior quantidade de componente estromal estaria associada a maior secreção do Fator-1 derivado do estroma (CXCL12), o qual exerce função quimiotática das células em direção às áreas externas da cápsula⁷.

Embora não tenha havido associação estatisticamente significativa, os resultados desta pesquisa mostraram uma alta expressão da quimiocina e seu receptor nas regiões intratumorais de CME, e alta expressão da cxcl12 na área peritumorais de AP, de forma equivalente uma alta DMV nas regiões intratumorais dos CMEs e peritumorais do APs. Frente a esses achados, estudos com amostras de câncer de mama, glioblastoma e neuroblastoma sugeriram que a expressão aumentada de CXCL12 em células tumorais demonstra um gradiente local da quimiocina na determinada região tumoral, recrutando células progenitoras derivadas da medula óssea que expressam CXCR4²¹. Considerando o antes exposto e baseados nos resultados do presente estudo, pode-se sugerir que a maior expressão da CXCL12 na amostra avaliada estaria contribuindo ao aumento da atividade angiogênica mediante o recrutamento de células com capacidade de expressar tal quimiocina e seu receptor principal, como células inflamatórias e células progenitoras endoteliais¹⁶.

Como citado anteriormente, no tocante a mensuração da DMV, ambos tumores foram positivos para o CD31, mas as regiões intratumorais do CME e peritumorais do AP apresentaram maior densidade microvascular. A maior quantidade de vasos nas regiões peritumorais dos APs pode ser associada ao fato que em estágios iniciais do desenvolvimento dessa neoplasia, o aumento da demanda sanguínea e metabólica pode ser simplesmente satisfeita por um aumento na área do vaso²⁸, mas em estágios avançados de expansão, os APs crescem lentamente e podem atingir grandes proporções até sua remoção cirúrgica, justificando-se uma maior DMV nas áreas peritumorais destes²⁹.

Por outro lado, a maior DMV nas áreas intratumorais dos CMEs pode-se justificar pelo fato que as regiões intratumorais são áreas com maior quantidade de células neoplásicas, assim a hipóxia, associada a presença de quimiocinas como o CXCL12 formariam um eixo angiogênico sinérgico. Sinais induzidos por hipóxia seriam fatores cruciais para iniciar a via angiogênica ativa mediada por proteínas e fatores de crescimento (VEGF e as angioproteínas)^{3, 21}.

Um dos eventos marcantes na progressão tumoral relaciona-se a capacidade de migração, invasão e metástase. A ligação da CXCL12 ao seu receptor além de atuar na proliferação celular e angiogênese, implica também na metástase de muitos tipos de neoplasias³⁰. A influência das quimiocinas na tumorigênese em glândulas salivares ainda não está clara, e mais precisamente diante da atividade angiogênica, não há estudos que elucidem esta relação.

Dentro das limitações do presente estudo, as seguintes conclusões podem ser elencadas: os tumores de glândulas salivares com comportamentos biológicos distintos exibem expressão bastante semelhante da quimiocina CXCL12 e do CXCR4; o complexo CXCL12/CXCR4 parece não ser um fator preponderante em relação à atividade angiogênica tumoral de APs e CMEs; a maior DMV intratumoral em CMEs e peritumoral em APs parecem sofrer influência de outros fatores ou fenômenos sinérgicos à ativação do complexo CXCL12/CXCR4, a área intratumoral do CME apresenta maior celularidade e os fenômenos relacionados a esse fato, demandam maior atividade metabólica, requerendo portanto, maior vascularização, podendo justificar a ocorrência dessa acentuada DMV. Por outro lado, no AP, a maior DMV nas áreas peritumorais sugerem a ocorrência de uma maior necessidade de nutrientes e oxigênio nessa região, no intuito de garantir o crescimento e expansão do tumor.

Conhecer os mecanismos de proliferação, nutrição e invasão associados à angiogênese contribui ao entendimento do comportamento biológico de neoplasias glandulares salivares e pode fornecer novas informações para possíveis estratégias terapêuticas, no que se refere à manipulação dos eventos vasculogênicos nestas lesões, portanto, uma proposta deste estudo é continuar com outros estudos, com amostras maiores, que auxiliem na elucidação das funções da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na atividade angiogênica de neoplasias de glândulas salivares.

REFERÊNCIAS

1. Barnes, L. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press. 2005;
2. Döring Y, Pawig L, Weber C, Noels H. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. *Front Physiol.* 2014; 1(5):212.
3. Teicher BA, Fricker S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin. Cancer Res.* 2010; 16:2927–2931.
4. Pawig L, Klasen C, Weber C, Bernhagen, J, Noels H. Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. *Front Immunol* 2015; 21(6):429.
5. Sorrentino C, Miele L, Porta A, Pinto A, Morello S. Activation of the A2B adenosine receptor in B16 melanomas induces CXCL12 expression in FAP-positive tumor stromal cells, enhancing tumor progression. *Oncotarget* 2016; 7(39):64274-64288.
6. Ota T, Ota K, Jono H, Fujimori H, Ueda M, Shinriki S, Sueyoshi T, Shinohara M, Ando Y. Midkine expression in malignant salivary gland tumors and its role in tumor angiogenesis. *Oral Oncol.* 2010; 46(9):657-61
7. Seifert G, Langrock I, Donath K. Pathomorphologische Subklassifikation der pleomorphen Speicheldrüsen adenome. *HNO*1976; 24:415-26.
8. Miranda Viana Ade C, Ribeiro DC, Florêncio TN, et al. Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a role in the control of apoptosis? *ActaHistochem*2013; 115:564-8.
9. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A, Bodian C, Urken ML, Gnepp DR, Huvos A, Lumerman H, Mills SE. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25:835–845.
10. Del Signore AG.; Megwalu UC. The rising incidence of major salivary gland cancer in the United States. *Ear Nose Throat J* 2017; 96(3):13-16.
11. Valstar MH, de Ridder M, van den Broek EC et al. Salivary gland pleomorphic adenoma in the Netherlands: A Nationwide observational study of primary tumor incidence, malignant transformation, recurrence, and risk factors for recurrence. *Oral oncology* 2017: 66:93-99.
12. Larbcharoensub N, Cert P. K, Tungkeeratchai J et al. Expression of hormonal receptor in patients with metastasizing pleomorphic adenoma of the major salivary gland; a clinicopathological report of three cases. *J Med Assoc Thai* 2009. 92(9):1250-5.
13. Sarmiento DJ, Morais ML, Costa AL, Silveira ÉJ. Minor intraoral salivary gland tumors: a clinical-pathological study. *Einstein.* 2016: 14(4):508-512.
14. Triantafyllidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F et al. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis.* 2006: 12(4):364-70.
15. Xu W, Wang Y, Qi X et al. Prognostic factors of palatal mucoepidermoid carcinoma: a retrospective analysis based on a double-center study. *Sci Rep.* 2017; 6(7):43907.
16. Wang S, Ma N, Kawanishi S, et al. Relationships of Alpha-SMA-Positive Fibroblasts and SDF-1-Positive Tumor Cells with Neoangiogenesis in Nasopharyngeal Carcinoma. *BioMed Research International.* 2014; 2014:507353

17. Welte, J., Loges, S., Dimmeler, S. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. *J. Clin. Invest.* 2013; 123:3190-3200
18. Weidner, N. I. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. *N Eng J Med.* 1993; 324(1):1-8.
19. Ma DM, Luo DX, Zhang J. SDF-1/CXCR7 axis regulates the proliferation, invasion, adhesion, and angiogenesis of gastric cancer cells. *World J Surg Oncol.* 2016; 6;14(1):256.
20. Moghadam, S. A.; Abadi, M.; Mokhtari, S. Immunohistochemical analysis of CD34 expression in salivary gland tumors. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2015; 19(1):30–33.
21. Du R, Lu KV, Petritsch C, et al. HIF1alpha induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. *Cancer Cell* 2008; 13:206–20
22. Mays AC, Feng X, Browne JD, Sullivan CA. Chemokine and Chemokine Receptor Profiles in Metastatic Salivary Adenoid Cystic Carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 Aug;36(8):4013-8.
23. Americo MG, Marques YM, El Abras Ankha MD, do Prado RF, Carvalho YR. Correlation of intratumoral lymphatic microvessel density, vascular endothelial growth factor C and cell proliferation in salivary gland tumors. *Med Mol Morphol.* 2017 Mar;50(1):17-24.
24. Zagzag D, Lukyanov Y, Lan L, Ali MA, Esencay M, Mendez O, Yee H, Voura EB, Newcomb EW. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. *Lab Invest.* 2006; 86(12):1221-32
25. Hillen F, Griffioen AW: Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. *Cancer Metastasis Rev* 2007, 26(3- 4):489-502.
26. Hernández-López C, Valencia J, Hidalgo L, et al. CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. *Immunol Lett* 2008; 120:72-8.
27. Ghosh-Laskar S, Murthy V, Wadasadawala T et al. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: factors affecting outcome. *Head Neck.* 2011; 33(4):497-503.
28. Jyothisna M, Rammanohar M, Kumar K. Histomorphometric Analysis of Angiogenesis using CD31 Immunomarker and Mast Cell Density in Oral Premalignant and Malignant Lesions: A Pilot Study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR.* 2017; 11(1):ZC37-ZC40.
29. De Souza LB, de Oliveira LC, Nonaka CFW, Lopes MLDS, Pinto LP, Queiroz LMG. Immunoexpression of GLUT-1 and angiogenic index in pleomorphic adenomas, adenoid cystic carcinomas, and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017; 274(6):2549-2556.
30. Chen GS, Yu HS, Lan CC. et al. CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma. *Br J Dermatol* 2006; 154:910–18.

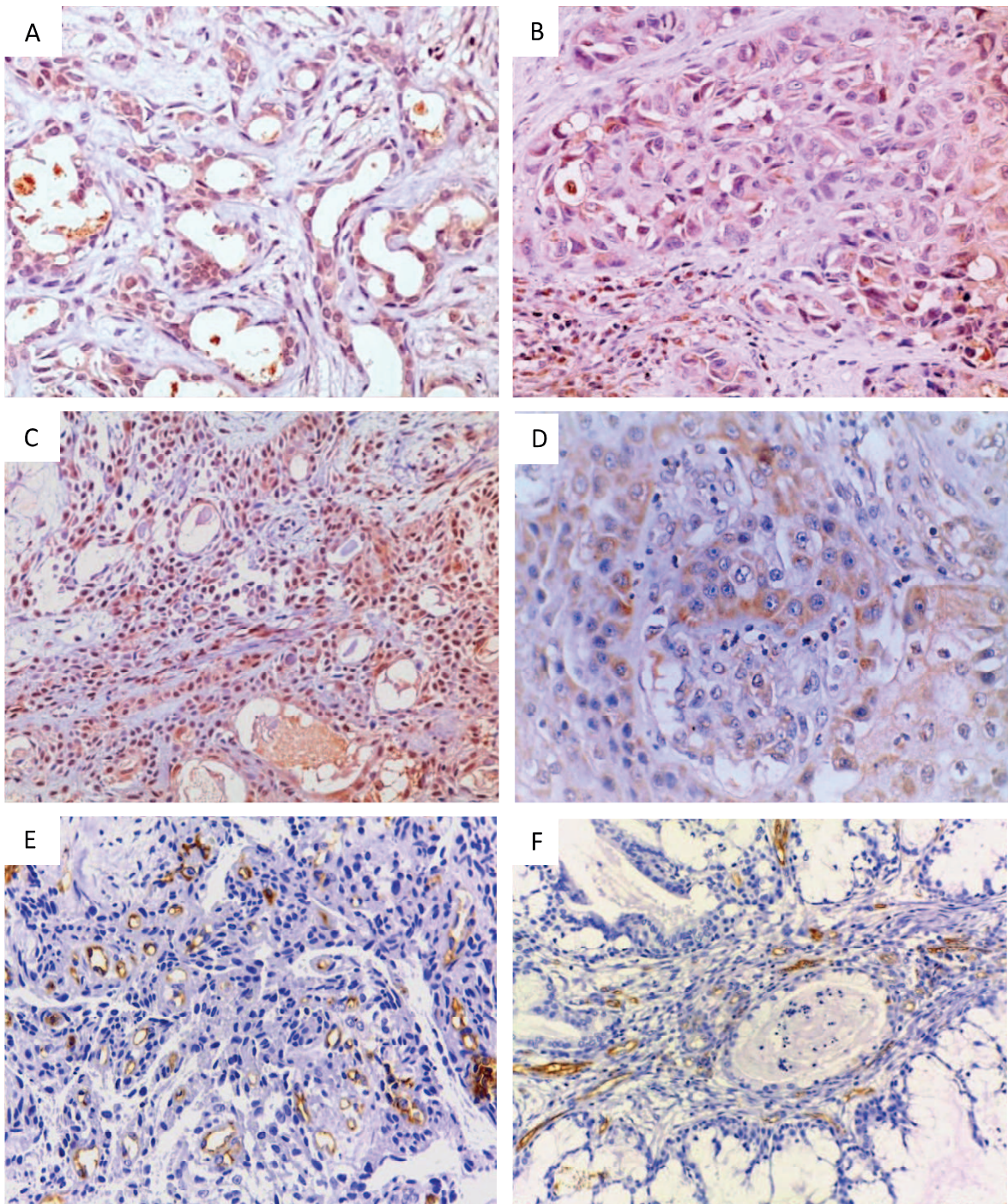


Figura 1. Fotomicrografias representativas da expressão imunoistoquímica dos marcadores utilizados. A) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em AP (Novolink™, Santa Cruz Biotechnology, 400x). B) Imunoexpressão epitelial de CXCL12 em CME (Novolink™, Santa Cruz Biotechnology, 400x). C) Imunoexpressão epitelial de CXCR4 em AP (Reveal™, Santa Cruz Biotechnology, 200x). D) Imunoexpressão epitelial de CXCR4 em CME (Reveal™, Santa Cruz Biotechnology, 400x). E) Imunoexpressão celular endotelial de CD31 em AP (Reveal™, Novocasta, 200x). F) Imunoexpressão celular endotelial de CD31 em CME (Reveal™, Novocasta, 200x).

CONSIDERAÇÕES FINAIS



CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os tumores de glândulas salivares avaliados, embora possuam comportamentos biológicos distintos exibem expressão bastante semelhante da quimiocina CXCL12 e do CXCR4;
- O complexo CXCL12/CXCR4 parece não ser um fator preponderante ou isolado em relação à atividade angiogênica tumoral de APs e CMEs;
- A maior DMV intratumoral em CMEs e peritumoral em APs parecem sofrer influência de outros fatores ou fenômenos sinérgicos à ativação do complexo CXCL12/CXCR4;
- Conhecer os mecanismos de proliferação, nutrição e invasão associados à angiogênese contribui ao entendimento do comportamento biológico de neoplasias glandulares salivares pode fornecer novas informações para possíveis estratégias terapêuticas,
- Faz necessário a realização de outros estudos, com amostras maiores, que auxiliem na elucidação das funções da quimiocina CXCL12 e seu receptor CXCR4 na atividade angiogênica de neoplasias de glândulas salivares.

REFERÊNCIAS



REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PO, J. S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.592, 2011.
- ALBRECHT, E. D.; PEPE, G. J. Estrogen regulation of placental angiogenesis and fetal ovarian development during primate pregnancy. **Int. J. Dev. Biol.** v.54, p. 397e408, 2010.
- AL-KHATEEB, T. H.; ABABNEH, K. T. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.** v.103, p.53-9, 2007.
- AUCLAIR, P. L.; GNEPP, D. R. Surgical pathology of the salivary glands. **Philadelphia: W.B. Saunders**, p.51-56, 1991.
- ANSARI, M. H. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.65, p.2187-94, 2007.
- AO, M.; FRANCO, O. E.; PARK, D. et al. Cross-talk between paracrine-acting cytokine and chemokine pathways promotes malignancy in benign human prostatic epithelium. **Cancer Res.** v.67, n.9, P.4244–4253, 2007.
- ARAYA, J.; MARTINEZ, R.; NIKLANDER, S. et al. Incidence and prevalence of salivary gland tumours in Valparaiso, Chile. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal.** v.20, n.5, p.532-9, 2015.
- AUCLAIR, P. L.; GOODE, R. K.; ELLIS, G. L. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. **Cancer.** v.69, n.8, p.2021-2030, 1992.
- BĂDESCU, A.; GEORGESCU, C. V.; VERE, C. C. et al. Correlations between Her2 oncoprotein, VEGF expression, DMV and clinicopathological parameters ingastric cancer. **Rom J Morphol Embryol.** v.53, n.4, p.235-45, 2012.
- BAI S, CLUBWALA R, ADLER E. Salivary Mucoepidermoid Carcinoma: A Multi-Institutional Review of 76 Patients. **Head and Neck Pathology.** 2013;7(2):105-112.
- BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature Rev. Cancer.** v.4, n.7, p.540-550, 2004.

BARNES, L. et al. World health organization classification of tumors. Pathology and genetics of head and neck tumors. Lyon: IARC Press., 2005.

BEAHR, O. H.; HENSON, D. E.; HUTTER, R. V. P. et al. **Manual for staging of cancer**, 3rd edn. JB Lippincott: Philadelphia, 1998.

BEGLEY, L.; MONTELEON, C.; SHAH, R. B. et al. Cxcl12 overexpression and secretion by aging fibroblasts enhance human prostate epithelial proliferation in vitro. **Aging Cell**. v.4, n.6, p.291–298, 2005.

BEN-IZHAK, O.; LASTER, Z.; ARAIDY, S. et al. TUNEL - an efficient prognosis predictor of salivary malignancies. **Br J Cancer**. v.96, n.7, p.1101-6, 2007.

BILLADEAU, D. D.; CHATTERJEE, S.; BRAMATI, P. et al. Characterization of the cxcr4 signaling in pancreatic cancer cells. **Int J Gastrointest Cancer**. v.37, n.4, p.110–119, 2006.

BITTAR, R. F.; FERRARO, H. P.; RIBAS, M. H. et al. Facial paralysis after superficial parotidectomy: analysis of possible predictors of this complication. **Braz J Otorhinolaryngol**. v.82, n.4, p.447-51, 2016.

BOUAITY, B.; DAROUASSI, Y.; CHIHANI, M. et al. [Predictors of malignancy in the management of parotid tumors: about 76 cases]. **Pan Afr Med J**. v.16, n.23, p.112, 2016.

BRANDWEIN, M. S.; IVANOV, K.; WALLACE, D. I. et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. **Am J Surg Pathol**. v.25, p.835–845, 2001.

BURNS, J. M.; SUMMERS, B. C.; WANG, Y. et al. A novel chemokine receptor for sdf-1 and i-tac involved in cell survival, cell adhesion, and tumor development. **J Exp Med**. v.203, n.9, p.2201–2213, 2006.

CARDOSO, S. V.; SOUZA, K. C. N.; FARIA, P. R. et al. Assessment of angiogenesis by CD105 antigen in epithelial salivary gland neoplasms with diverse metastatic behavior. **BMC Cancer**, v.9, n.4, p.391-400, 2009.

COMOGLU, S.; OZTURK, E.; CELIK, M. Comprehensive analysis of parotid mass: A retrospective study of 369 cases. **Auris Nasus Larynx**. G Model ANL-2277, p.1-8, 2017.

COSTA, A.; SCHOLER-DAHIREL, A.; MECHTA-GRIGORIOU, F. The role of reactive oxygen species and metabolism on cancer cells and their microenvironment. **Semin Cancer Biol.** v.25, p.23–32, 2014.

DE SOUZA, L. B.; DE OLIVEIRA, L. C.; NONAKA, C. F. W. Immunoexpression of GLUT-1 and angiogenic index in pleomorphic adenomas, adenoid cystic carcinomas, and mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands. **Eur Arch Otorhinolaryngol.** v.274, n.6, p.2549-2556, 2017.

DEL SIGNORE, A. G.; MEGWALU, U. C. The rising incidence of major salivary gland cancer in the United States. **Ear Nose Throat J.** v. 96, n.3, p.13-16, 2017.

DHANUTHAI, K.; SAPPAYATOSOK, K. An analysis of microvessel density in salivary gland tumours: a single centre study. **Surgeon.** v.11, n.3, p.147-52, 2013

DOMANSKA U. M.; KRUIZINGA R. C.; NAGENGAST W. B. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **Eur. J. Cancer.** v.49, p.219–2301, 2013.

DOMANSKA, U. M.; KRUIZINGA, R. C.; NAGENGAST, W. B. A review on CXCR4/CXCL12 axis in oncology: no place to hide. **European Journal of Cancer.** v.49, n.1, p.219–230, 2013.

DÖRING, Y.; PAWIG, L.; WEBER, C. The CXCL12/CXCR4 chemokine ligand/receptor axis in cardiovascular disease. **Front Physiol.** v.11, n.5, p.212, 2014.

DREWES, C. C.; DIAS, R. Y.; BRANCO, V. G. Post-transcriptional control of Amblyomin-X on secretion of vascular endothelial growth factor and expression of adhesion molecules in endothelial cells. **Toxicon.** v.101, p.1-10. 2015.

DU, R.; LU, K. V.; PETRITSCH, C. HIF1 α induces the recruitment of bone marrow-derived vascular modulatory cells to regulate tumor angiogenesis and invasion. **Cancer Cell.** v.13, p.206–20 2008.

EL-KOTT, A. F.; EL-BAZ, M. A.; MOKHTAR, A. A. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) overexpression and microvessel density predict survival in the urinary bladder carcinoma. **Int Urol Nephrol.** v.38, p.237-42, 2006.

ELLIES M, SCHAFFRANIETZ F, ARGLEBE C et al. Tumors of the salivary glands in childhood and adolescence. **J Oral Maxillofac Surg.** v.64, n.7, p.1049-58, 2006.

FAVA, A. S. **Diagnóstico, estadiamento e tratamento cirúrgico dos tumores malignos das glândulas salivares**. Tratado de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia. São Paulo: Atheneu, p.791-812, 2001.

FERREIRA, J. C.; MORAIS, M. O.; ELIAS, M. R et al. Pleomorphic adenoma of oral minor salivary glands: An investigation of its neoplastic potential based on apoptosis, mucosecretory activity and cellular proliferation. **Arch Oral Biol**. v.59, n.6, p.578-85, 2014.

FREITAS, V. M. et al. Laminin-1 and SIKVAV a laminin-1-derived peptide, regulate the morphology 1326 and protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell 1327 line. **Oral Oncology**. v.40, n.5, p.483-489. 2004.

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

GHAZALI, N.; FLASHBURG, A.; ORD, R. A. Extensive Regional Metastasis of High-Grade Mucoepidermoid Carcinoma of an Unknown Primary Tumor. **J Oral Maxillofac Surg**. v.75, n.4, p.874.e1-874.e7, 2017.

GHOSH-LASKAR, S.; MURTHY, V.; WADASADAWALA, T et al. Mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland: factors affecting outcome. **Head Neck**. v.33, n.4, p.497-503, 2011.

GLEBER-NETTO, F. O.; FLORENCIO, T. G.; SOUSA, F. S et al. Angiogenesis and lymphangiogenesis in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. **J. Oral Pathol. Med.**, v.41, p.603, 2012.

GREENE, F.; PAGE, D.; FLEMING, I. **AJCC Cancer Staging Manual**. 6th Springer-Verlag; New York, NY: 2002.

GUEVARA-CANALES, J. O.; MORALES-VADILLO, R.; GUZMÁN-ARIAS, G. et al. Carcinoma mucoepidermóide das glândulas salivares. Um estudo retrospectivo de 51 casos e revisão da literatura. **Acta Odontol Latinoam**. v.29, n.3, p. 230-238, 2016, 2016.

GUO F; WANG Y; LIU, J. et al. CXCL12/CXCR4: a symbiotic bridge linking cancer cells and their stromal neighbors in oncogenic communication networks. **Oncogene**. v.35:p.816–826, 2016.

GUPTA, S. K.; LYSKO, P. G.; PILLARISETTI, K et al. Chemokine receptors in human endothelial cells. Functional expression of CXCR4 and its transcriptional regulation by inflammatory cytokines. **J Biol Chem.** v.273, p.4282–4287, 1998.

HAMADA, T.; MATSUKITA, S.; GOTO, M et al. Mucin expression in pleomorphic adenoma of salivary gland: a potential role for MUC1 as a marker to predict recurrence. **J Clin Pathol.** v.57, n.8, p.813-2, 2004.

HEMBRUFF, S. L.; CHENG, N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. **Cancer therapy.** v. 14, n.7a, p.254-267, 2009.

HILLEN, F.; GRIFFIOEN, A. W. Tumour vascularization: sprouting angiogenesis and beyond. **Cancer Metastasis Rev.** v.26, n.3- 4, p.489-502, 2007

HLATKY, L.; HAHNFELDT, P.; FOLKMAN, J. Clinical application of antiangiogenic therapy: microvessel density, what it does and doesn't tell us. **J Natl Cancer Inst.** v.94, p.883e93, 2002.

HORI, T.; SAKAIDA, H.; SATO, A et al. Detection and delineation of CXCR-4 (fusin) as an entry and fusion cofactor for T-tropic [correction of T cell-tropic] HIV-1 by three different monoclonal antibodies. **J Immunol Baltim Md.** v. 160: p.180–188, 1998.

INGH, B.; COOK, K. R.; MARTIN, C et al. Evaluation of a CXCR4 antagonist in a xenograft mouse model of inflammatory breast cancer. **Clin Exp Metastasis.** v.27, p.233–240, 2010.

ISRAEL, Y.; RACHMIEL, A.; ZIV, G et al. Benign and Malignant Salivary Gland Tumors - Clinical and Demographic Characteristics. **Anticancer.** v.36, n.8 p.4151-4, 2016.

ITO, F. A.; ITO, K.; VARGAS, P. A et al. Salivary gland tumors in a brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v.34, n.5, p.533-36, 2005.

JAHANGIRNEZHAD, M., ATARBASHI, M. S.; MOKHTARI, S et al. Different histopathologic features of pleomorphic adenoma in salivary glands. **Int. J. Oral Maxillofac. Pathol.**, v.4, p.7–11, 2013.

JODELE, S.; CHANTRAIN, C. F.; BLAVIER, L. The contribution of bone marrow-derived cells to the tumor vasculature in neuroblastoma is matrix metalloproteinase-9 dependent. **Cancer Res.** v.65, p.3200–8, 2005.

JONES, A. V.; CRAIG, G. T.; SPEIGHT, P. M et al. The range and demographics of salivary gland tumours diagnosed in a UK population. **Oral Oncol.**, v.44, p.407-17, 2008.

JYOTHSNA, M.; RAMMANOHAR, M.; KUMAR, K. Histomorphometric Analysis of Angiogenesis using CD31 Immunomarker and Mast Cell Density in Oral Premalignant and Malignant Lesions: A Pilot Study. **Journal of Clinical and Diagnostic Research.** v.11, n.1, p.ZC37-ZC40, 2017.

KAPLAN R.N.; RIBA R.D.; ZACHAROULIS, S. et al. Vegfr1-positive haematopoietic bone marrow progenitors initiate the pre-metastatic niche. **Nature.** v.438, n.7069, p.820–827, 2005.

KELLER, G.; STEINMANN, D.; QUAAS, A. et al. New concepts of personalized therapy in salivary gland carcinomas. **Oral Oncol.** v.68, p.103-113, 2017. Review.

KRYCZEK, I.; et al. CXCL12 and Vascular Endothelial Growth Factor Synergistically Induce Neoangiogenesis in Human Ovarian Cancers. **Cancer Res**, v.65, n.2, p.465-72, 2005

KUFAVERA, I.; SALANGA, C.L.; HANDEL, T. Chemokine and chemokine receptor structure and interactions: implications for therapeutic strategies. *Immunol. And Cell. Biol.*, v.93, n.4, p.372-383, 2015.

LARBCHAROENSUB, N.; CERT, P. K.; TUNGKEERATICHAI, J.; PRAKUNHUNGSIT, S.; NARKWONG, L.; LEOPAIRUT, J. Expression of hormonal receptor in patients with metastasizing pleomorphic adenoma of the major salivary gland; a clinicopathological report of three cases. **J Med Assoc Thai.** v.92, n.9, p.1250-5, 2009.

LEFORT, S.; THULEAU, A.; KIEFFER, Y. CXCR4 inhibitors could benefit to HER2 but not to triple-negative breast cancer patients. **Oncogene.** v.36, n.9, p.1211-1222, 2017.

LEVI, S.; ZINI, A.; FISCHMAN, S et al. Epidemiology of oral, salivary gland and pharyngeal cancer in children and adolescents between 1970 and 2011. **Oral Oncol.** v.2017, p.89-94, 2017.

MA, D.M.; LUO, D.X.; ZHANG, J. SDF-1/CXCR7 axis regulates the proliferation, invasion, adhesion, and angiogenesis of gastric cancer cells. **World J Surg Oncol.** 2016 Oct 6;14(1):256.

MACHADO, R. A.; MOUBAYED, S. P.; KHORSANDI, A et al. Intermittent facial spasms as the presenting sign of a recurrent pleomorphic adenoma. **World Journal of Clinical Oncology.** v.8, n.1, p.86-90, 2017.

MĂRGĂRITESCU, C.; RAICA, M.; SIMIONESCU, C et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer.** v.118, n.16, p.3928-36, 2012.

MĂRGĂRITESCU, C.; RAICA, M.; SIMIONESCU, C et al. Tumoral stroma of salivary pleomorphic adenoma -- histopathological, histochemical and immunohistochemical study. **Rom J Morphol Embryol.** v.46, n.3, p.211-23, 2005.

MELLO, A.U.C.M.; AGRIPINO, G.G.; RIBEIRO, C. F et al. Neoplasias de Glândulas Salivares: Estudo Retrospectivo de 134 casos numa população do Nordeste do Brasil. **Rev. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.** v.12, n.2, p. 65-72, 2012.

MOGHADAM, S. A.; ABADI, M.; MOKHTARI, S. Immunohistochemical analysis of CD34 expression in salivary gland tumors. **J. Oral Maxillofac. Pathol.,** v.19, n.1, p.30–33, 2015

MORI, N.; MUGIKURA, S.; TAKAHASHI, S et al. Quantitative Analysis of Contrast-Enhanced Ultrasound Imaging in Invasive Breast Cancer: A Novel Technique to Obtain Histopathologic Information of Microvessel Density. **Ultrasound Med Biol.** v.43. n.3, p.607-614, 2017.

MULLER, A.; HOMEY, B.; SOTO, H et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. **Nature.** v.410 n.6824, p.50–56, 2010.

MULLER, W. A.; WEIGL, S. A.; DENG, X et al. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. **J Exp Med.** v.178, p.449 – 460, 1993.

MURDOCH, C.; MONK, P. N.; FINN, A. Functional expression of chemokine receptor CXCR4 on human epithelial cells. **Immunology.** v.98, p.36–41, 1999.

NAMBOODIRIPAD, P. C. A. A review: immunological markers for malignant salivary gland tumors. **J Oral Biol Craniofacial Res.** v.4, n.127-134, 2014.

NEMETZ, M. A.; PFUETZENREITER JÚNIOR, E. G.; TRAUZYNSKI, P. A. et al. Estudo clínico e epidemiológico dos tumores da glândula parótida num serviço de referência em cirurgia de cabeça e pescoço e otorrinolaringologia. **Rev. Bras Cir. Cabeça Pescoço.** v.35, n.2, p.66-9, 2006.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial.** 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p.972, 2009.

NEWMAN, P.J.; BERNDT, M. C.; GORSKI, J. et al. PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. **Science.** v.247, p.1219 –1222, 1990.

OU YANG, K. X.; LIANG, J.; HUANG, Z. Q. Association of clinicopathologic parameters with the expression of inducible nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in mucoepidermoid carcinoma. **Oral Dis.** v.17, p.590–6, 2011.

PAWIG, L.; KLASSEN, C.; WEBER, C. et al. Diversity and Inter-Connections in the CXCR4 Chemokine Receptor/Ligand Family: Molecular Perspectives. **Front Immunol.** v.21, n.6, p.429, 2015.

PAWIG, L.; KLASSEN, C.; WEBER, C. et al. Diversidade e inter-conexões na família de receptores / ligandos de quimiocinas CXCR4: perspectivas moleculares. **Immunol.** v.6, p.429, 2015..

PETIT I.; JIN D.; RAFII S. The SDF-1-CXCR4 signaling pathway: a molecular hub modulating neo-angiogenesis. **Trends Immunol.** 28, 299–307, 2007.

QANNAM, A.; BELLO, I. O. Comparison of histological grading methods in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. **Indian J Pathol Microbiol.** v.59, n.4, p.457-462, 2016.

RANSOHOFF, R. M. Chemokines and chemokine receptors: Standing at the crossroads of immunobiology and neurobiology. *Immunity.* 2009;31(5):711–721.

RAYESS, H. M.; DEZUBE, A. BAWAB, I. et al. Tumor Differentiation as a Prognostic Factor for Major Salivary Gland Malignancies. **American Academy of Otolaryngology—Head and Neck Surgery Foundation**. v.1, p.1-8, 2017.

REN, Y.; KONG, L. F.; ZHANG, M. Y. et al. [Clinicopathologic characteristic of oncocytic mucoepidermoid carcinoma: report of 8 cases]. **Zhonghua Bing Li Xue Za Zhi**. v.46, n.7, p.499-500, 2017.

ROSTENE, W.; BUCKINGHAM, J.C. Chemokines as modulators of neuroendocrine functions. **J. Mol. Endocrinol.** v.38, n.3, p.351-353, 2007.

SAHOO, N. K.; RANGAN, M. N.; GADAD, R.D. Pleomorphic adenoma palate: Major tumor in a minor gland. **Ann Maxillofac Surg**. v.3, n.2, p.195-197, 2013.

SAMARA, G. J.; LAWRENCE, D.M.; CHIARELLI, C. J. et al. CXCR4-mediated adhesion and MMP-9 secretion in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Lett.** v.2, p.231–241, 2004.

SANDO, Z.; FOKOUO, J. V.; MEBADA, A. O. et al. Epidemiological and histopathological patterns of salivary gland tumors in Cameroon. **Pan Afr Med J**. v.3, n.23, p.66, 2016.

SARMENTO, D. J.; MORAIS, M. L.; COSTA, A. L. et al. Minor intraoral salivary gland tumors: a clinical-pathological study. **Einstein (Sao Paulo)**. v.14, n.4, p.508-512, 2016.

SCOTTON, C. J.; WILSON, J. L.; MILLIKEN, D. et al. Epithelial cancer cell migration: A role for chemokine receptors? **Cancer Res**. v.61, n.13, p.4961–4965, 2001.

SHARMA, M.; AFRIN, F.; TRIPATHI, R. P. et al. Transgene expression study of CXCR4 active mutants. Potential prospects in up-modulation of homing and engraftment efficiency of hematopoietic stem/progenitor cells. **Cell Adhes Migr**. v.8, p.384–388, 2014.

SHARMA, S.; SHARMA, M. C.; SARKAR, C. Morphology of angiogenesis in human cancer: A conceptual overview, histoprognostic perspective and significance of neoangiogenesis. **Histopathology**. v.46: p.481–9, 2005.

SHIEH, Y. S.; HUNG, Y. J.; HSIEH, C. B. et al. Tumor-associated macrophage correlated with angiogenesis and progression of mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. **Ann Surg Oncol.** 2009;16:751–60

SINGH, S.; WU, S.; VARNEY, M. et al. CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation. **Microvasc. Res.** v.82 n.3. p.318–325, 2011.

SINGH, S.; WU, S.; VARNEY, M. et al. CXCR1 and CXCR2 silencing modulates CXCL8-dependent endothelial cell proliferation, migration and capillary-like structure formation. **Microvasc. Res.** v.82, n.3, p.318–325, 2013.

SORRENTINO, C.; MIELE, L.; PORTA, A. et al. Activation of the A2B adenosine receptor in B16 melanomas induces CXCL12 expression in FAP-positive tumor stromal cells, enhancing tumor progression. **Oncotarget.** v.7, n.39, p.64274-64288, 2016.

STRUB, G. M.; GEORGOLIOS, A.; GRAHAM, R. S. et al. Massive transcranial parotid pleomorphic adenoma: recurrence after 30 years. **J Neurol Surg Rep.** V.73, n.1, p.1-5, 2012.

SUN, X.; CHENG G.; HAO, M. CXCL12/CXCR4/CXCR7 Chemokine Axis and Cancer Progression. **Cancer metastasis reviews.** v.29, n.4, p.709-722, 2010.

SWELAM, W.; IDA-YONEMOCHI, H.; MARUYAMA, S. et al. Vascular endothelial growth factor in salivary pleomorphic adenomas: one of the reasons for their poorly vascularized stroma. **Virchows Arch.** v.446, n.6, p.653-62, 2005.

TEICHER, B. A.; FRICKER, S. P. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin. Cancer Res.** v.16, p.2927–2931

TERANISHI, N.; NAITO, Z.; ISHIWATA, T. et al. Identification of neovasculature using nestin in colorectal cancer. **Int J Oncol.** v.30, p.593e603, 2007.

TIAN, Z.; LI, L.; WANG, L. et al. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v.39, n.3, p.:235-42, 2010.

TOULLEC, A.; GERALD, D.; DESPOUY, G. et al. Oxidative stress promotes myofibroblast differentiation and tumour spreading. **EMBO Mol Med.** v.2, p.211–230, 2010.

TRIANAFILLIDOU, K.; DIMITRAKOPOULOS, J.; IORDANIDIS, F. et al. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. **Oral Dis.** v.12, n.4, p.364-70, 2006.

TRIPATHI, V.; VERMA, R.; DINDA, A. et al. Differential expression of rdc1/cxcr7 in the human placenta. **J Clin Immunol.** v.29, n.3, p.379–386, 2009.

VALSTAR, M. H.; DE RIDDER, M.; VAN DEN BROEK, E. C. et al. Salivary gland pleomorphic adenoma in the Netherlands: A nationwide observational study of primary tumor incidence, malignant transformation, recurrence, and risk factors for recurrence. **Oral Oncol.** v.66, p.93-99, 2017.

VEGARI S; NADERPOUR M; HEMMATI, A etal. Pleomorphic adenoma of the cervical heterotopic salivary gland: a case report. **Case Rep Otolaryngol.** v.2012, p.470652, 2012,

VINDRIEUX, D.; ESCOBAR, P.; LAZENNEC, G. Emerging roles of chemokines in prostate cancer. **Endocr Relat Cancer.** v.16, n.3, p.663–673, 2009.

WAHLBERG, P. et al. Carcinoma of the parotid and submandibular glands--a study of survival in 2465 patients. **Oral Oncol.** v.38, n.7, p.706-713. 2002.

WANG J. et al. The pivotal role of CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 axis in bone metastasis. **Cancer Metastasis Rev.**, v.25, n.4, p.573-587, 2006.

WANG, S.; MA, N.; KAWANISHI, S. Relationships of Alpha-SMA-Positive Fibroblasts and SDF-1-Positive Tumor Cells with Neoangiogenesis in Nasopharyngeal Carcinoma. **BioMed Research International.** p.507353, 2014.

WANG, J.; SUN, Y.; SONG, W. et al. Diverse signaling pathways through the sdf-1/cxcr4 chemokine axis in prostate cancer cell lines leads to altered patterns of cytokine secretion and angiogenesis. **Cell Signal.** v.17, n.12 p.1578–1592, 2005.

WANG, S.; MA, N.; KAWANISHI, S. et al. Relationships of alpha-SMA-positive fibroblasts and SDF-1-positive tumor cells with neoangiogenesis in nasopharyngeal carcinoma. **Biomed Res Int.** v.2014, p.507353, 2014.

WANG, W-M.; ZHAO, Z-L.; ZHANG, W-F. et al. Role of hypoxia-inducible factor-1 α and CD146 in epidermal growth factor receptor-mediated angiogenesis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Molecular Medicine Reports.** v.12, n.3, p.3432-3438, 2015.

WATABE, Y.; MORI, T, S.; YOSHIMOTO, S. Número de cópias aumento de ACTN4 é um indicador de prognóstico no carcinoma da glândula salivar. **Cancer Medicine**. v.3, n.3, p.613-622., 2014.

WEIDNER, N. et al. Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med**. v.324, n.1, p.1-8, 1991.

WEIDNER, N.; SEMPLE, J. P.; WELCH, W. R. et al. Tumour angiogenesis and metastasis e correlation in invasive breast carcinoma. **N Engl J Med**. v.324, p.1e8, 1991.

WEIS, S. M.; CHERESH, D.A. Tumor angiogenesis: molecular pathways and therapeutic targets. **Nat. Med**. v.17, p.1359–1369, 2011.

WELTI, J., LOGES, S., DIMMELER, S. et al. Recent molecular discoveries in angiogenesis and antiangiogenic therapies in cancer. **J. Clin. Invest**. v.123, p.3190e3200, 2013.

WEST, R. B.; KONG, C.; CLARKE, N. et al. MYB expression and translocation in adenoid cystic carcinomas and other salivary gland tumors with clinicopathologic correlation. **Am. J. Surg. Pathol**. v.35, n.1, p.92–99, 2011.

WEN, D.S.; ZHU, X. L; GUAN, S. M et al. Silencing of CXCR4 inhibits the proliferation, adhesion, chemotaxis and invasion of salivary gland mucoepidermoid carcinoma Mc3 cells in vitro. **Oral Oncol**. v.44, n.6, p.545-54, 2008.

WHO. The International Agency for Research on Cancer, Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. 2005.

UCHIDA, D.; KURIBAYASHI, N.; KINOUCI, M. et al. Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. **Clin Exp Metastasis**. v.30, n.2, p.133-42, 2013.

XU, C.; ZHAO, H.; CHEN, H. et al. CXCR4 in breast cancer: oncogenic role and therapeutic targeting. **Drug Design, Development and Therapy**. v.9, p.4953-4964, 2015.

XU, T-P.; SHEN, H.; LIU, L-X. et al. The impact of chemokine receptor CXCR4 on breast cancer prognosis: a meta-analysis. **Cancer Epidemiol**. v.37, p.725–731, 2013.

XU, X.; RODRIGUEZ, D.; PETITCLERC, E. et al. Proteolytic exposure of a cryptic site within collagen type-IV is required for angiogenesis and tumor growth in vivo. **J. Cell Biol.** v.154, p.069–1079, 2001.

YANG, L.; HUANG, J.; REN, X. et al. Abrogation of TGF beta signaling in mammary carcinomas recruits Gr-1+CD11b+ myeloid cells that promote metastasis. **Cancer cell.** v.13, n.1, p.23–35, 2008.

YILMAZ, O, H.; VALDEZ, R.; THEISEN, B. K. et al. Pten dependence distinguishes haematopoietic stem cells from leukaemia-initiating cells. **Nature.** v.441, n.7092, p.475–482.

ZAGZAG, D.; LUKYANOV, Y.; LAN, L. et al. Hypoxia-inducible factor 1 and VEGF upregulate CXCR4 in glioblastoma: implications for angiogenesis and glioma cell invasion. **Lab Invest.**v.86, n.12, p.1221-32, 2006.

ZAMARRO, M. T. L.; ROYO, A. G. et al. Afección tumoral de las glándulas salivales. **Nuestra experiencia. Acta. Otorrinolaringol Esp.** v.60, p.120-5, 2009

ZEELLENBERG, I. S.; RUULS-VAN STALLE, L.; ROOS, E. Retention of CXCR4 in the endoplasmic reticulum blocks dissemination of a T cell hybridoma. **J. Clin Invest.**, v.108, p.269–77, 2001.

ZHANG, Z.; NI, C.; CHEN, W. et al. Expression of CXCR4 and breast cancer prognosis: a systematic review and meta-analysis. **BMC Cancer.** v.14, p.49, 2014.

ZOU, Y. R.; KOTTMANN, A. H.; KURODA, M. et al. Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. **Nature.** v.393, p.595–599, 1998.

ANEXOS



ANEXO A

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISADOR
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS
PLATAFORMA BRASIL**



Título da Pesquisa: IMUNOEXPRESSIONÃO DE CXCL12, CXCR4, MMP9, BCL-2, KI-67, MUC1 E VEGF: SUA RELEVÂNCIA NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES.

Pesquisador Responsável: MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ.

Orientando: José Matheus Alves dos Santos.

Rodolfo de Abreu Carolino.

CAAE: 03329316.4.0000.5187

SITUAÇÃO DO PROJETO: APROVADO.

Data da relatoria CEP-UEPB: 17/02/2016

Situação do projeto: APROVADO

Apresentação do Projeto: Projeto encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba, para Análise e parecer com fins de desenvolvimento da pesquisa para elaboração de dissertação de conclusão do curso de Mestrado em Odontologia, do programa de Pós-Graduação em Odontologia, da UEPB. Trata-se de um estudo de caráter descritivo probabilístico correlacional entre as características clínico-histomorfológicas de uma série de Adenomas pleomórficos, Mioepiteliomas, Carcinomas Mucoepidermóides e Carcinomas adenóides císticos e a análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão imunohistoquímica das proteínas CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC-1 e VEGF, no intuito de obter maiores informações que contribuam ao conhecimento do papel de tais proteínas em relação ao comportamento biológico das neoplasias acima citadas. A população do estudo será composta por casos registrados e diagnosticados nos Arquivos dos Laboratórios de Patologia Oral do Programa de Pós-Graduação em Odontologia do Departamento de Odontologia da UEPB e do Arquivo de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laurenano/João Pessoa-PB, serão selecionados espécimes de AP, Mioepitelioma, OME e CAC que constituirão a amostra. A

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, CXCR4, MMP9, BCL-2, KI-67, MUC1 E VEGF: SUA RELEVÂNCIA NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Pesquisador: MANUEL ANTONIO GORDÓN NÚÑEZ

Área Temática:

Versão: 1

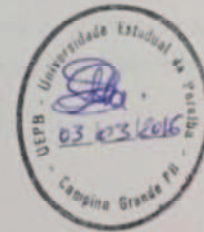
CAAE: 53329316.4.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.435.401



ANEXO B

Journal of Oral Pathology & Medicine

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd



Edited By: Peter Brennan

Impact Factor: 1.859

ISI Journal Citation Reports © Ranking: 2015: 25/89 (Dentistry Oral Surgery & Medicine); 41/78 (Pathology)

Online ISSN: 1600-0714

Author Guidelines

Content of Author Guidelines: 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

Useful Websites: Submission Site, Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine, Author Services, Wiley Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

1. GENERAL

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication

in *Journal of Oral Pathology & Medicine*. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

Note to NIH Grantees

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication.

For further information, see www.wiley.com/go/nihmandate.

2. ETHICAL GUIDELINES

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

2.1. Authorship and Acknowledgements

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

2.2. Ethical Approvals

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent form in all

instances. Consent Form Template.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

2.3 Clinical Trials

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

2.4 Conflict of Interest

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

2.5 Appeal of Decision

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

2.6 Permissions

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

2.7 Copyright Assignment

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement

If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

CTA Terms and Conditions http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp

For authors choosing OnlineOpen

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

2.8 OnlineOpen

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp. Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Gill Smith at JOPM.office@editorialoffice.co.uk

3.1. Getting Started

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
 - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
 - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
 - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'.

The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.

- Log-in and select 'Author Centre'.

3.2. Submitting Your Manuscript

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
 - Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
 - Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
 - When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

3.3. Manuscript Files Accepted

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rtf) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but *no* embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

3.4. Blinded Review

All manuscripts submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* will be reviewed by two experts in the field. *Journal of Oral Pathology & Medicine* uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

3.6. E-mail Confirmation of Submission

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server (uranus.scholarone.com) to their whitelist.

3.7. Manuscript Status

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

3.8. Submission of Revised Manuscripts

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

Review Papers: *Journal of Oral Pathology & Medicine* commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

Case Reports: Please note that *Journal of Oral Pathology & Medicine* no longer accepts submissions of case reports.

Brief Reports: Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1.000 words maximum.

Letters to the Editor: Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in *Journal of Oral Pathology & Medicine* or they may raise new issues, but should have important implications.

750 words maximum. One figure or table, 5 references.

5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE

5.1. Page Charge

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

5.2. Format

Language: The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Abbreviations, Symbols and Nomenclature: Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and

medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

Font: When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

5.3. Structure

All papers submitted to *Journal of Oral Pathology & Medicine* should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

Title Page: Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

Abstract: is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

Main Text of Original Articles: should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

Introduction: should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

Materials and Methods: must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

(i) Clinical trials: Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at www.consort-statement.org. A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: www.clinicaltrials.gov, <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

(ii) Experimental subjects: Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 www.wma.net/e/policy/b3.htm) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement

regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

(iii) Suppliers: Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

Discussion: Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

Main Text of Review Articles comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

Acknowledgements: Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

Conflict of Interest Statement: All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Identify references in text, tables, and legends by Arabic numerals (in parentheses). References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based on the formats used in Index Medicus. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style used in Index Medicus and the Vancouver System.

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: www.refman.com/support/rmstyles.asp

Examples of the Journal's reference style:

(1) Standard journal article

(List all authors when 6 or less; when 7 or more, list only the first 3 and add et al.)

BUCHNER A, SCIUBBA JJ. Peripheral epithelial odontogenic tumors: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1987; 63: 688-97.

HEINIC GS, GREENSPAN D, MACPHAIL LA, et al. Oral Histoplasma capsulatum infection in association with HIV infection: a case report. *J Oral Pathol Med* 1992; 21: 85-9.

(2) Corporate author

European Collaborative Study. Risk factors for mother-to-child transmission of HIV-1. *Lancet* 1992; 339: 1007-12.

(3) No author given

Anonymous. 'The importance of being early' [leader]. *Br Dent J* 1991; 170: 167.

(4) Journal supplement

MØLLER-PETERSEN J. Evaluation of diagnostic tests. Design and phases. *Scand J Clin Lab Invest* 1992; 52: suppl. (208): 35-50.

CROSS SS, SCHOLFIELD JH, KENNEDY A, COTTON DWK. Measuring the fractal dimension of tumour borders. *J Pathol* 1992; 168: 117A (abstr).

(5) Journal paginated by issue

HILLAM C. Dentistry in Europe in the 1790's. *Dent Historian* 1992; 22: (May): 31-4.

(6) Book

PINDBORG JJ. Atlas of diseases of the oral mucosa. Copenhagen: Munksgaard, 1992: 50-66.

(7) Chapter in a book

VAN DER WAAL I. Salivary gland neoplasms. In: PRABHU SR, WILSON DF, DAFTARY DK, JOHNSON NW, eds. *Oral diseases in the tropics*. Oxford: Oxford Medical, 1992; 478-86.

(8) Published proceedings paper

DRINNAN AJ. Review of the literature: educational aspects of oral medicine. In: MILLARD HD, MASON DK, eds. *World workshop on oral medicine*. Chicago: Year Book Medical, 1989; 5-11.

(9) Agency publication

MUIR C, WATERHOUSE J, MACK T, POWELL J, WHELAN S. Cancer incidence in five continents: Vol. 5. Lyon: International Agency for Research on Cancer, 1987; IARC Scientific Publications No. 88.

(10) Dissertation or thesis

CHUNGPANICH S. The diagnostic and prognostic potential of nucleolar organizer regions in oral epithelial dysplasia. MMedSci Thesis, University of Sheffield, 1989.

5.5. Tables, Figures and Figure Legends

Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page. Tables with greater than 6 columns will be counted as multiple tables.

Figures: All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast. Multi-paneled figures will be counted as multiple figures. Figures can contain multiple images as long as these are grouped together on one page per figure with one legend for each figure.

Due to space constraints within the Journal, no more than 6 figures and/or tables will be allowed

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

6. AFTER ACCEPTANCE

6.1 Proofs

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

6.2 Supporting Information

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

6.3 Early View

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

6.4 Offprints

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthorfor> for more information.

6.5 Author Services

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript.

Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

APÊNDICE A

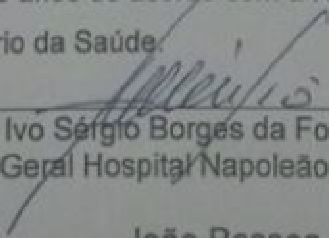
CNPJ: 09.112.236/0001-94
AV. CAPITÃO JOSÉ PESSOA, 1140
JAGUARIBE – JOÃO PESSOA – PB
CEP 58015-170 TEL: (83) 3015-6226

TERMO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA USO E COLETA DE DADOS EM ARQUIVOS

Estamos cientes da intenção da realização do projeto intitulado "IMUNOEXPRESSION DE CXCL12, CXCR4, MMP9, BCL-2, KI-67, MUC-1 e VEGF: SUA RELEVÂNCIA NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES" desenvolvido pelo aluno do Grupo de Pesquisa da Base em Diagnóstico Oral da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), José Matheus Alves dos Santos e Rodolfo de Abreu Carolino, sob orientação do Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez do Curso de Odontologia da UEPB.

A coleta de dados será do tipo documental e acontecerá no Arquivo dos Serviços de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa - PB. A referida pesquisa se propõe realizar uma análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica da CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC-1 e VEGF em espécimes de Adenoma pleomórfico, Carcinoma mucoepidermóide e Carcinoma adenoide cístico, buscando determinar a existência de alterações quali-quantitativas na expressão dessas proteínas e se essa expressão guarda relação com aspectos do comportamento biológico nessas lesões como a taxa de apoptose e invasão tumoral na neoplasias malignas e o potencial de malignização dos adenomas pleomórficos.

Após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB, toda a documentação relativa a este trabalho deverá ser entregue em duas vias (sendo uma em CD e outra em papel) a esta instituição sediadora da pesquisa que também arquivará por cinco anos de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde.


Dr. Ivo Sérgio Borges da Fonseca
Diretor Geral Hospital Napoleão Laureano

João Pessoa, 07 de dezembro de 2015

