



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

JOSÉ MATHEUS ALVES DOS SANTOS

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, BCL-2 E MMP-9: SUA RELEVÂNCIA
NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS
DE GLÂNDULAS SALIVARES**

Campina Grande/PB

2016

JOSÉ MATHEUS ALVES DOS SANTOS

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, BCL-2 E MMP-9: SUA RELEVÂNCIA
NO COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS
DE GLÂNDULAS SALIVARES**

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

Orientador: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez

Campina Grande/PB

2016

É expressamente proibida 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 da dissertação.

S237i Santos, José Matheus Alves dos.
Imunoexpressão de CXCL12, BCL-2 E MMP-9 [manuscrito] :
sua relevância no comportamento biológico de neoplasias de
glândulas salivares / José Matheus Alves dos Santos. - 2016.
86 p. : il. color.

Digitado.
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade
Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde,
2016.

"Orientação: Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez,
Departamento de Odontologia".

1. Quimiocinas. 2. Citocinas. 3. CXCL12. 4. BCL-2 gene.
5. Neoplasias bucais. I. Título.

21. ed. CDD 617.6

JOSÉ MATHEUS ALVES DOS SANTOS

**IMUNOEXPRESSÃO DE CXCL12, BCL-2 E MMP-9: SUA REVELÂNCIA NO
COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DE NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

DATA DA DEFESA: 18/08/2016

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

BANCA EXAMINADORA



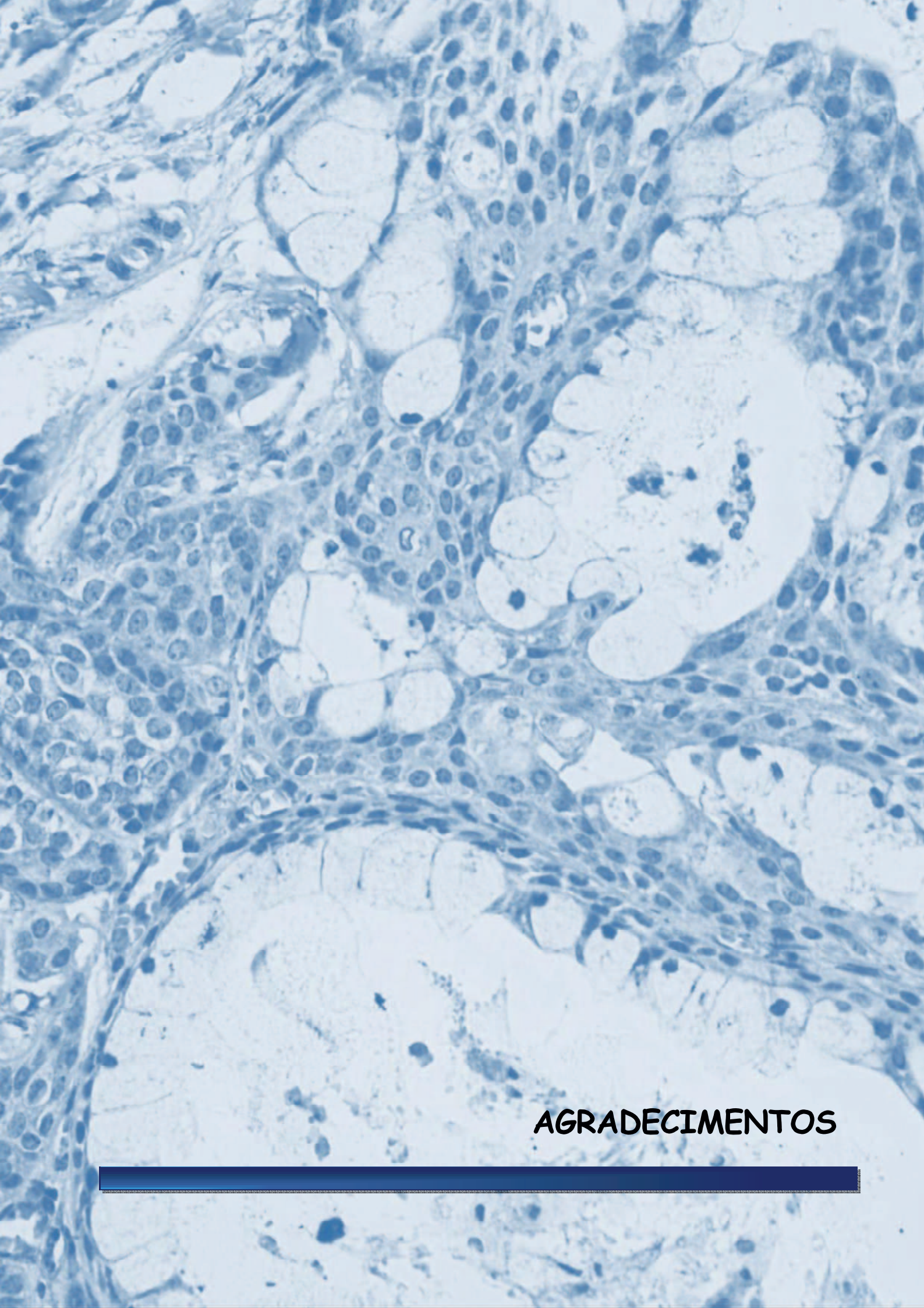
Profa. Dra. Hebel Cavaleanti Galvão – UFRN
Membro Titular (1º Examinador)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka – UEPB
Membro Titular (2º Examinador)



Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez – UEPB
Membro Titular (Orientador)



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

À Deus, pois sem sua intervenção na minha vida nada eu seria. Por todas as vezes que Ele me deu forças quando eu nem sabia da existência e por ter colocado pessoas maravilhosas em minha vida.

À minha família, á minha tia Maria Gorete dos Santos, agradeço pelo incansável esforço, por ter me ajudado a trilhar esse caminho e por sempre me incentivar nas batalhas diárias. Ao meu pai José Ednaldo dos Santos (*in memorian*) que foi um homem inspirador por possuir tamanha garra, suas vitórias, seu levantar após quedas, na humildade e forma de carinho, além do seu olhar quase sempre à frente. À minha Tia Maria Socorro dos Santos, por todo carinho, dedicação e ajuda nos momentos difíceis. À minha mãe Tereza Alves Pereira pelo carinho e conversas.

Aos meus amigos do laboratório Arley, Geisa, Maraiza, Luana, Luan e Rodolfo. Pude aprender e trocar conhecimentos durante esse tempo, além de boas conversas e inúmeros cafés. Aos meus amigos de mestrado Carol Medeiros, Matheus Perazo, Jéssica Lira, Jamesson Andrade e Katharina Rabelo pelo carinho, força, fé e inúmeros momentos de descontração.

À Hellen Bandeira que foi mais que uma amiga, uma irmã, uma pessoa que ajudou com conversas e conselhos, além de sempre compartilhar um pouco do seu conhecimento. À Livia Nathália por seu companheirismo nesses árduos e felizes momentos de mestrado. À Naiana Braga por sempre auxiliar e me incentivar à docência.

À Andressa Melo, Fernanda Clotilde e Hianne Moraes por sempre compartilharem seus bens mais preciosos, a família e o lar. Pela cumplicidade vivida, amizade, respeito, confiança e pelos momentos que agiu como uma mãe. Ainda pela sinceridade, alegria e espontaneidade.

À Gilson Junior, Marcella Monnara e Paula Lorena por sempre abrirem as portas quando foi preciso e pelos momentos de descontração.

Ao meu orientador Professor Dr. Manuel Antonio Gordón-Nuñez. Pela confiança depositada, seu tempo de dedicação a nossa pesquisa e pela disponibilidade. Por servir de inspiração como ser humano e competência.

A professora Dra. Pollianna Muniz Alves, que foi a primeira e a última professora a me orientar dentro de sala de aula e, sua generosidade em seus ensinamentos.

Ao professor Dr. Francisco Cassiano Weege Nonaka. Por sua orientação na pesquisa, em apresentações, correções minuciosas, conversas e por todo o tempo dedicado de forma altruísta.

À professora Dr. Bárbara Vanessa de Brito Monteiro por ter me dado a mão quando foi necessária. Por contribuir de uma forma tão significativa na pesquisa, além da demonstração de lealdade e delicadeza.

À professora Dra. Aline Carvalho Batista pela confiança no meu trabalho, por ceder local e instrumentos para que nossa pesquisa fosse realizada. Além do incentivo, dedicação e carinho.

Ao professor Dr. Elismauro Francisco Mendonça por me receber na UFG. Por sua contribuição significativa na pesquisa e confiança.

A professora Dr. Maria Cássia Ferreira Aguiar pela atenção, contribuições essenciais delicadeza na forma de falar.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB, em especial a Dra. Ana Flávia Granvielle-Garcia, Dra. Daliana Queiroga de Castro Gomes, Dr. Gustavo Pina Godoy e Dra. Patrícia Meira Bento por todos os ensinamentos e carinho.

A Pamela, Dione, Renale, Denize e Ana Luzia por auxílio e trabalho exemplar. Em especial a Denize e Ana, sem elas a pesquisa não teria prosseguido com tanta rapidez.

Aos meus colegas da UFG Arthur Wilson, Marília, Tessa, Andreia, Diego, Alisson e Carla.

A todos que contribuíram de forma direta e indireta para a realização desse 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.

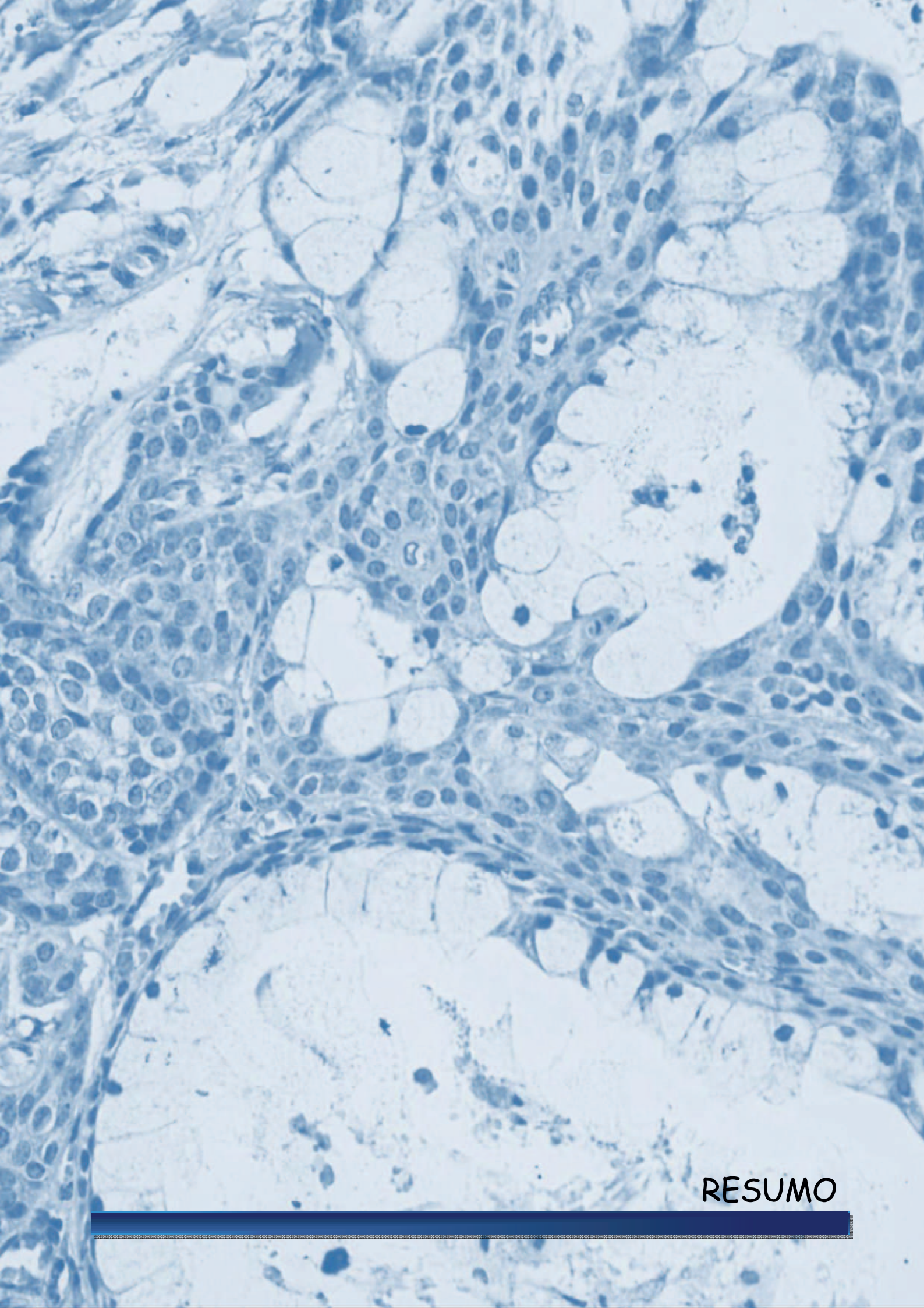
À **Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás – FO/UFG** – na pessoa da professora Aline Carvalho Batista.

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.

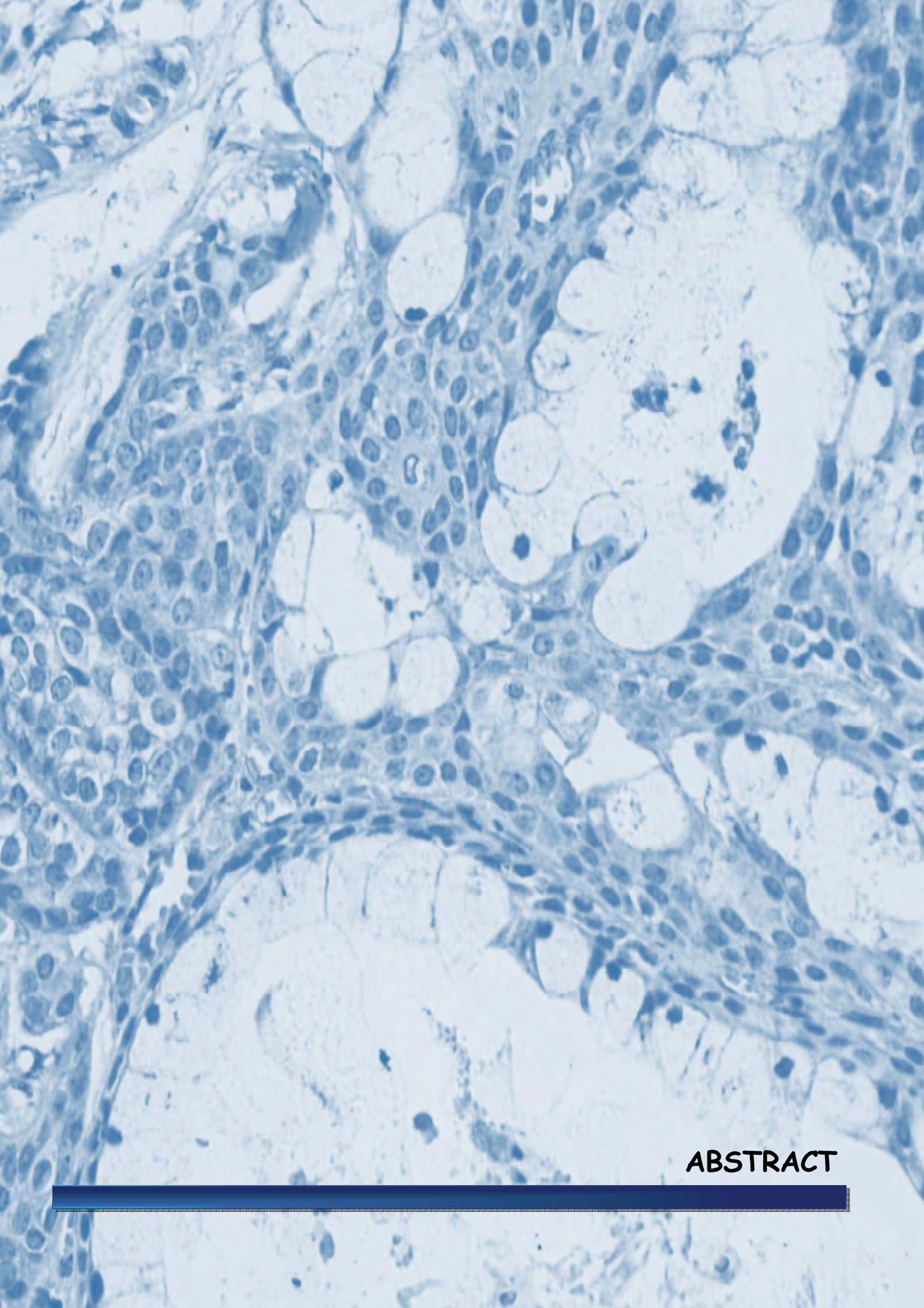


RESUMO

RESUMO

Introdução: As citocinas pró-inflamatórias ou quimiocinas são importantes reguladores das interações e adesões celulares. A quimiocina CXCL12 (*C-X-C motif chemokine ligand 1*) liga-se principalmente ao receptor CXCR4, regulando sinalizações intracelulares, através de várias vias, relacionadas a eventos importantes na tumorigênese como a quimiotaxia, proliferação e sobrevivência celular, angiogênese, invasão e metástase. Existe pouca informação na literatura científica sobre a relação da CXCL12 com marcadores de sobrevivência ou apoptóticos (Bcl-2) e de invasão/metástase (MMP-9) em neoplasias de glândulas salivares. **Métodos:** Em 30 adenomas pleomórficos (AP) e 30 carcinomas mucoepidermóides (CME) foram coletados dados clínico-patológicos os quais foram analisados em relação à expressão imunistoquímica, por meio do método estreptavidina-biotina peroxidase, dos anticorpos CXCL12, Bcl-2 e MMP-9. **Resultados:** observou-se maior expressão da CXCL12 no CME do que no AP ($p = 0,001$), enquanto que em AP houve maior expressão de Bcl-2 ($p=0,031$). A MMP-9 foi negativa na maioria dos casos da amostra. **Conclusão:** Conclui-se que a expressão da CXCL12 não parece estar associada com a Bcl-2 e MMP-9. A quimioquina pode ser relacionada com a patogênese de carcinomas mucoepidermóides, ao passo que a proteína Bcl-2 pode ser relacionada com a patogênese de adenomas pleomórficos. A MMP-9 não parece exercer um papel na patogenia da amostra avaliada.

Palavras chave: CXCL12, gene bcl-2, MMP-9, adeoma pelomorfico, carcinoma mucoepidermoide

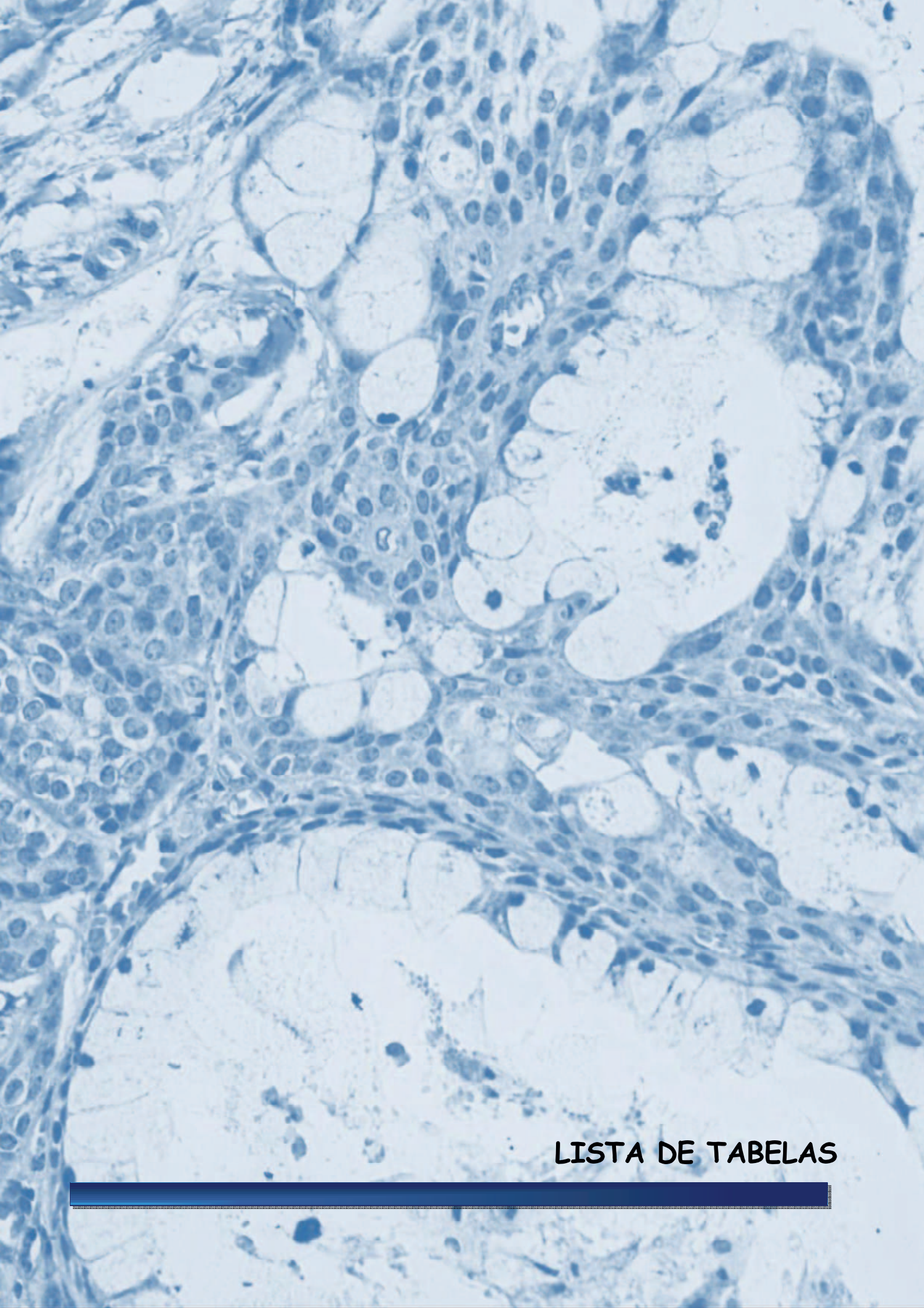


ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Proinflammatory cytokines or chemokines are important regulators of cell trafficking and adhesions. The chemokine CXCL12 (C-X-C motif chemokine ligand 12) binds primarily to CXCR4 receptor, regulating intracellular signals, through several ways, related to important events in tumorigenesis as chemotaxis, cell survival, angiogenesis, proliferation, invasion and metastasis. There are insufficient informations in scientific literature about the CXCL12 in relation to survival or apoptotic markers (Bcl-2) and invasion/metastasis (MMP-9) in tumor cells of salivary gland neoplasm. **Methods:** In 30 pleomorphic adenomas (PA) and 30 mucoepidermoid carcinomas (MCE) were collected clinical and pathological data and analyzed in relation to the immunohistochemical expression, through the estroptovidin-biotin peroxidase method, of CXCL12, Bcl-2 and MMP-9 antibodies. **Results:** it was observed higher expression of CXCL12 in MCE than in PA ($p = 0.001$), while in PA there has been greater expression of Bcl-2 ($p = 0.031$). The MMP-9 was negative in most cases of the sample. **Conclusion:** it was concluded that the CXCL12 is not associated with the Bcl-2 and MMP-9 expression. The chemokine can be related to pathogenesis of mucoepidermoid carcinomas, whereas the Bcl-2 can be related to tumoral pathogenesis of pleomorphic adenomas. MMP-9 does not appear to play a role in the pathogenesis of the sample.

Keywords: CXCL12, bcl-2 gene, MMP-9, pleomorphic adenoma, mucoepidermoid carcinoma

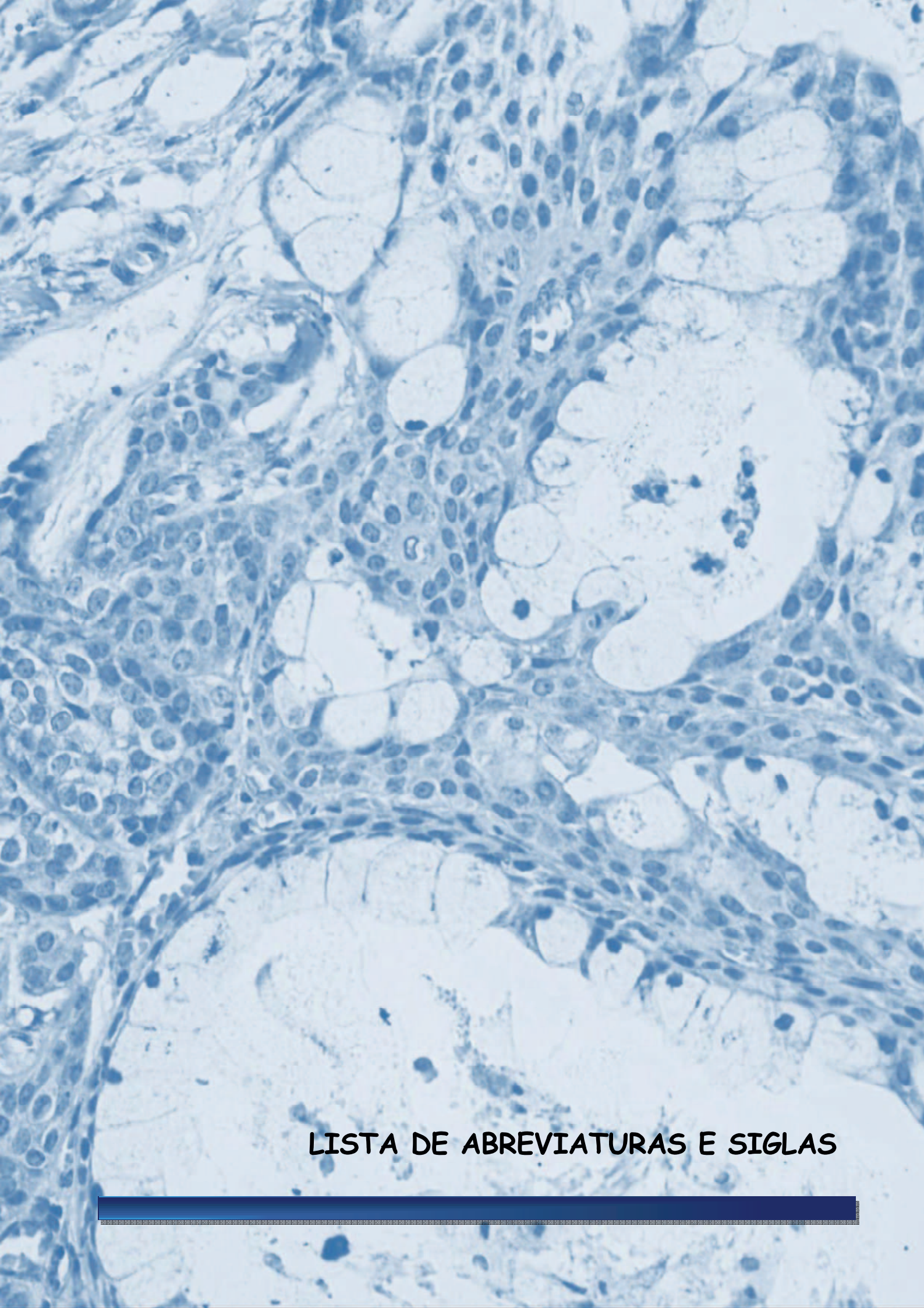


LISTA DE TABELAS

--

LISTA DE TABELAS

TABELA	TÍTULO	Página
Tabela 1	Distribuição absoluta e relativa dos casos de adenoma pleomórfico de acordo com características clínico-morfológicas.....	57
Tabela 2	Distribuição absoluta e relativa dos casos de carcinoma mucoepidermoide de acordo com características clínico-patológicas.....	57
Tabela 3	Distribuição absoluta e medianas relativas de imunoexpressão para Bcl-2 e CXCL-12 e suas diferenças de acordo com as características clínico-patológicas dos adenomas pleomórficos e carcinoma mucoepidermoides.....	59
Tabela 4	Distribuição absoluta de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermoide MMP-9 positivo.....	60
Tabela 5	Medianas relativas da Bcl-2 e CXCL12 e correlação entre o tipo de lesão.....	61

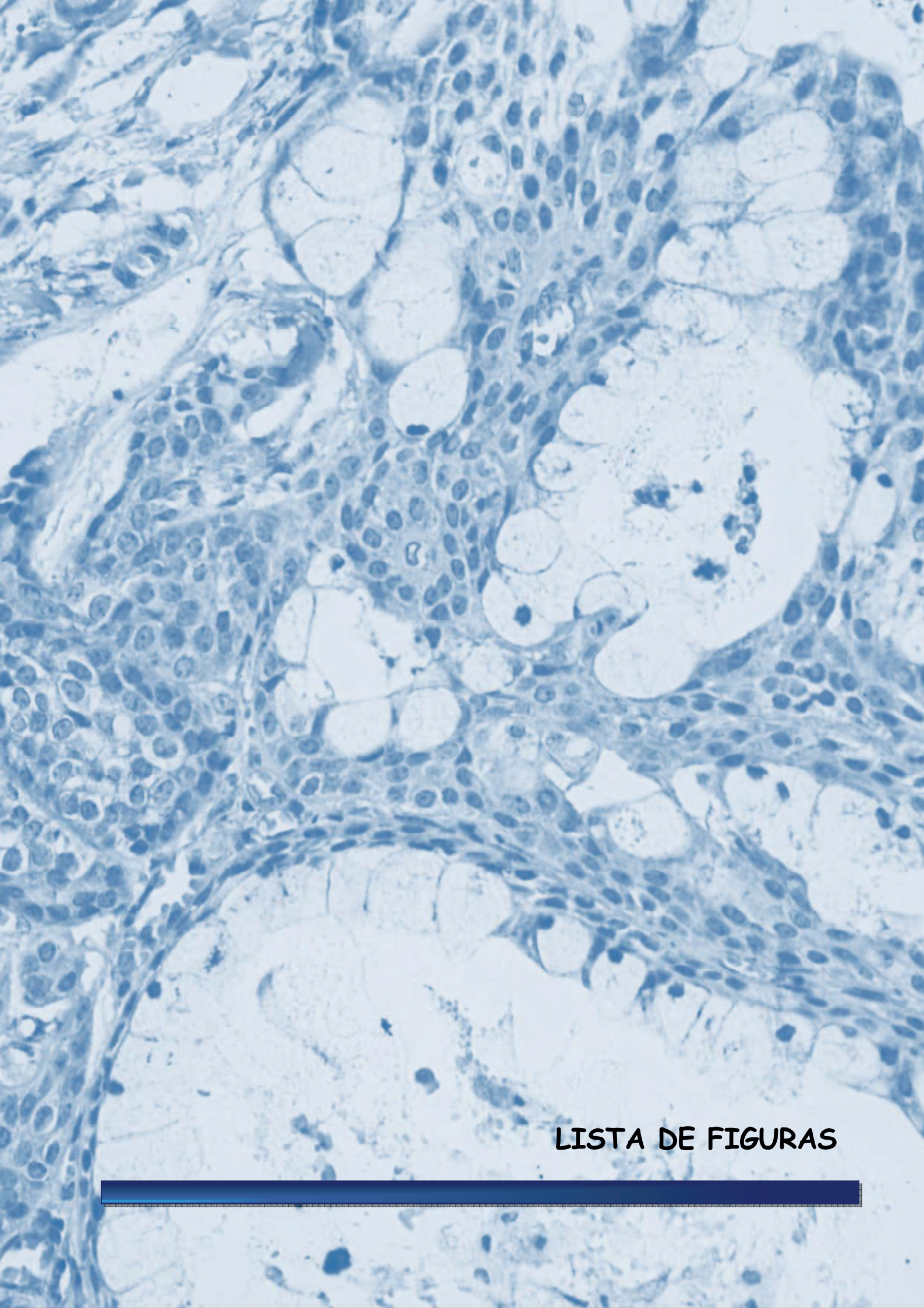


LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bax:	Do inglês <i>Bcl-2 like protein 4</i> , traduzido proteína pró-apoptótica BAX.
Bad:	Do inglês <i>Bcl-2 associated death promoter</i> , traduzido como proteína pró-apoptótica BAD.
BAK:	Do inglês <i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> , traduzido como proteína pró-apoptótica BAX.
BCL-2:	Do inglês <i>B-cell lymphoma 2</i> , traduzido como protooncogene do Linfoma de células B.
BCL-XL:	Do inglês <i>B-cell lymphoma-extra large</i> , traduzido como proteína anti-apoptótica BCL-XL.
BID:	Do inglês <i>BH 3 interacting domain death agonist</i> , traduzido como proteína pró-apoptótica BID.
BIM:	Do inglês <i>Bcl-2 like protein 11</i> , traduzido como proteína pró-apoptótica BIM.
CAPES:	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior.
CNPq:	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico.
CXCL12:	Do inglês <i>C-X-C motif chemokine ligand 12</i> , traduzido como Quimiocina ligante modificadora CXC.
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.
FAK:	Do inglês <i>quinase adhesion focal</i> , traduzido como quinase de adesão focal.
FGT-α:	Do inglês <i>Transforming growth factor alpha</i> , traduzido como Fator transformador de crescimento alfa.
GDP:	Guanosina difosfato.
GTP:	Guanosina Trifosfato.
HIF:	Do inglês <i>hypoxia inducible factor</i> , traduzido como Fator indutor de hipóxia.
IL-1:	Do inglês <i>Interleukin 1</i> , traduzido como interleucina 1.
MEC:	Matriz extracelular.
HRK:	Do inglês <i>Hariki, Bcl-2 interacting protein</i> , traduzido como ativador de apoptose Hariki.
MMP:	Do inglês <i>matrix metalloproteinases</i> , traduzido como Metaloproteinase de matriz.

- MUC-1** Do inglês *expression of mucin gene 1* traduzido como Gene de expressão de mucina 1.
- PROAP:** Programa de Apoio à Pós-Graduação.
- PROCAD:** Programa Nacional de Cooperação Acadêmica.
- TNF:** Do inglês *Tumor necrosis fator*, traduzido como Fator necrose tumoral.
- TNF- α :** Do inglês *Tumor necrosis fator alpha*, traduzido como Fator de necrose tumoral alfa.
- UEPB:** Universidade Estadual da Paraíba.
- VEGF:** Do inglês *vascular endothelial growth fator*, traduzido como Fator de crescimento endotelial vascular.
- WHO:** Do inglês *World Health Organization*, traduzido como Organização Mundial da Saúde.

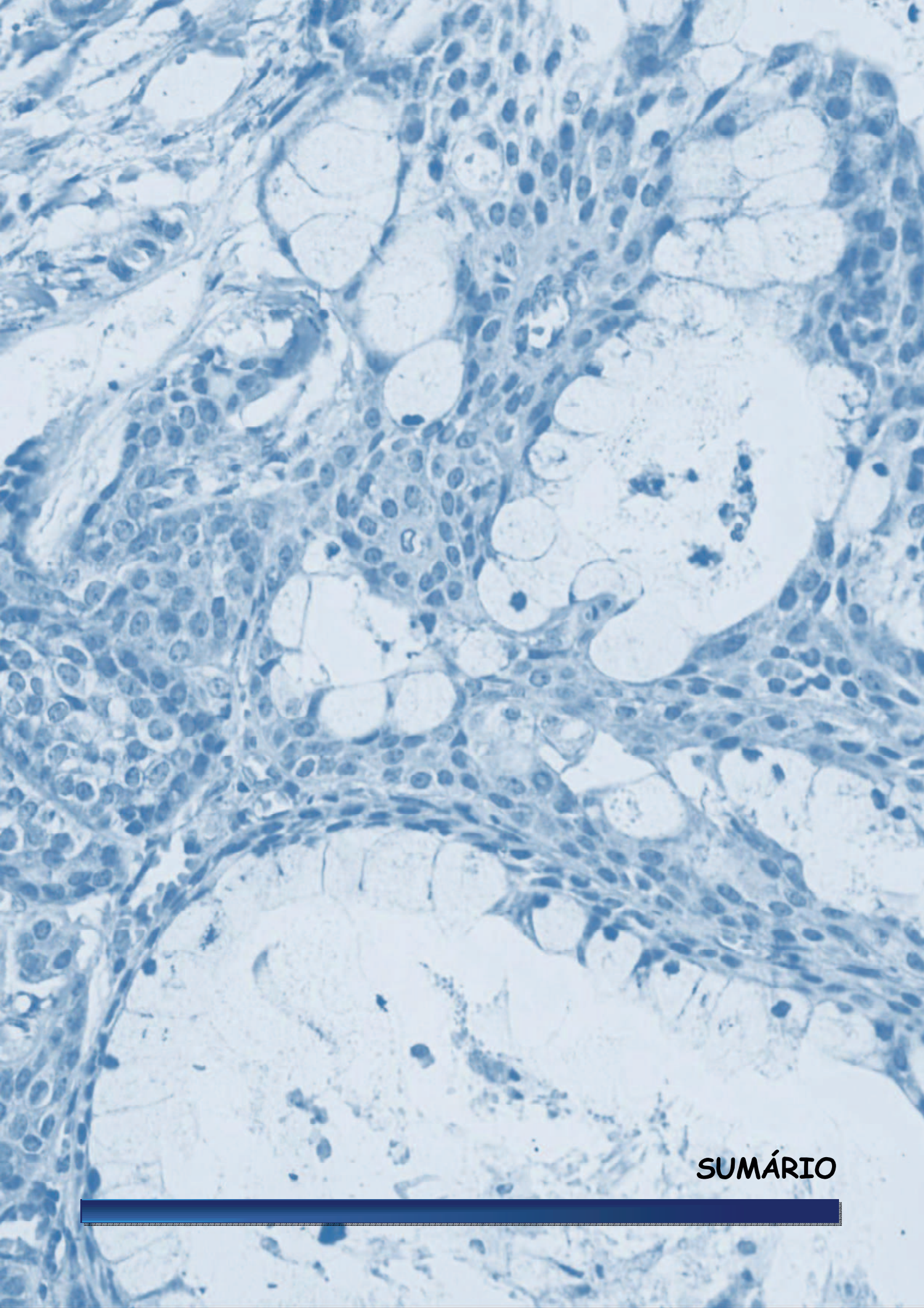


LISTA DE FIGURAS

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1A Células neoplásicas de AP CXCL12 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400).....	61
Figura 1B Células neoplásicas de CME CXCL12 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400)	61
Figura 1C Células neoplásicas de AP Bcl-2 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400).....	61
Figura 1D Células neoplásicas de CME Bcl-2 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400)	61
Figura 2A Células neoplásicas de AP MMP-9 negativas e células do infiltrado inflamatório MMP-9 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400).....	62
Figura 2B Células neoplásicas de AP MMP-9 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400).....	62
Figura 2C Células neoplásicas de CME MMP-9 negativas e células do infiltrado inflamatório MMP-9 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400).....	62
Figura 2D Células neoplásicas de CME MMP-9 positivas (Novolink™, Novocastra, x 400).....	62



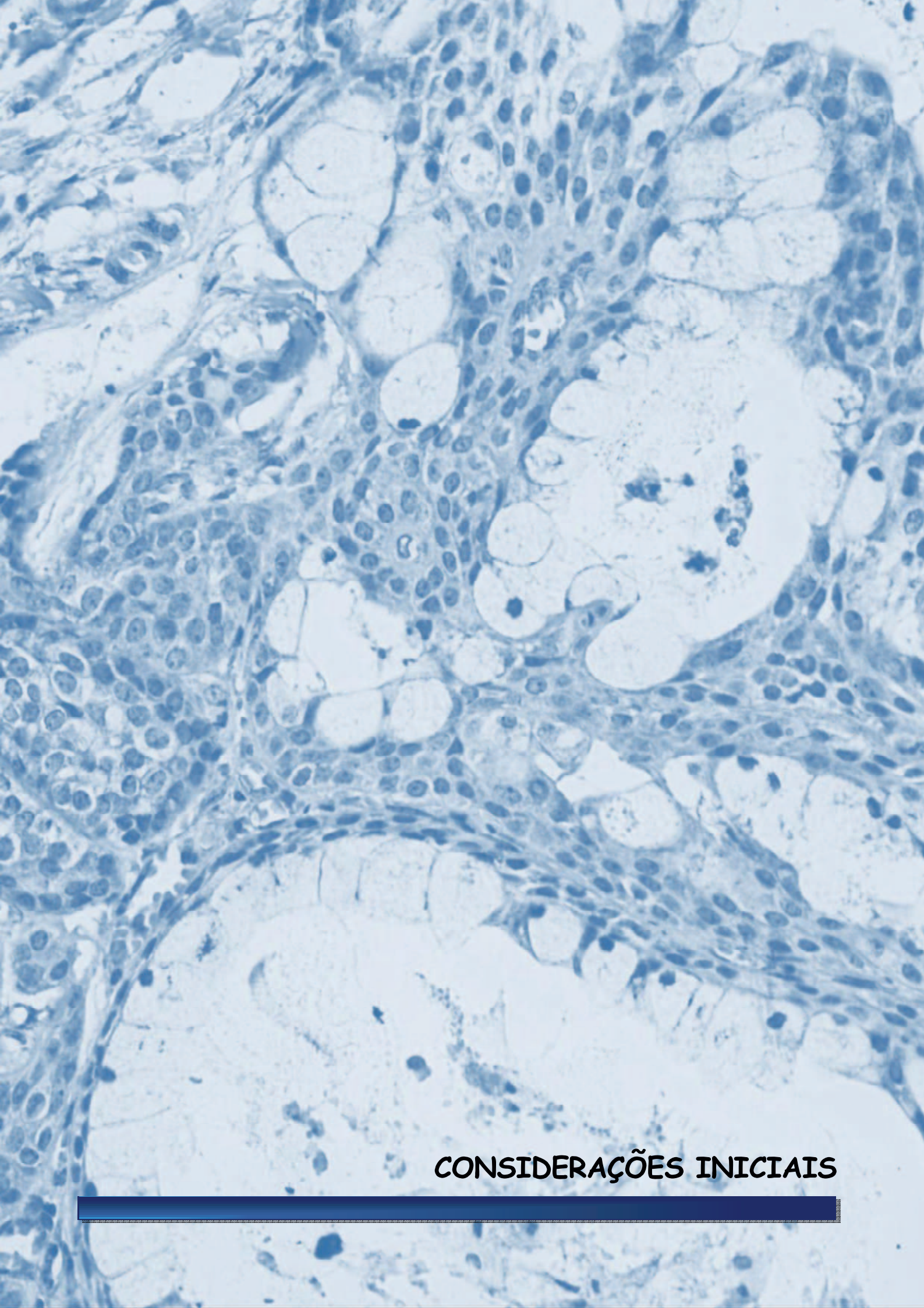
SUMÁRIO

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
---	---	---	---	---	---	---	---	---	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	-----

SUMÁRIO

Página

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS.....	21
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 OBJETIVO GERAL	31
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
3 MATERIAIS E MÉTODOS	31
3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	31
3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	31
3.3 POPULAÇÃO	31
3.4 AMOSTRA	31
3.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA	34
3.5.1 Critérios de inclusão	34
3.5.2 Critérios de exclusão	34
3.6 COLETA DE DADOS EPIDEMIOLÓGICO	34
3.7 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO	34
3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO	35
3.8.1 Método imunoistoquímico	35
3.8.2 Análise do perfil imunoistoquímico	37
3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
4 ARTIGO	40
4.1 APRESENTAÇÃO DO ARTIGO.....	41
4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	42
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	63
6 REFERÊNCIAS.....	65
ANEXOS.....	71



CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

A extensa relação de processos patológicos que acometem as glândulas salivares tem sido objeto de estudos em diversas regiões geográficas do mundo, os quais discutem aspectos relacionados às lesões de maior frequência e interesse no campo da patologia oral, muitas das quais podem representar uma tarefa desafiante para os profissionais no tocante ao diagnóstico adequado. As glândulas salivares podem ser acometidas por patologias diversas, que incluem anomalias de desenvolvimento, lesões reacionais e obstrutivas, doenças infecciosas, inflamatórias, autoimunes e neoplasias (WAHLBERG et al, 2002; AL-KHATEEB et al, 2006; ABABNEH, 2007)

As neoplasias de glândula salivar tem patogênese incerta, porém acredita-se que fatores como radiação ionizante, vírus, radiação ultravioleta, álcool e tabaco tenham algum papel na sua etiologia (BEN-IZHAK et al, 2007; BARNES et al, 2005).

Relata-se que a incidência de neoplasias glandulares salivares varia de 0,4 a 3,5 casos em cada 100 mil pessoas, representando menos de 5% dos tumores da região de cabeça e pescoço em adultos e aproximadamente 8% das neoplasias na população infantil (ELLIES; et al, 2006; AL-KHATEEB et al, 2007; ANSARI, 2007). A maioria dos dados epidemiológicos aponta que a população feminina é a mais acometida, variando de 54% a 62% (VARGAS et al, 2002; SANTOS et al, 2003; ITO et al, 2005; JONES et al, 2008).

A maioria das neoplasias glandulares salivares ocorre em pacientes com idade média de 45 anos. Os tumores benignos constituem o grupo mais frequente, prevalecendo em pacientes na terceira década de vida, enquanto que as malignas em pessoas na sexta década de vida (AL-KHATEEB et al, 2007; ZAMARRO et al, 2009). Os perfis epidemiológicos ao redor do mundo apresentam variações na ocorrência das neoplasias glandulares salivares, em relação à localização, a parótida é a glândula mais acometida pelas neoplasias, seguida pela submandibular. Dentre as neoplasias benignas, destaca-se o Adenoma pleomórfico (AP) por representar 60% de todas as neoplasias salivares, caracterizado como tumor encapsulado, composto por uma variedade de células epiteliais e meioepiteliais entremeadas com o estroma de natureza variável. Tem predileção pelo sexo feminino, a idade média de diagnóstico é 46 anos, ocasionalmente observa-se lesões em pacientes jovens (BARNES et al, 2005; KHATEEB et al, 2007; ZAMARRO et al, 2009; TIAN et al, 2010; STRUB et al, 2012).

O AP possui um crescimento lento, sendo a glândula parótida o sítio mais acometido (80%), seguido da glândula submandibular (10%) e glândulas salivares menores da cavidade

oral (principalmente a região de palato). Clinicamente, os tumores menores apresentam-se como massas firmes e móveis. Com a progressão tendem a tornar-se imóveis, causar sintomatologia dolorosa e, aquelas acometendo a parótida, com tendência a paralisia facial. Geralmente são lesões solitárias, podendo associar-se a outros tumores como o Carcinoma ex-adenoma pleomórfico. A cápsula usualmente é bem circunscrita, por vezes em algumas áreas apresenta descontinuidade e invasão de células tumorais (BARNES et al, 2005; CARDESA et al, 2006).

O quadro histopatológico é composto por células epiteliais e mioepiteliais em um estroma variável, mixomatoso, hialino, condroide ou osteoide. As células mioepiteliais podem apresentar-se fusiformes, anguladas, ovoides, poligonais ou plasmocitóides. O arranjo epitelial pode ser em forma de ductos, estruturas císticas, ilhas ou cordões celulares. As células acinares mucosas possuem citoplasma eosinofílico, núcleos granulares vacuolizados e hipercromáticos, com baixo índice mitótico. Os condutos são preenchidos por material eosinofílico, podendo-se observar a formação de pérolas de ceratina próximo ao epitélio escamoso metaplásico. Com o desenvolvimento tumoral observa-se o aumento do estroma hialino e diminuição do componente epitelial (BARNES et al, 2005; CARDESA et al, 2006).

A lesão tende a alcançar grandes dimensões causando morbidades e deformidades estéticas. O AP pode ser acompanhado de uma taxa variável de recorrência tumoral (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, dessa forma, o tratamento de escolha é a ressecção cirúrgica (HAMADA et al, 2004; CARDESA et al, 2006; STRUB et al, 2012),

O carcinoma mucoepidermoide (CME) é o tumor maligno mais comum em glândula salivar, podendo também acometer mama, tireoide e glândulas lacrimais. Ocorre em qualquer faixa etária, com idade média de 45 anos, e tem maior predileção pelo sexo feminino. A glândula parótida é mais afetada (45%), seguida por submandibular (7%) e sublingual (1%). Clinicamente apresenta-se como tumefação não associada à sintomatologia, 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 à lesão vascular. Na região palatina os tumores podem ter formato papilar, por vezes o osso adjacente apresenta aspecto radiográfico de roído de traça (BRANDWEIN et al, 2001; BARNES et al, 2005; CARDESA et al, 2006).

O quadro histopatológico do tumor é caracterizado por células epidermóides, mucosas e células intermediárias. A proporção das células e a arquitetura são variáveis entre tumores e

entre regiões de um mesmo CME. Alguns tumores apresentam limites definidos e por vezes ocorre infiltração no parênquima glandular. O espaço cístico é revestido por células mucosas, intermediárias e em menor grau por células epidermoides poligonais, raramente queratinizadas. As células intermediárias que predominam no interior do carcinoma, são células de citoplasma eosinofílico, ovuladas e/ou células oncocíticas que ocasionalmente são proeminentes. As células mucosas aparecem em menor proporção comparadas a outras células, sendo em geral, grandes, com citoplasma claro e núcleos localizados na periferia. Esclerose focal ou extravasamento de muco com infiltrado inflamatório é comum. Invasão neural, áreas de necrose, aumento da taxa de mitose ou anaplasia são raros. O estroma de tecido conjuntivo fibroso apresenta na periferia infiltrado predominantemente linfocítico com possível centro germinativo mimetizando invasão nodal (BRANDWEIN et al, 2001; BARNES et al, 2005, CARDESA et al, 2006).

Os carcinomas mucoepidermoides são classificados segundo Brandwein et al (2001) em três graus histopatológicos de malignidade (I, II e III), onde os critérios avaliados são proporção do componente cístico, front de invasão, atipia nuclear, número de mitoses, anaplasia, necrose e invasão linfática, vascular e neural. Comumente as lesões de baixo grau exibem espaços císticos proeminentes, com numerosas células mucosas, e atipia celular mínima; as lesões de alto grau apresentam ilhas sólidas, constituídas por células intermediárias e epidermoides, com considerável pleomorfismo celular e numerosas figuras de mitose (BRANDWEIN et al, 2001; CARDESA et al, 2006; SHEMIRANI et al, 2011).

Tumores em glândula parótida podem sofrer metástases para os linfonodos pré-auriculares seguidos dos linfonodos da região submandibular; na glândula submandibular podem se espalhar para linfonodos da região submandibular seguidos dos linfonodos da cadeia jugular superior; os tumores localizados no palato podem se desenvolver em direção ao trato respiratório superior e base de crânio, enquanto que tumores localizados em lábio podem sofrer met para nódulos submentonianos. Além das neoplasias poderem também sofrer metástases para os nódulos acessórios superiores do pescoço, pulmão, fígado, tecido ósseo e cérebro (BARNES et al, 2005; CARDESA et al, 2006).

À medida que o curso clínico e desfecho final de muitos pacientes com tumores de glândulas salivares não podem ser previstos com segurança baseado nas características histopatológicas e clínicas, é de grande valia o uso de marcadores de prognóstico que visem a melhor caracterização do comportamento tumoral, identificação do perfil de pacientes e fisiopatologia da doença (BARNES et al, 2005; BEN-IZHAK et al, 2007).

Nesse contexto, as quimiocinas ou citocinas representam importantes reguladores das interações e adesões celulares. Dentre tais quimiocinas cita-se a *Stromal cell-derived factor-1* (*SDF-1*) ou CXCL12, a qual possui como receptor principal a proteína CXCR4. A ligação da CXCL12 ao seu receptor CXCR4 induz a sinalizações intracelulares através de diversas vias, iniciando a geração de sinais relacionados com diversos eventos da progressão tumoral, como a proliferação, diferenciação, sobrevivência celular, quimiotaxia, metástase e a transcrição gênica (ROSTÈNE et al, 2007; HEMBRUFF et al, 2009; TEICHER et al, 2010).

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 (BRYANT et al, 2015; KUFAREVA et al, 2015). As principais classes de quimiocinas são CC (β), em que os resíduos de cisteína são adjacentes, e CXC (α) quando existe um aminoácido intercalado entre os resíduos de cisteína (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 células da medula óssea, tais como monócitos e células dendríticas. A quimiocina CXC regula o recrutamento de neutrófilos e células T (ROSTÈNE et al, 2007; HEMBRUFF et al, 2009).

A quimiocina CXCL12 é uma proteína de aproximadamente 8 kDa, formada por cerca de 68 aminoácidos, tem como função a quimiotaxia, além de observar papel na regulação do ciclo celular e sobrevivência de células hematopoiéticas (WANG et al, 2006). É constitutivamente expressa em vários órgãos como pulmão, fígado, cérebro, rim, coração, como também na medula óssea, células de músculo esquelético e pele. Além desses tecidos, 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 et al, 2009; TEICHER et al, 2010).

O receptor CXCR4 é um receptor transmembranar acoplado a proteína G, é formado por cerca de 3502 aminoácidos. É um regulador crítico do processo progenitor e mobilização de células-tronco e recrutamento durante o desenvolvimento e hematopoiese (WANG et al, 2006; WEN et al, 2008). De forma semelhante ao CXCL12, o CXCR4 é constitutiva e amplamente expresso em diversas células e tecidos. A maioria das quimiocinas ligam-se a vários receptores, e o mesmo receptor pode ligar-se a mais de uma quimiocina. Por vezes determinados receptores se ligam a quimiocinas específicas, como o CXCL12 que se liga a CXCR4 (BALKWILL et al, 2004; TEICHER et al, 2010).

O CXCL12 une-se ao CXCR4 estimulando modificações no citoesqueleto, polimerização de filamentos de miosina e actina. As fibras de actina se ancoram nas áreas de adesões focais (ligações entre a célula e a matriz extracelular [MEC], formado por quinase de adesão focal (FAK) e vinculina, que 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 et al, 2010; NASSER et al, 2011; KUFAREVA et al, 2015).

As células neoplásicas que expressam CXCR4 funcional apresentam potencial de migrar ou invadir na presença de CXCL12. O CXCL12 tem capacidade de mobilizar e recrutar as células para locais neo-angiogênicos, promovendo a revascularização do tecido isquêmico e o crescimento do tumor (BALKWILL et al, 2004).

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 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).

Partindo da premissa que a CXCL12 e seu receptor CXCR4 tem sido associados à metástases em diferentes neoplasias e que o carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço usualmente metastatiza para linfonodos devido a estimulação da migração das células malignas dessa neoplasia exercida pelo CXCL12, Samara et al (2009) analisaram o potencial do CXCR4 como mediador em processo metastático de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Mediante várias técnicas laboratoriais incluindo imunoistoquímica e cultura de células, os autores observaram a expressão do CXCR4 tanto em linhagens celulares quanto em espécimes teciduais de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, além de células neoplásicas metastáticas de linfonodos e tecidos moles.

Baseados nestes resultados, Samara et al (2009) sugeriram que a interação CXCL12/CXCR4 poderia estimular uma cascata de sinalização que induziria a fosforilação de diversas proteínas, aumentando assim, a adesão de células neoplásicas às proteínas da matriz extracelular e sua migração através da mesma. Além disso, os autores antes citados analisaram a influência da CXCL12 na secreção de MMP-9 pelas células neoplásicas.

Observando que tais células secretam MMP, indicando que a CXCL12 exerce papel na invasão tumoral mediante o estímulo da secreção da MMP-9 facilitando assim o processo de metástase.

As metaloproteinases (MMPs) são endopeptidases dependentes de íons zinco e constituem uma família de enzimas caracterizadas pela sua atividade proteolítica. Atuam degradando macromoléculas da matriz extracelular e das membranas basais tais como o colágeno, elastina, laminina, fibronectina e proteoglicanas, entre outras. Tais enzimas são usualmente no processo de remodelação da MEC, angiogênese e reparo tecidual. (BIRKEDAL-HANSEN et al, 1993, SOUZA et al, 2002, LUUKKAA et al, 2008). As MMPs são produzidas por leucócitos polimorfonucleares, ceratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais, as quais liberam sua produção de MMPs para o meio extracelular mediante a estimulação exercida por fatores de crescimento e citocinas que incluem a interleucina 1 (IL-1), o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) e o fator transformador de crescimento alfa (TGF- α) (BIRKEDAL-HANSEN et al, 1993).

As MMPs classificam-se em: collagenases (MMP-1, 8 e 13); gelatinases (MMP-2 e 9), também conhecidas como collagenases do tipo IV; estromelisinases (MMP-3, 7, 10, 11 e 12), enamelisina (MMP-20), MMPs ligadas à membrana plasmática (MT-MMPs) e outras ainda não tão bem classificadas (POLETTE et al., 2004; VICENTE et al, 2005; LUUKKAA, et al, 2010).

As interações entre as células e a matriz extracelular são rigorosamente controladas em tecidos normais, porém diante da tumorigênese podem ocorrer alterações na regulação das interações celulares. Nesse contexto, relata-se que as células tumorais adquirem a capacidade de modificar sua morfologia e habilidade de mobilidade. Estas propriedades devem-se a alterações na expressão de moléculas de adesão, bem como no aumento dos níveis de expressão de enzimas proteolíticas, incluindo MMPs (BOURBOULIA et al, 2010).

No desenvolvimento de neoplasias, alterações na MEC podem levar à progressão da doença, influenciando o comportamento das células do estroma facilitando a tumorigênese mediante o estímulo de eventos como a angiogênese e inflamação (LU et al, 2012). Nesse contexto, relata-se que as MMPs exercem papéis importantes em várias etapas da neoplasia como crescimento, invasão e metástase, sendo o aumento da expressão dessas proteínas associado a um pior prognóstico, com destaque para as MMP-2 e MMP-9 (HONG et al, 2000).

A gelatinase MMP-9 geralmente é produzida por células epiteliais e eosinófilos, sendo armazenada em grânulos de neutrófilos e eosinófilos (SALO et al, 1991). Em processos

neoplásicos, relata-se que a MMP-9 degrada o colágeno IV da lâmina basal, podendo esse evento, ter relevância na aquisição do fenótipo invasivo das neoplasias malignas, podendo ter ainda ação significativa nos processos de remodelação do colágeno da MEC (KAHARI et al, 1999; KERKELA et al, 2003).

Luukkaa et al (2008) publicaram um estudo imunoistoquímico correlacionando as MMPs-1, 9 e 13 como fatores de prognóstico em neoplasias malignas de glândulas salivares, constatando que tais proteínas contribuem na progressão e invasão desses tumores malignos por meio da clivagem da membrana basal. Em relação à MMP-9 os autores observaram que a imunoeexpressão aumentada dessa proteína em carcinoma adenoide cístico e carcinoma do ducto salivar estava associada a uma pobre taxa de sobrevida.

Zhang et al (2009) analisaram a expressão de MMP-2, MMP-9 e seus inibidores TIMP-1 e TIMP-2 em epitélio e estroma de APs, verificando que a expressão do RNAm dessas proteínas foi significativamente maior no estroma do que nas células epiteliais na maioria dos casos. Por outro lado, através da imunoistoquímica os autores observaram que a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 teve distribuição similar no epitélio e no estroma, com maior expressão citoplasmática dessas proteínas em estruturas ductiformes, lençóis sólidos, pequenos ninhos e áreas de metaplasia escamosa. Em relação à MMP-9 nas estruturas ductiformes, os autores observaram fraca imunoeexpressão na membrana das células luminais e forte expressão na membrana de células basais, enquanto que a imunopositividade das células mioepiteliais localizadas em meio ao estroma foi menor do que nas estruturas citadas anteriormente. Segundo os autores, os resultados sugerem que o mioepitélio exerce um papel importante como fonte de MMPs e que o estroma tem potencial para desempenhar um papel mais importante do que o epitélio ductal no comportamento biológico APs.

Relata-se, ainda, que a expressão da via CXCL12/CXCR4 está envolvida no aumento da sobrevida de células neoplásicas, através da superexpressão da proteína *bcl-2* (SHEN et al, 2013). A família de genes Bcl-2, constitui um amplo grupo de genes envolvidos na promoção da apoptose como os genes *Bax*, *Bak*, *Bok*, *dva*, *Bcl-x_s*, *Bik*, *Bim*, *Hrk*, *Nip3*, *Nix*, *Bad* e *Bid*; outro grupo que inibem a apoptose como o *Bcl-2*, *BCI-x_L*, *Bcl-w*, *Mcl-1*, *Nr13* e *A1/Bfl-1* (SAIKUMAR et al, 1999). Relata-se que os membros desta família de genes possuem domínios conservados denominados “domínios homólogos *bcl-2* (BH)”, os quais participam da formação de dímeros e na regulação da morte celular (YIN et al, 1994).

O gene *bcl-2*, codifica uma proteína de 25 kD no cromossomo 18q21. Foi originalmente descrito como um proto-oncogene em linfomas de células B com translocação cromossomal t(14;18) (q32;q21). A proteína Bcl-2 é localizada na membrana mitocondrial, no

envoltório nuclear, no retículo endoplasmático e na membrana citoplasmática. Esta proteína exerce uma função importante no controle da apoptose. Sua ligação com a proteína pro-apoptótica Bax promove a inativação da função anti-apoptótica da Bcl-2, determinando o momento em que a célula deve proliferar ou morrer, podendo ter um papel importante na promoção do desenvolvimento tumoral (SAIKUMAR, 1999; TENI et al, 2002).

A desregulação nos mecanismos e do índice de proliferação e apoptose celulares constituem fatores decisivos na tumorigênese benigna e maligna. Nesse sentido, diversos estudos relatam expressão e conseqüentemente, funções distintas para membros da família da *bcl-2*, atuando ora como anti-apoptótica, ora como pro-apoptótica em vários tipos de tecidos (JORDAN et al, 1996; SINGH et al, 1998; SINGH et al, 1999).

Para entender o papel anti-apoptótico da Bcl-2 é importante salientar que este processo de morte celular programada guarda relação com a liberação do citocromo C mitocondrial, o qual pode ativar a via apoptótica através da sua ligação ATP-dependente a proteases apoptóticas ativando o fator 1, sendo assim, a ação anti-apoptótica da *bcl-2* está associada à sua capacidade de inibir a liberação do citocromo C da mitocôndria através de canais mitocondriais específicos (YANG et al, 1997; LI et al, 1997).

A Bcl-2 é topograficamente restrita a células de zonas proliferativas teciduais e de células com longo tempo de vida, exibindo reduzida ou ausência da expressão em células terminalmente diferenciadas (JORDAN et al, 1996; QI-LUNG et al, 1996).

Atarbashi et al (2014) realizaram uma pesquisa objetivando avaliar comparativamente expressão imunoistoquímica da proteína *bcl-2* em 18 APs e 10 CMEs, com o intuito de determinar se tal proteína possuía potencial de diagnóstico na diferenciação desses tumores, puderam observar que a *bcl-2* foi expressa em 71% dos APs e em 30% dos CMEs, sem diferença significativa na intensidade de expressão dessa proteína entre os tumores, e nenhuma correlação entre a expressão da *bcl-2* com o tamanho e localização dos tumores. Baseados nos resultados os autores concluíram que a expressão da *bcl-2* poderia ser utilizada na diferenciação dos tumores avaliados, uma vez que tal proteína teve expressão aumentada nos APs quando comparados aos CMEs, sugerindo que provavelmente a proteína não participa da patogênese desta.

Gordón-Nuñez et al (2008) pesquisaram amostra de 19 APs visando relacionar a expressão imunoistoquímica de PCNA, p53 e *bcl-2* com a proliferação celular e possível potencial maligno do tumor. Pode-se observar que a proteína *bcl-2* exibiu marcação negativa em 12 casos (63,1%). Os autores sugeriram que a proteína *bcl-2* não está envolvida na

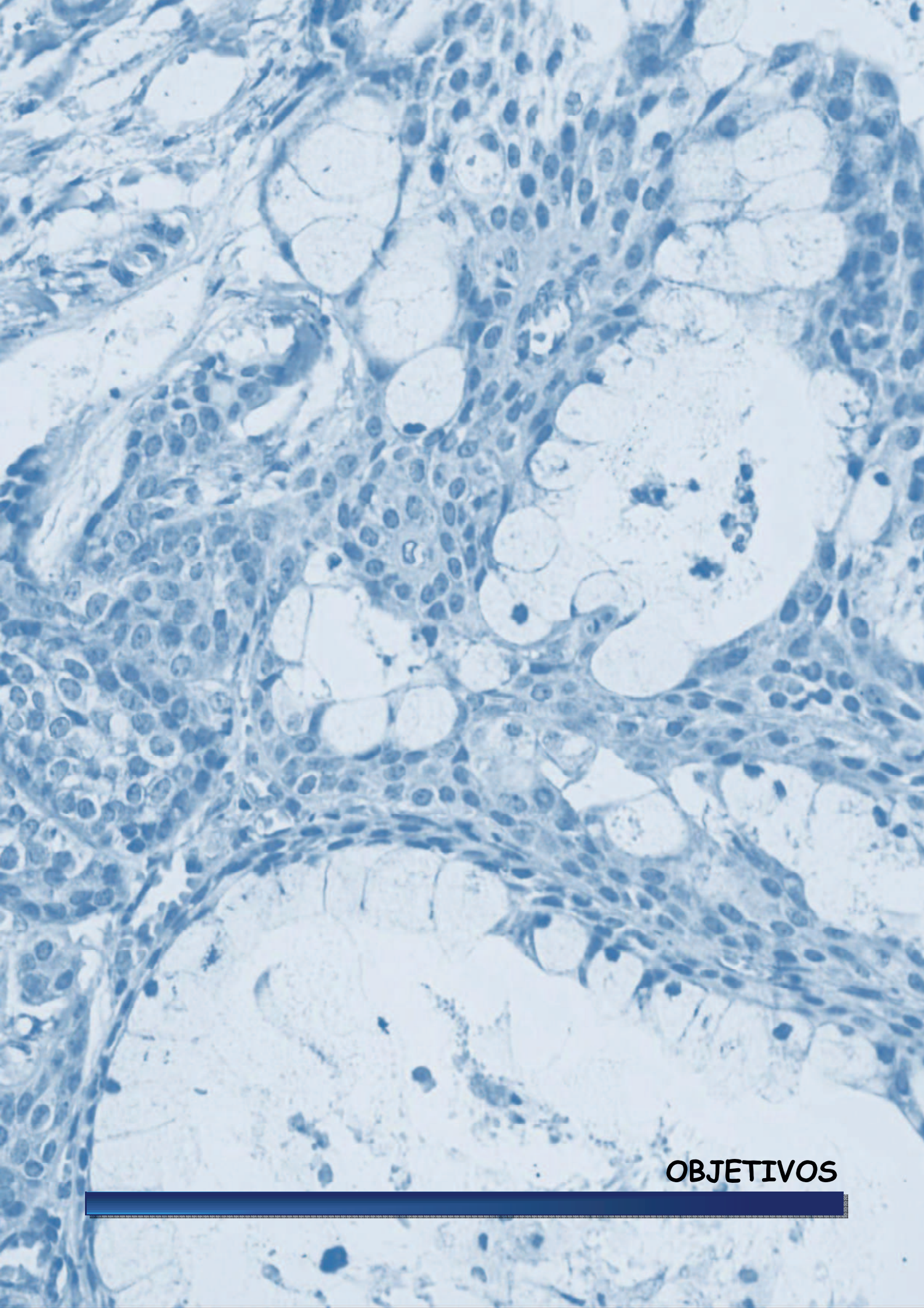
tumorigênese dos APs, e que a recorrência pode estar relacionada à remoção incompleta da lesão.

Ferreira et al (2014) pesquisaram o potencial neoplásico de AP através da da marcação imunoistoquímica de *bcl-2*, Bax, p53 e Ki-67. Onde o índice de apoptose foi mensurado pela marcação da *bcl-2*, Bax e p53, atividade secretora de muco pela MUC-1, e proliferação celular pela Ki-67. Em uma amostra de 31 casos de APs de glândulas salivares menores submetidos à biopsia excisional, e tecido de quatro glândulas salivares menores normais como grupo controle, os autores puderam observar que a amostra apresentou alta expressividade de *bcl-2*, sendo mais forte a marcação no citoplasma de células epiteliais e células ductais.

Os autores ainda puderam ver que a marcação de *bcl-2* em AP variou de moderada a forte em 28 dos 31 casos, com média de 55,3. Sendo a marcação de *bcl-2* predominante no citoplasma de células ductais e algumas células mioepiteliais. De acordo com os resultados, Ferreira et al (2014) sugeriram que a existência de um desequilíbrio no sistema de controle da apoptose em AP, gera o prolongamento da vida celular e imortalidade celular, acúmulo de mutação genética e desenvolvimento tumoral.

Manjunatha, Kumar e Vandana Raghunath (2011) realizaram um estudo para avaliar e comparar a expressão imunoistoquímica da proteína *bcl-2* em 50 tumores benignos e malignos de glândulas salivares, sendo 9 APs, 3 mioepiteliomas, 2 adenomas canaliculares, 21 carcinomas adenóides císticos, 11 CMEs e 4 adenocarcinomas. Os autores observaram que 72% da amostra imunoexpressou a *bcl-2*, distribuída essa marcação em 57% (8 de 14) de tumores benignos, exceto nos adenomas canaliculares e em 78% (36) dos malignos, porém sem diferença estatisticamente significativa na expressão da *bcl-2* entre as neoplasias benignas e malignas. Nos CME muitas células mucosas foram negativas, enquanto que as células epidermoides e intermediárias foram usualmente positivas. Baseados nos resultados obtidos os autores concluíram que a maior e mais intensa expressão imunoistoquímica da *bcl-2* em neoplasias malignas de glândulas salivares, sugere uma elevada taxa de sobrevivência de células tumorais nessas lesões.

Tendo em vista a escassez de informações na literatura analisando a expressão e influência de CXCL12 sobre MMP-9, *bcl-2* e o comportamento biológico em neoplasias glandulares salivares, justifica-se a realização de uma pesquisa correlacionando as características clínicas, histomorfológicas e imunoistoquímica de uma série de APs e CMEs, no intuito de obter maiores informações que contribuam ao conhecimento do seu papel no comportamento biológico e prognóstico de tais neoplasias.



OBJETIVOS

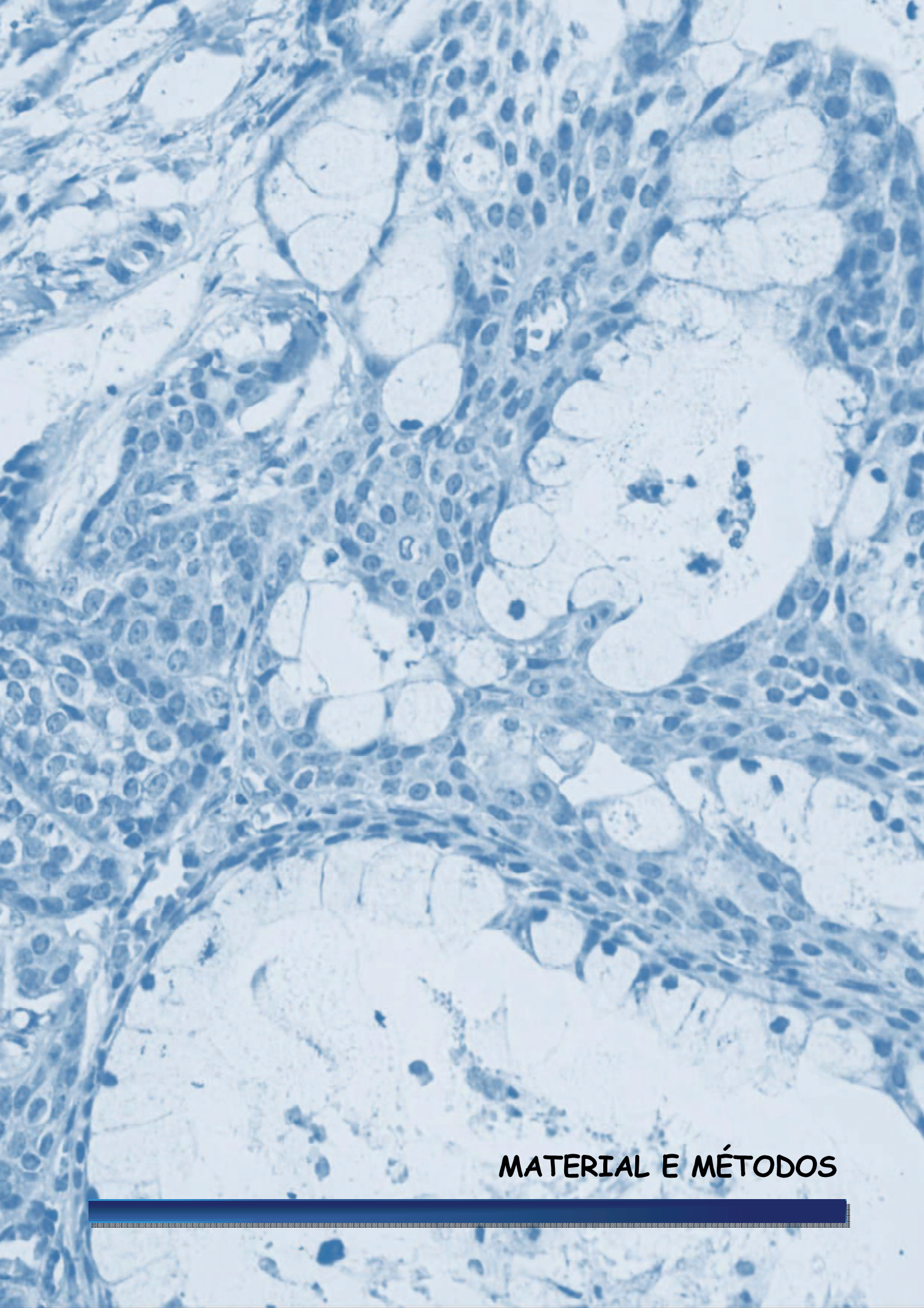
2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Este estudo se propôs a realizar uma análise clínica e histopatológica de APs e CMEs e através da imunoistoquímica analisar a expressão da CXCL12, MMP-9 e Bcl-2 nas lesões citadas. Além de observar se exist alterações quali-quantitativas na expressão dessas proteínas e relação com aspectos do comportamento biológico, como taxa de apoptose e invasão tumoral nas malignas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar o perfil clínico e histopatológico de uma amostra de AP e CME.
- Analisar se existe diferença da expressão imunoistoquímica de CXCL12, MMP-9 e Bcl-2 em relação ao tipo de neoplasia de glândula salivar.
- Analisar se existe diferença entre as características histomorfológicas da amostra avaliada e a expressão imunoistoquímica das proteínas.
- Determinar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica das proteínas e o grau histológico de malignidade do CME.
- Analisar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica da CXCL12 com expressão da MMP-9 e Bcl-2 considerando a natureza benigna ou maligna da amostra avaliada.



MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O presente estudo foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisa envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetido à análise de seu conteúdo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) conforme anexo A, seu protocolo foi aprovado sob número do parecer 1.435.401.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

. Este estudo foi de caráter descritivo probabilístico correlacional entre as características clínico-histomorfológicas de uma série de Adenomas pleomórficos e Carcinomas Mucoepidermóides, e a análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão imunoistoquímica das proteínas CXCL12, MMP-9 e Bcl-2, no intuito de obter maiores informações que contribuam ao conhecimento do papel de tais proteínas em relação ao comportamento biológico das neoplasias acima citadas.

3.3 POPULAÇÃO

Foram selecionados casos de AP e CME do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa-PB; do Arquivo de Patologia 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.

3.4 AMOSTRA

A amostra foi de conveniência, sendo selecionados blocos provenientes de biópsia excisional, que apresentavam material suficiente para análise e com diagnóstico histológico compatível com o estudo, sendo a amostra contida de 30 APs e 30 CMEs.

3.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

3.5.1 Critérios de inclusão

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

3.5.2 Critérios de exclusão

- Foram excluídos os espécimes cujas fichas não estivessem devidamente completas no referente aos dados clínicos dos pacientes.

3.6 COLETA DE DADOS EPIDEMIOLOGICOS

Os dados clínicos coletados das fichas de biópsia constaram de gênero, idade, localização, bem como presença de metástase em nodo, metástase à distância e estágio clínico (TNM) de acordo com os parâmetros elencados na sétima edição da Classificação TNM dos tumores malignos (SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTERKIND, 2009).

3.7 ESTUDO HISTOMORFOLÓGICO

Todos os espécimes foram fixados em formol a 10% e embebido em parafina. Para análise microscópica foram analisados cortes de 5µm corados em hematoxilina e eosina, e reavaliados por dois pesquisadores 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) onde foi avaliada a quantidade de componente cístico, frente 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, O grau I apresenta valor 0, grau II varia de 2 a 3 pontos, e Grau III equivale a quatro ou mais pontos.

3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.8.1 Método imunoistoquímico

Dos espécimes selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina forão obtidos cortes de 3 μ m de espessura que serão estendidos em lâminas de vidro previamente preparadas com organosilano (*3-aminopropyltrithoxy-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA*). Para os anticorpos monoclonais e policronais anti-CXCL12, anti-MMP-9 e anti-bcl-2, 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 positivo para a CXCL12 cortes de Carcinoma de células escamosa. Para a MMP-9 o controle positivo foi granuloma periapical e o controle positivo para o bcl-2 foi tecido de linfonodos. O 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 baseado em polímeros de dextrano foi realizada conforme os passos que se seguem:

- Desparaфинização 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 descendente 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* (Novolink, 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 *Permout* (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.7.2 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

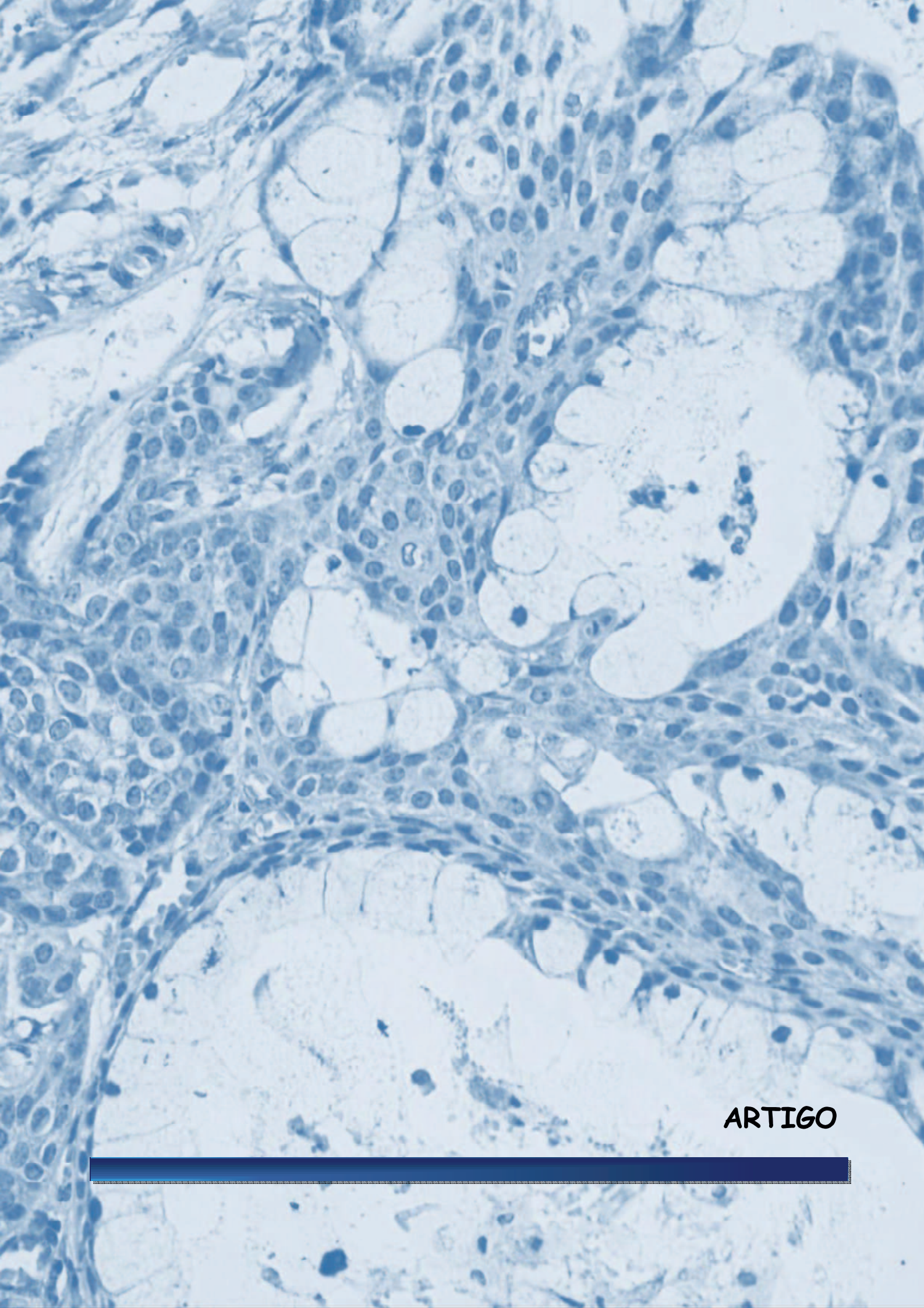
O número de células positivas e negativas foi determinado em cada campo microscópico por meio do programa *ImageJ®* (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), permitindo o posterior cálculo do percentual (Índice de Positividade) de células 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/ou nuclear, para o bcl-2 marcação citoplasmática e/ou nuclear e, para o MMP-9 marcação citoplasmática.

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

3.9 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 imunoexpressões do Bcl-2 e do CXCL-12 foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças nas medianas dos percentuais de positividade para essas proteínas, entre adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermóides, foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. De maneira similar, as comparações das medianas dos percentuais de positividade para Bcl-2 e CXCL-12 em relação aos parâmetros clínico-morfológicos (tipo de glândula salivar, estágio clínico, subtipo histopatológico dos adenomas pleomórficos e grau histopatológico de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides) foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. Possíveis correlações entre as imunoexpressões de Bcl-2 e CXCL-12 foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. Em virtude do pequeno número de casos imunopositivos para MMP-9, os dados obtidos com esta avaliação foram submetidos apenas à análise estatística descritiva. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).



ARTIGO



4.1 APRESENTAÇÃO

O projeto de pesquisa ora desenvolvido foi apresentado e aprovado em qualificação pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da execução desse projeto, um artigo será apresentado nessa dissertação sob o título de “Imunoexpressão de CXL12, Bcl-2 e MMP-9 em Adenoma pleomórfico e Carcinoma mucoepidermoide”.

O referido artigo será submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology and Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de impacto: 1.926, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

Imunoexpressão de CXL12, Bcl-2 e MMP-9 em Adenoma pleomórfico e Carcinoma mucoepidermoide

AUTORES:

José Matheus Alves dos Santos¹, Aline Carvalho Batista², Elismauro Francisco Mendonça², Cassiano Francisco Weege Nonaka¹, Maria Cássia Ferreira Aguiar³, Pollianna Muniz Alves¹, Manuel Antonio Gordón-Núñez¹

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-Núñez

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

RESUMO

Introdução: As citocinas pró-inflamatórias ou quimiocinas são importantes reguladores das interações e adesões celulares. A quimiocina CXCL12 (*C-X-C motif chemokine ligand 1*) liga-se principalmente ao receptor CXCR4, regulando sinalizações intracelulares, através de várias vias, relacionadas a eventos importantes na tumorigênese como a quimiotaxia, proliferação e sobrevivência celular, angiogênese, invasão e metástase. Este estudo objetivou pesquisar a relação da expressão da CXCL12 com Bcl-2 e MMP-9 em neoplasias de glândulas salivares. **Métodos:** Em 30 adenomas pleomórficos (AP) e 30 carcinomas mucoepidermóides (CME) foram coletados dados clínico-patológicos os quais foram analisados em relação à expressão imunistoquímica, por meio do método estreptavidina-biotina peroxidase, dos anticorpos CXCL12, Bcl-2 e MMP-9. **Resultados:** observou-se maior expressão da CXCL12 no CME do que no AP ($p = 0,001$), enquanto que em AP houve maior expressão de Bcl-2 ($p=0,031$). A MMP-9 foi negativa na maioria dos casos da amostra. **Conclusão:** Conclui-se que a expressão da CXCL12 não parece estar associada com a Bcl-2 e MMP-9. A quimioquina pode ser relacionada com a patogênese de carcinomas mucoepidermóides, ao passo que a proteína Bcl-2 pode ser relacionada com a patogênese de adenomas pleomórficos. A MMP-9 não parece exercer um papel na patogenia da amostra avaliada.

Keywords: CXCL12, gene bcl-2, MMP-9, adenoma pleomórfico, carcinoma mucoepidermoide

INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares têm patogênese incerta, porém acredita-se que fatores como radiação ionizante, vírus, radiação ultravioleta, álcool e tabaco tenham algum papel na sua etiologia. Tumores de glândulas salivares são lesões raras, representando menos de 5% dos tumores da região de cabeça e pescoço. Dentre as mais comuns pode-se observar o Adenoma Pleomórfico (AP) e Carcinoma Mucoepidermoide (CME) ^{1,2,3}.

O Adenoma pleomórfico é composto por uma variedade de células epiteliais e células mioepiteliais entremeadas com o estroma de natureza variável. Possui crescimento lento, assintomático e acomete principalmente a glândula parótida. Além de apresentar uma taxa variável de recorrência⁴. O carcinoma mucoepidermoide é caracterizado pela presença de células epidermóides, intermediárias e mucosas. Acomete em geral a glândula parótida, o comportamento biológico é variável, e este está relacionado à gradação morfológica, tendo como consequência a variação do tratamento e prognóstico⁵. À medida que o curso clínico e desfecho final de muitos pacientes acometidos por neoplasia de glândula salivar não podem ser previstos com segurança baseado nas características histopatológicas e clínicas, é de grande valia o uso de marcadores de prognóstico que visem a melhor caracterização do comportamento tumoral, identificação do perfil de pacientes e fisiopatologia da doença ^{6,7}.

Nesse contexto, as quimiocinas ou citocinas pró-inflamatórias quimioatrativas representam importantes reguladores das interações e adesões celulares. Dentre tais quimiocinas cita-se a *Stromal cell-derived factor-1 (SDF-1)* ou CXCL12, a qual possui como receptor principal a proteína CXCR4^{8,9,10,11}. O CXCL12 liga-se ao seu receptor transmembranar CXCR4, este é acoplado a uma proteína G participando de uma intrincada cadeia de proteínas sinalizadoras e pode promover eventos celulares como a alterações na morfologia celular, respostas quimiotáticas, a reorganização do citoesqueleto, migração celular e regulação da sobrevivência celular¹¹.

Relata-se que, em alguns tipos de neoplasias, a expressão do CXCL12/CXCR4 está envolvida no aumento da sobrevivência celular neoplásica através da promoção da superexpressão de proteínas anti-apoptóticas. Além disso, sua expressão tem sido associada a invasão tumoral através da ativação e expressão da MMP-9¹².

Nesse contexto, é provável que tais proteínas possam desempenhar papel na progressão de neoplasias de glândula salivar, portanto, considerando que não existem informações na literatura analisando a expressão de CXCL12, Bcl-2 e MMP-9 em neoplasia de glândula salivar, justificou-se a realização deste estudo de caráter descritivo probabilístico

correlacional entre as características clinico-histomorfológicas de uma série de adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermóides e a expressão imunoistoquímica dessas proteínas, no intuito de obter informações a respeito dos mecanismos relacionados ao comportamento biológico de tais neoplasias.

MATERIAIS E MÉTODOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba sob o parecer de número 1.435.401.

Foram selecionados casos de AP e CME do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa-PB; do Arquivo de Patologia 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, sendo selecionados blocos provenientes de biópsia excisional, que apresentavam material suficiente para análise e com diagnóstico histológico compatível com o estudo. Os dados clínicos coletados das fichas de biópsia constaram de gênero, idade, localização, bem como estágio clínico (TNM).

Todos os espécimes foram fixados em formol a 10% e embebido em parafina. Para análise microscópica foram analisados cortes de 5µm corados em hematoxilina e eosina, e reavaliados por dois pesquisadores quanto ao diagnóstico histológico. A análise morfológica dos APs foi realizada de acordo com os critérios de Seifert et al¹³: em 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 de acordo com Miranda Viana et al¹⁴, sendo o grupo A composto pelos tipos I e II e o grupo B composto pelos tipos III e IV. Os casos de CME foram classificados histomorfologicamente de acordo com Brandwein et al⁵ onde foi avaliado o componente cístico, frente 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, O grau I apresenta valor 0, grau II varia de 2 a 3 pontos, e Grau III equivale a quatro ou mais pontos.

Os espécimes incluídos em parafinas foram cortados a 3µm de espessura e coletados por lâminas de vidro revestidas por organosilano 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. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pelo peróxido de hidrogênio a 3% (NovolinkTM, Novocastra) por 5 minutos. Seguiu-se a incubação sem 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. Após a lavagem em TBS os anticorpos primários SDF-1 (FL-93, 1:150, Santa Cruz Biotchenology), MMP-9 (EP1254, 1:1000, Abcam) e Bcl-2 (124,1:100, Dako) foram incubados 4°C em câmara úmida overnight. Seguiu-se a lavagem em TBS, e todos os casos foram submetidos à técnica imunoistoquímica da imunoperoxidase baseada em polímeros de dextrano (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) e seguiu-se a desidratação, diafanização e montagem. Os controles negativos foram obtidos por meio da omissão do anticorpo primário, com substituição por 1% PBS-BSA. Cortes de linfonodos representaram o controle positivo para SDF-1 e Bcl-2 e, granulomas periapicais para MMP-9.

A análise imunoistoquímica foi realizada por um examinador previamente treinado. Os cortes histológicos foram examinados por microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems VertriebGmbH, Wetzlar, DE) sob aumento de 200x para identificação de 10 campos de maior celularidade, as áreas foram fotomicrografadas (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb Gmb H) 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 Bcl-2 marcação citoplasmática e/ou nuclear e, para o MMP-9 marcação citoplasmática.

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 imunoexpressões da CXCL-12 e da Bcl-2 foram submetidos ao teste de Kolmogorov-Smirnov, o qual revelou ausência de distribuição normal. Dessa forma, possíveis diferenças nas medianas dos percentuais de positividade para essas proteínas, entre adenomas pleomórficos e carcinomas mucoepidermóides, foram avaliadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney. De maneira similar, as comparações das medianas dos percentuais de positividade para CXCL-12 e Bcl-2 em relação aos parâmetros clínico-morfológicos (tipo de glândula salivar, estágio clínico, subtipo histopatológico dos adenomas pleomórficos e grau histopatológico de malignidade dos carcinomas mucoepidermóides) foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

Possíveis correlações entre as imunoexpressões de CXCL-12 e Bcl-2 foram avaliadas pelo teste de correlação de Spearman. Em virtude do pequeno número de casos imunopositivos para MMP-9, os dados obtidos com esta avaliação foram submetidos apenas à análise estatística descritiva. Para todos os testes, foi considerado o nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

RESULTADOS

A amostra consistiu de 30 AP e 30 CME provenientes de excisão cirúrgica, possibilitando analisar o espécime por inteiro, inclusive o fronte de invasão. Quanto ao sexo, pode-se observar que houve predomínio do sexo feminino para as duas lesões, 22 no (73,3%) AP e 17 (56,7%) no CME. A idade média foi 45,67 (DP = 19,057) e 54,3 (DP = 21,717) anos para os APs e CMEs, consecutivamente. O local mais acometido pelas duas lesões foi a região de palato 13 (43,3%) e 14 (46,7%), seguida pela glândula parótida 11 (36,7%) e 9 (30%) no AP e CME, respectivamente, pode-se observar as demais regiões acometidas na tabela de número 1 e 2.

Em relação à classificação de Seifert et al¹³ e dicotomização de Miranda Viana et al¹⁴ nota-se o predomínio dos casos classificados no grupo A 19 casos (63,3%), seguido por 11 (36,7%) casos no grupo B. Em relação a classificação de Brandwein et al⁵ para CMEs observou-se o predomínio de grau III, 13 (43,3%), seguido pelos de grau II, 9 (30%) e grau I 8 (26,7%). Em relação ao T (tamanho do tumor), o mais comum foi o T2, seguido pelo T1, T3 e T4, com 14 (46,7%), 8 (26,7%), 5 (16,7%) e 3 (10%) casos, respectivamente. Quanto ao N

(nodo linfonodais palpáveis) 24 (88,9%) mostraram-se negativos e 3 (11,1%) apresentaram metástase linfonodal ipsilateral até 3cm. A metástase à distância esteve presente em apenas um caso (3,7%), enquanto 26 (96,3%) estavam livres. Em relação ao estágio clínico (TNM), o estágio II foi o mais comum com 10 (37%) casos, seguido por 8 (29,6%) no estágio I, 5 (19,5%) estágio III e 4 (14,8%) no estágio IV; e em 3 pacientes não foi possível obter os dados.

Na análise imunoistoquímica dos APs, observou-se 29 casos positivos para CXCL12, 30 para Bcl-2 e 3 para MMP-9. Em geral, com moderada imunoexpressão citoplasmática/nuclear, difusamente distribuída nas células das estruturas ductiformes, cordões/ilha e lençóis/sólido para CXCL12 e Bcl-2 (figuras 1A e 1C) e moderada imunoexpressão citoplasmática, predominantemente focal em células luminais de estruturas ductiformes para a MMP-9 (Figura 2B), além de o infiltrado inflamatório exibir imunoexpressão (Figura 2C). A mediana dos casos positivos foi de 81.80 (23.3 – 95.9), 91.20 (86.88 – 91.2) para CXCL12 e Bcl-2, respectivamente, e média de 46.3 (38 – 54) para MMP-9. Nos APs houve maior expressão de CXCL12 nas glândulas salivares maiores 96.1 (0 – 99.6) em relação às menores 90.2 (28.7 – 99.3). Em relação ao morfológico há um discreto aumento da expressão de CXCL12 no grupo A 92.3 (0 – 99.6) comparado ao B 90.6 (49.9 – 99.3). Pode-se observar expressão da Bcl-2 foi semelhante em glândulas salivares maiores e menores, 82.2 (42.7 – 94.7), 81.50 (23.3 – 95.9), respectivamente. A expressão mostra-se análoga entre os tipos morfológicos A 81.5 (23.3 – 95.5) e B 82.1 (62.6 – 94.7). Em relação à expressão da MMP-9, nota-se que apenas três foram positivos, sendo um em glândula salivar maior, classificado morfológicamente no grupo A, e dois em glândulas salivares menores classificados no grupo B.

Os CMEs mostraram-se, em sua totalidade, positivos para o CXCL12 e Bcl-2 (figuras 1B e 1D), com moderada imunoexpressão citoplasmática/nuclear, difusamente distribuída, predominantemente nas células epiteliais e intermediárias do que nas células mucosas e apenas 8 casos expressaram MMP-9 (figura 2D), cuja marcação foi citoplasmática, predominantemente em células epiteliais luminais de estruturas ductiformes, esporádicas células claras e nas células do infiltrado inflamatório (figura 2C). A mediana do índice de positividade entre os marcadores também variou 97,25 (80,9 – 100), 66,15 (12,4 – 99,4) para CXCL12 e Bcl-2, respectivamente, e a média da MMP-9 foi de 39,62 (23 – 63).

Nos CMEs não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão de CXCL12 em glândulas salivares maiores e menores 96.9 (80.9 – 98.9) e 97.4 (87 – 100). Quanto ao grau de malignidade vê-se um valor ligeiramente mais alto para os graus I e II 97.7

(92.4 – 99.6) comparado ao grau III 95.4 (80.9 – 100). De forma idêntica há um discreto aumento de expressão nos estágios I e II 97.25 (80.9 – 100) comparado ao estágio III e IV 95.4 (88.8 – 99.1).

Para a Bcl-2 observou-se um aumento da expressão nos casos de glândula salivar menor 68 (12.4 – 99.4), comparado a glândula maior 56.8 (32.8 – 79.3). Quando se observa o grau de malignidade em função da marcação, nota-se um valor superior nos casos de Grau I e II 68 (32.8 – 99.4) em relação ao grau III 60.8 (12.4 – 83.7). Em relação ao estágio clínico não houve diferenças significativas para Bcl-2 nos estágios I e II 67.35 (12.4 – 99.4) e estágio III e IV 65.6 (40.2 – 79.3).

No tocante à expressão da MMP-9 verificou-se que a imunoexpressão ocorreu em 4 CMEs de glândulas salivares maiores e 4 de menores. Quanto ao grau de malignidade, 5 casos foram classificados com o grau II, 2 casos como III e 1 caso como I. Em função do estágio clínico observou-se que os CMEs positivos (7 casos) foram classificados em estágio I e II, enquanto apenas um caso com estágio III e IV. Os dados referentes à imunoexpressão da CXCL12 e Bcl-2 encontram-se dispostos na tabela 3 e, MMP-9 na tabela 4.

A análise da correlação entre a expressão de CXCL12 e os tipos de neoplasia por meio do teste de Sperman mostrou uma associação significativa ($p=0,001$). Também foi observada entre a expressão de Bcl-2 e APs e CMEs ($p=0,031$), conforme dispostos na tabela 5. Não houve associação estatisticamente significativa da CXCL12 e Bcl-2 com relação aos parâmetros clínicos e morfológicos. Diante do número limitado de casos positivos para MMP-9 apenas foi possível fazer análise descritiva.

DISCUSSÃO

As neoplasias de glândulas salivares apresentam grande diversidade morfológica que muitas vezes tornam difícil o estabelecimento do diagnóstico e predição do comportamento biológico¹⁵. O adenoma pleomórfico é a neoplasia benigna mais comum, com predileção pela parótida. É marcada pelo crescimento lento e assintomático, por vezes alcançando grandes proporções. O carcinoma mucoepidermoide representa a neoplasia maligna mais comum, a maioria dos casos acomete a parótida, seguido do palato. Em geral possui comportamento biológico variável e quadro histopatológico diverso⁷. Dessa forma, reveste-se de importância o uso de biomarcadores que possam ser usados no diagnóstico, prognóstico e possível planejamento terapêutico²⁴.

No presente estudo os APs e CMEs acometeram em geral pacientes do sexo feminino. O AP ocorreu em faixa etária menor, comparado ao CME⁷. No que se refere à localização, os achados dessa pesquisa mostram que o local mais acometido foi a região de palato, semelhante aos estudos de Ferreira et al¹⁶, Miranda Viana et al¹⁴ e Bernardes et al¹⁷, entretanto, diferente de das Neves et al¹⁸ que encontrou a glândula parótida como localização de maior predileção. Em concordância com a literatura clássica, os APs exibiram o arranjo clássico como predominantes na amostra^{18,19}. Em relação ao histopatológico dos CMEs, nesse estudo observa-se que houve predomínio dos casos de maior grau de malignidade, porém sem diferenças significativas entre as demais gradações. Enquanto que Bernardes et al¹⁷ teve em sua maioria tumores de baixo grau de malignidade.

No presente estudo observou-se a expressão da CXCL12 em células de AP e CME de glândulas salivares. A quimiocina alvo tem sido estudada em diversas neoplasias como mama, ovários e coloretal, porém poucos estudos têm avaliado seu papel nas neoplasias de glândula salivar, e nenhum analisando a relação da quimiocina sobre a sobrevivência celular e capacidade de degradação de matriz extracelular^{20,21}.

A ligação da CXCL12 ao seu receptor CXCR4 induz o aumento de cálcio intracelular, iniciando a geração de sinais relacionados com diversos eventos da progressão tumoral, como proliferação, diferenciação, sobrevivência celular, quimiotaxia, metástase e a transcrição gênica^{8,9,10,11}. Nesse sentido este estudo buscou analisar e correlacionar a expressão de CXCL12, Bcl-2 e MMP-9 sobre o comportamento biológico de duas neoplasias de comportamento biológicos distintos.

Analisando a expressão de CXCL12 em APs nota-se que a maioria da amostra exibiu alta expressão da proteína. Sendo os tipos morfológicos clássico/estromal os que apresentaram maior índice de imunoexpressão. Seifert et al¹⁸ sugerem que APs com maior quantidade de estroma são associados a maior risco de recorrência, já que podem apresentar ilhas e cordões epiteliais que invadem áreas em que a cápsula esteja descontínua. Nesse contexto, sugere-se que CXCL12, por possuir capacidade quimiotática, poderia exercer atração dessas células em direção às áreas externas da cápsula²⁰.

Em relação aos CMEs observou-se que os 30 casos apresentam alta imunoexpressão da CXCL12. Neoplasias de menor grau de malignidade e melhor estágio clínico apresentaram discreto aumento do percentual de positividade. Os casos que apresentaram pior estágio clínico, incluindo presença de metástase, não exibiram diferença da expressão em relação aos demais casos. Resultados condizentes com os obtidos por Wen et al²¹, por meio de cultura de duas linhagens celulares de carcinoma mucoepidermoide, encontraram níveis aproximados de

expressão de CXCL12. Além disso, verificaram que o receptor CXCR4 exibiu expressão significativamente maior nas células mestáticas. Dessa forma, os autores sugeriram que o pior comportamento biológico estaria relacionado com ativação da via CXCL12/CXCR4.

No presente estudo a ocorrência de correlação entre a expressão de CXCL12 nas duas neoplasias analisadas leva a concordar com Hernández-López et al²², inferindo que possivelmente essa proteína estaria exercendo algum papel fundamental no desenvolvimento desses tumores, regulando eventos celulares importantes para a sua patogenia e comportamento biológico. Provavelmente no AP essa quimiocina estaria envolvida nos mecanismos de relacionados à manutenção de uma população celular que garanta o crescimento tumoral, enquanto que no CME poderia estar envolvido em alguma via de sinalização que permita a proliferação e aumento da sobrevida celular, favorecendo a progressão tumoral. O aumento da sobrevida celular está ligado à inibição da apoptose, considerado importante para o processo de tumorigênese e a recente caracterização de numerosas proteínas reguladoras desse evento celular esta fornecendo subsídios para a identificação de potenciais alvos de terapias moleculares contra o câncer. Dentre as proteínas envolvidas no processo de apoptose, destaca-se a Bax com ação pró-apoptótica e a Bcl-2 caracterizada pela ação supressora da morte celular^{23, 24, 25}.

Os APs apresentaram alta expressão de Bcl-2, corroborando com os achados do estudo de Miranda Viana et al¹⁴ que ao analisar a apoptose em 35 APs por meio da expressão de Bcl-2, verificaram que 77,1% da amostra apresentou imunoexpressão. Além disso, em ambos os estudos a maioria dos casos imunopositivos eram dos tipos morfológicos clássico e estromal, inclusive sem associação significativa entre tais variáveis, podendo-se sugerir que a Bcl-2 poderia estar exercendo algum papel no controle da taxa de sobrevida celular, mediante a inibição da apoptose, permitindo a manutenção da população celular responsável pela integridade estrutural do tumor.

Além do antes citado, o estudo de Ferreira et al¹⁶ ao avaliar diversas proteínas numa amostra de APs, incluindo a Bcl-2, observaram um índice de positividade variando de moderado à alto em 28 dos 31 APs. Ainda foi analisada a relação da expressão de Bcl-2/Bax como parâmetro da atividade apoptótica, verificando alta expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica) em relação à expressão de Bax (apoptótica), concluindo que as mesmas poderiam estar envolvidas numa desregulação na atividade apoptótica na patogenia desse tipo de neoplasia, através do aumento da sobrevida celular e provavelmente, pelo acúmulo de alterações genéticas que promoveriam a perpetuação celular e consequentemente, o desenvolvimento tumoral. Essa pesquisa não avaliou a Bax, no entanto, baseado nos resultados obtidos pode-se

sugerir que a Bcl-2 pode exercer papel preponderantemente anti-apoptótico nas células dos APs aqui avaliados, esta hipótese também é sustentada pelos resultados do estudo de Manjunatha et al²⁶.

Em contrapartida Górdon-Nuñez et al²⁷, por meio da análise de Bcl-2, PCNA e p53 em APs, observaram que 63,1% da amostra foi negativa para a Bcl-2 e os demais casos exibiram baixa imunopositividade. Os autores puderam observar correlação entre PCNA e Bcl-2, concluindo que tais proteínas estão envolvidas num papel concomitante de intensa atividade proliferativa e uma considerável taxa de morte celular, características esperadas para o comportamento biológico de neoplasia benigna como o AP. Considerando os dados conflitantes, é possível que o AP se comporte de maneira variada, em momentos exiba uma intensa atividade apoptótica e proliferativa, enquanto em outros uma maior atividade anti-apoptótica acompanhada de menor atividade mitótica.

Os APs mostraram-se positivos para Bcl-2 e CXCL12, no entanto, sem associação estatisticamente significativa, sugerindo que uma não é expressa da mesma forma que a outra. Nesse contexto, sugere-se que, em neoplasias glandulares salivares, a CXCL12 não atuaria na expressão da Bcl-2 e, portanto não está envolvida na patogênese da lesão. No entanto, estudos com outros tipos celulares como o de Hernández-López et al²², Mao et al²⁸ e Yano et al²⁹ mostram que a quimiona está envolvida na atividade anti-apoptótica, por meio de outras vias^{22,28,29}.

Quanto à imunoexpressão de Bcl-2 nos CMEs, a maior imunoexpressão dessa proteína nos casos de menor gradação histopatológica (I e II) e de melhor estadiamento clínico corroboram os resultados obtidos por AL-Rawi et al²⁴ e Janjua et al³⁰ ao analisarem amostras de CMEs, verificando-se maior positividade para a Bcl-2 em tumores predominantemente de baixo grau de malignidade. Baseado nesse fato é plausível sugerir que a expressão da Bcl-2 parece estar associada a neoplasias de glândula salivar de melhor comportamento biológico. Além de que a manutenção da viabilidade celular garantiria o tamanho tumoral e não necessariamente influencie a agressividade, e nesses casos a expressão poderia ser considerada fator de melhor prognóstico.

A diferença significativa da expressão da Bcl-2 entre os tipos de neoplasia neste estudo, corrobora com os dados obtidos por Atarbash et al²⁵, desse modo, pode-se inferir que a Bcl-2 seria fundamental para patogênese (inibição da apoptose e sobrevivência das células tumorais) dos APs, e em relação aos CMEs reforçando o antes citado, de que a Bcl-2 teria ação na manutenção do tamanho do tumor e pode estar associada aos casos de melhor comportamento biológico.

Os CMEs foram imunopositivos tanto para CXCL12, quanto para Bcl-2, porém sem correlação significativa, já que a expressão de CXCL12 manteve-se, em geral, constante diferente da Bcl-2. De forma análoga os APs expressaram as duas proteínas, sem associação significativa. Tais resultados levam a sugerir que a CXCL12 estaria realizando função importante na patogenia dessa lesão. Porém não está relacionado ao processo anti-apoptótico por meio da expressão da Bcl-2.

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, angiogênese, implica também na metástase de muitos tipos de neoplasias^{30, 31,32}. A capacidade de tumorigênese das quimiocinas em neoplasia de glândula salivar não está clara. Nesse contexto, destaca-se o papel da CXCL12 e sua interação com as metaloproteinasas de matriz (MMP), em especial da MMP-9 que degrada colágeno IV da lâmina basal, podendo esse evento, ter relevância na invasão das neoplasias^{34,35}.

Em relação à possível influência da CXCL12 na migração e invasão realizou-se a análise da expressão da MMP-9 em APs e CMEs. Descritivamente observou-se que a imunoexpressão dessa MMP-9 ocorreu em apenas 3 dos 30 APs. Dois localizados em palato e um em parótida, classificados como clássico/estromal e celularizado, respectivamente. Os três tumores apresentaram alta imunoexpressão para Bcl-2 e CXCL12. Ratificando os achados gerais da expressão da MMP-9 em AP deste estudo, Falcão et al³⁶ observaram que estas células expressaram MMP-9 na forma latente, enquanto que expressaram MMP-2 na forma latente e ativa. Dessa forma, acredita-se que, embora o tamanho reduzido da amostra não permita extrapolar inferências, a MMP-9 não estaria envolvida na patogenia dessa neoplasia.

No tocante a imunoexpressão de MMP-9 em CMEs aqui avaliados o tamanho reduzido da amostra tampouco permitiu estabelecer possível associação entre a imunoexpressão da MMP-9 com o estágio clínico, grau de malignidade e imunoexpressão de CXCL12. Descritivamente constatou-se que os resultados discordam da literatura, dando ênfase em estudos como o de De Vicente et al³⁶, que avaliaram o papel dessa MMP em carcinomas adenóides císticos, tumores mistos malignos e carcinomas indiferenciados de glândulas salivares observaram que a maioria dos tumores com metástase a distância exibiu imunopositividade para essa proteína nas células tumorais e nas células do infiltrado inflamatório, sendo associada ao estágio TNM das lesões, sugerindo, segundo os autores, que a expressão da MMP-9 poderia ser considerada fator prognóstico para baixa sobrevida do paciente pelo seu possível papel na invasividade celular neoplásica.

Corroborando os achados gerais da presente pesquisa, Mardami et al³⁸ por meio de saliva de pacientes acometidos por neoplasia de glândulas salivares e pacientes saudáveis, determinou o nível de MMP-9, observando que o coeficiente de MMP-9 foi significativamente maior em pacientes saudáveis do que os acometidos por neoplasia. Considerando apenas os portadores de neoplasias, os autores verificaram que os acometidos por neoplasia maligna apresentaram maior nível de MMP-9 na saliva que os acometidos por neoplasias benignas, porém sem diferença significativa. Baseados nesses resultados concluíram que é possível que o nível de MMP-9 sofra alteração conforme a progressão tumoral. Além de sugerir que a proteína tenha predominantemente função da modelação de matriz em glândulas normais.

Analizando a expressão de MMP-9 em CMEs, verificou-se que os casos com marcação para MMP-9 (Tabela 4) foram também positivos para CXCL12. Embora não houvesse correlação entre as proteínas, a CXCL12 poderia estar exercendo influência no papel da MMP-9. Ou que por outro lado, o fato da CXCL12 estar expressa em todos os CMEs, enquanto que a MMP-9 apenas em uma parcela da amostra, pode sugerir que os casos que foram positivos para MMP-9 apresentaram ligação do CXCL12 ao CXCR4 e assim desencadeado a via de sinalização para metástase, sem necessariamente haver metástase já que as neoplasias foram classificadas como grau II de malignidade e estágio clínico I/II. E dessa forma, os casos que não apresentaram MMP-9 puderam ter a via bloqueada, seja pela ligação do receptor a um antagonista ou por algum inibidor na complexa via de sinalização. Diante dos CMEs que apresentaram metástase, nota-se que expressaram CXCL12, mas não a MMP-9. Sugere-se que para o evento de metástase, as neoplasias tenham utilizado outra proteína que não a MMP-9. Ou pode-se ainda inferir, que apenas as células que metastasiaram e chegaram ao tumor secundário apresentem tal propriedade e expressam MMP-9, enquanto que a população celular que permaneceu no tumor primário perderia a propriedade de expressão. Infelizmente nesta pesquisa não dispomos de amostras de tumores metastáticos dos pacientes para sustentar tal hipótese, porém, seriam importantes maiores estudos com esse intuito.

Em conclusão verificou-se que o CXCL12 e Bcl-2 estão expressos em níveis diferentes nas duas neoplasias estudadas. Sugere-se que o CXCL12 tem papel essencial na patogênese dos CMEs, podendo ser considerado um marcador de prognóstico para essa neoplasia maligna de glândula salivar. Em relação à Bcl-2, nota-se uma proteína importante no desenvolvimento dos APs, e o fato de ter maior expressão nos tumores clássicos/estromais, considerando que, segundo Seifert et al¹⁹ acredita-se que o tipo celularizado usualmente exibem maior

crescimento e potencial risco de recorrência, pode-se sugerir que a imunexpressão da Bcl-2 também representar um fator de prognóstico e terapêutico. Quanto à expressão de MMP-9, em geral, vê-se que ela não está envolvida no processo de progressão tumoral da amostra avaliada. Considerando a imunexpressão das três proteínas avaliadas nesta pesquisa, conclui-se que, embora a CXCL12 exerça algum papel importante na patogenia das neoplasias analisadas, ainda assim, parece não interagir com a Bcl-2 e com a MMP-9 em APs e CMEs. Dessa forma, faz-se necessário a realização de novos estudos, com uma amostra maior das lesões aqui estudadas e em outros tipos de neoplasias glandulares salivares, sobretudo nas malignas, visando esclarecer o verdadeiro papel do complexo CXCL12/CXCR4 na tumorigênese.

REFERÊNCIAS

1. Ellies M, Schaffranietz F, Arglebe C, et al. Tumors of the salivary glands in childhood and adolescence. *J Oral Maxillofac Surg* 2006; **64**:1049-58.
2. Al-Khateeb TH, Ababneh KT. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103:e53-9.
3. Ansari MH. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. *J Oral Maxillofac Surg* 2007 ;**65**:2187-94.
4. Strub GM, Georgolios A, Graham RS, et al. Massive transcranial parotid pleomorphic adenoma: recurrence after 30 years. *J Neurol Surg Rep* 2012;**73**:1-5
5. Brandwein, MS. et al. Mucoepidermoid carcinoma a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Ame J Surg Pathol* 2001, **25**:835-45.
6. Ben-Izhak O, Laster Z, Araidy S, et al. TUNEL - an efficient prognosis predictor of salivary malignancies. *Br J Cancer* 2007;**96**:1101-6.
7. Barnes L, Eveson JW, et al. Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. 1st ed. Lyon: IARC; 2005. 259–60.
8. Rostene W, Buckingham JC. Chemokines as modulators of neuroendocrine functions. *J Mol Endocrinol* 2007;**38**:351-3.
9. Hembruff SL, Cheng N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. *Cancer Ther* 2009 **14**:254-267.
10. Teicher BA, Fricker SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. *Clin Cancer Res* 2010;**16**:2927-31.
11. Wang Y, Xie Y, Oupický D. Potential of CXCR4/CXCL12 Chemokine Axis in Cancer Drug Delivery. *Curr Pharmacol Rep* 2016;**2**:1-10.
12. Shen B, Zheng MQ, Lu JW, et al. CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013;**14**:5403-8.
13. Seifert G, Langrock I, Donath K. Pathomorphologische Subklassifikation der pleomorphen Speicheldrusenadenome. *HNO* 1976;**24**:415-26.
14. 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? *Acta Histochem* 2013 ;**115**:564-8.

15. Atarbashi S, Elahi M, Khani M, et al. Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma -2 in pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma. *Dent Res J (Isfahan)* 2014;**11**: 257-63.
16. Ferreira JC, Morais MO, Elias MR, 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* 2014;**59**:578-85.
17. Bernardes, VF.; Ramos-Jorge, ML.; Carmo, et al. Intraoral mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: lack of association among clinicopathological features and immunoexpression of c-erbB-2 in 29 cases. *Int. J. Morphol* 2008;**26**:1005-1011.
18. Das Neves, J. C.; ABREU e LIMA, M. C.; SOBRAL, A. P.V. A clinicopathologic study of 106 pleomorphic adenomas of the major salivary glands. *J Bras Patol Med Lab* 2007;**43**:347-4.
19. Seifert g. et al. WHO International Histological Classification of Tumours. *Path. Res. Pract* 1990; **186**,555-581.
20. da Silva AD, Silva CA, Montalli VA, et al. In vitro evaluation of the suppressor potential of conditioned medium from benign myoepithelial cells from pleomorphic adenoma in malignant cell invasion. *J Oral Pathol Med* 2012;**41**:610-4.
21. Wen DS, Zhu XL, Guan SM, et al. Silencing of CXCR4 inhibits the proliferation, adhesion, chemotaxis and invasion of salivary gland mucoepidermoide carcinoma Mc3 cells in vitro. *Oral Oncol* 2008;**44**:545-54.
22. 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.
23. Teni T, Pawar S, Sanghvi V, et al. Expression of bcl-2 and bax in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. *Pathol Oncol Res* 2002;**8**:109-14.
24. Al-Rawi NH, Omer H, Al Kawas S. Immunohistochemical analysis of P(53) and bcl-2 in benign and malignant salivary glands tumors. *J Oral Pathol Med* 2010;**39**:48-55.
25. Manjunatha BS, Kumar GS, Raghunath V. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in benign and malignant salivary gland tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011;**16**:e503-7.
26. Gordón-núñez, MA; Godoy, GP; Soares, RC. et al. Immunohistochemical expression of PCNA, p53 and bcl-2 in pleomorphic adenomas. *Int J morf* 2008, **26**: 567-572.
27. Mao W., Yi X., Qin J. et al. CXCL12 inhibits cortical neuron apoptosis by increasing the ratio of Bcl-2/Bax after traumatic brain injury. *Int J Neurosci.* 2014 ;**124**:281-90.
28. Yano T, Liu Z, Donovan J, et al. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 attenuates diabetes in mice and promotes pancreatic beta-cell survival by activation of the prosurvival kinase Akt. *Diabetes* 2007;**56**:2946-57.
29. Janjua OS, Qureshi SM, Khan TS, et al. Bcl-2 protein expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a single institution experience. *Hematol Oncol Stem Cell Ther* 2012;**5**:96-100.
30. Spano JP, Andre F, Morat L, Sabatier L. et al. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. *Ann Oncol* 2004;**15**:613-7.
31. Jiang YP, Wu XH, Shi B. et al Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. *Gynecol. Oncol* 2006;**103**:226-33.
32. 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.

33. Kerkelä E, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol* 2003;**12**:109-25.
34. Yu T, Wu Y, Helman JJ. et al. CXCR4 Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Migration and Invasion through Inducing Expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK Signaling Pathway. *Mol Cancer Res* 2011; **9**:161–72.
35. Falcão AS, Kataoka MS, Ribeiro NA. et al. A Novel Cell Line Derived from Pleomorphic Adenoma Expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and Shows Numeric Chromosomal Anomalies. *PLoS One* 2014; 9: e105231.
36. de Vicente JC, Lequerica-Fernández P, López-Arranz JS, et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in high-grade salivary gland carcinomas is associated with their metastatic potential. *Laryngoscope* 2008;**118**:247-51.
37. Mardani M, Andisheh-Tadbir A, Khademi B. et al. Serum level of matrix metalloproteinase-9 in patients with salivary gland tumor. *J Dent(Shiraz)* 2014;**15**:199-203.

Tabela 1. Distribuição absoluta e relativa dos casos de adenoma pleomórfico de acordo com características clínicas e morfológicas. Campina Grande – PB, 2016.

Características clínicas	Adenoma pleomórfico
Idade (anos)	Média (Desvio-padrão)
<i>Média</i>	45,67 (19,057)
Gênero	<i>n (%)</i>
<i>Masculino</i>	8 (26,7)
<i>Feminino</i>	22 (73,3)
Localização	
<i>Palato</i>	13 (43,3)
<i>Parótida</i>	11 (36,7)
<i>Submandibular</i>	2 (6,7)
<i>Língua</i>	0 (0,0)
<i>Lábio</i>	2 (6,7)
<i>Mucosa Jugal</i>	1 (3,3)
<i>Região retromolar</i>	1 (3,3)
Gradação morfológica	
<i>Clássico</i>	12 (40)
<i>Estromal</i>	7 (23,3)
<i>Celularizado pleomórfico</i>	4 (13,3)
<i>Celularizado monomórfico</i>	7 (23,2)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da UEPB Campus I.

Tabela 2. Distribuição absoluta e relativa dos casos de carcinoma mucoepidermoide de acordo com parâmetros clínico-patológicos. Campina Grande – PB, 2016.

Características clínicas	Carcinomas mucoepidermoides
Idade (anos)	Média (Desvio-padrão)
<i>Média</i>	54,3 (21,717)
Gênero	n (%)
<i>Masculino</i>	13 (43,3)
<i>Feminino</i>	17 (56,7)
Localização	
<i>Palato</i>	14 (46,7)
<i>Parótida</i>	9 (30)
<i>Submandibular</i>	0 (0,0)
<i>Língua</i>	4 (13,3)
<i>Lábio</i>	0 (0,0)
<i>Mucosa Jugal</i>	2 (6,7)
<i>Região retromolar</i>	1 (3,3)
Grau histopatológico	
<i>Grau I</i>	8 (26,7)
<i>Grau II</i>	9 (30)
<i>Grau III</i>	13 (43,3)
Tumor	
<i>T1</i>	8 (26,7)
<i>T2</i>	14 (46,7)
<i>T3</i>	5 (16,7)
<i>T4</i>	3 (10)
Nodúlo	
<i>N0</i>	24 (88,9)
<i>N1</i>	3 (11,1)
<i>N2</i>	0 (0,0)
<i>N3</i>	0 (0,0)
Metástase	
<i>M0</i>	26 (96,3)
<i>M1</i>	1 (3,7)
Estágio clinic	
<i>I</i>	8 (29,6)
<i>II</i>	10 (37)
<i>III</i>	5 (18,5)
<i>IV</i>	4 (14,8)

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da UEPB Campus I.

Tabela 3. Distribuição absoluta e mediana relativas de imunopositividade para Bcl-2 e CXCL-12 e suas diferenças de acordo com as características clínico-patológicas dos adenomas pleomórficos e carcinoma mucoepidermóides. Campina Grande – PB, 2016.

Características	N	Bcl-2			CXCL-12		
		mediana	Q ₂₅ – Q ₇₅	P	Mediana	Q ₂₅ – Q ₇₅	P
Adenoma pleomórfico							
Glândula salivar							
Menor	17	81,50	62,75 – 88,75	0,967	90,20	77,00 – 93,30	0,062
Maior	13	82,20	58,50 – 86,95		96,10	85,70 – 98,60	
Histopatologia							
Clássico/ stromal	19	81,50	57,40 – 86,00	0,378	92,30	81,50 – 96,10	0,948
Celularizado	11	82,10	72,90 – 88,50		90,60	80,90 – 97,50	
Carcinoma mucoepidermoide							
Glândula salivar							
Menor	21	68,00	58,00–83,80	0,108	97,40	95,65 – 98,45	0,441
Maior	9	56,80	43,90–74,10		96,90	91,10 – 98,75	
Estágio clínico							
Estágio I/ II	18	67,35	55,25–85,07	0,504	97,25	95,72–98,62	0,382
Estágio III/ IV	9	65,60	50,95–72,65		95,40	94,55–98,45	
Grau histopatológico							
Grau I/ II	17	68,00	58,00–86,25	0,250	97,70	96,80–98,65	0,107
Grau III	13	60,80	49,40–77,60		95,40	91,10–98,45	

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da UEPB Campus I.

Tabela 4. Distribuição absoluta de adenoma pleomórfico e carcinoma mucoepidermoide MMP-9 positivos. Campina Grande – PB, 2016.

Lesão	Glândulasalivar	Subtipo histológico/ grau histopatológico	Estágioclínico
<i>Adenoma pleomórfico</i>	Maior (n = 1)	Clássico/ estromal (n = 1)	Não se aplica
	Menor (n = 2)	Celularizado (n = 2)	
<i>Carcinoma mucoepidermoide</i>	Maior (n = 4)	Grau I (n = 1)	Estágio I/ II (n = 7)
	Menor (n = 4)	Grau II (n = 5)	Estágio III/ IV (n = 1)
		Grau III (n = 2)	

Tabela 5. Medianas relativas da Bcl-2 e CXCL-12 com relação entre o tipo de lesão. Campina Grande – PB, 2016.

Grupos	N	Mediana	Q₂₅ – Q₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	P
Bcl-2							
<i>Adenoma pleomórfico</i>	30	81,80	61,85 – 88,05	35,35	1060,50	304,50	0,031
<i>Carcinoma mucoepidermoide</i>	30	66,15	52,57 – 79,80	25,65	769,50		
CXCL-12							
<i>Adenoma pleomórfico</i>	30	91,20	81,35 – 96,25	23,12	693,50	228,50	0,001
<i>Carcinoma mucoepidermoide</i>	30	97,25	94,95 – 98,62	37,88	1136,50		

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Departamento de Odontologia da UEPPB Campus I.

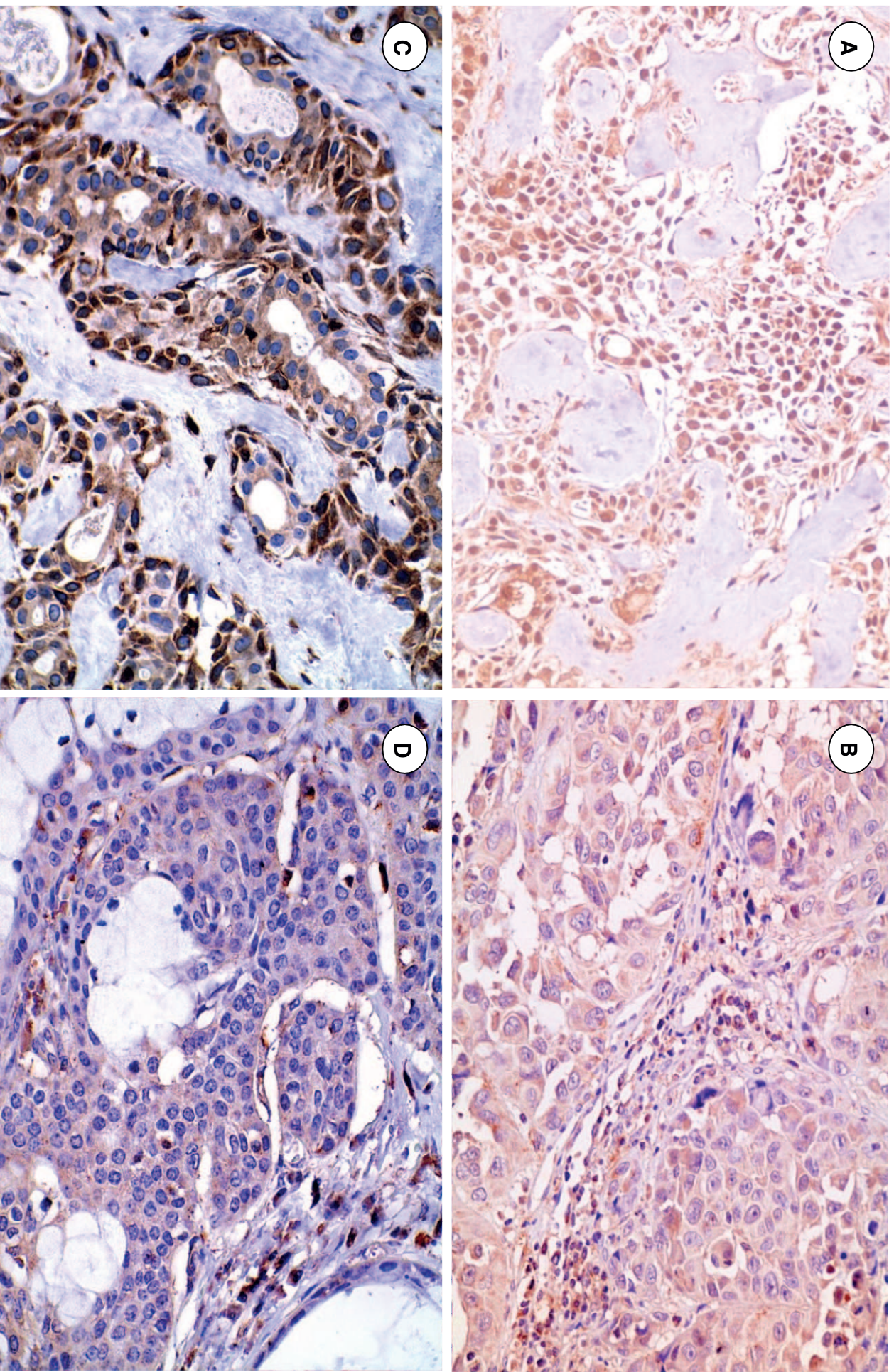
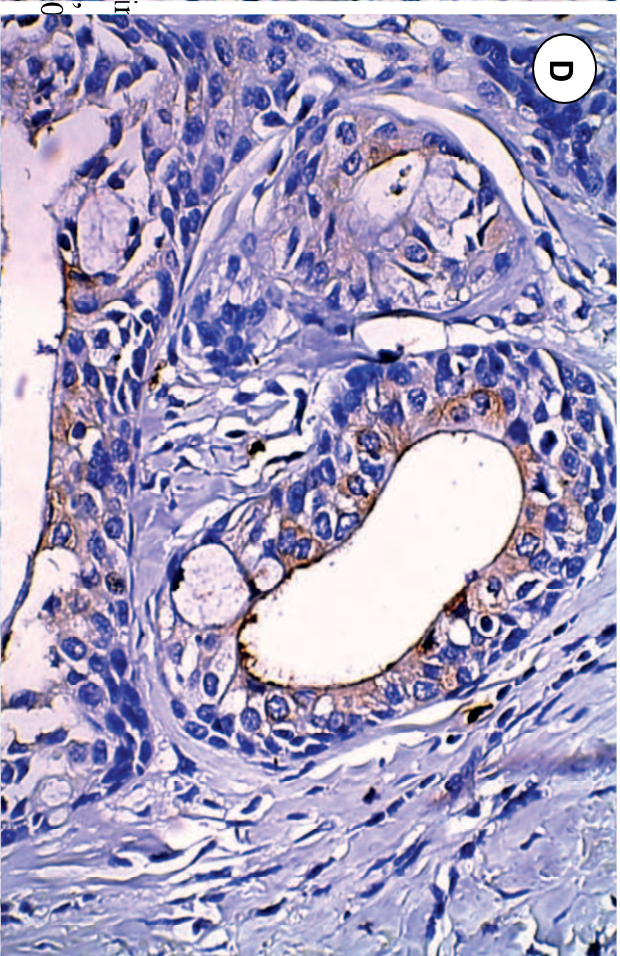
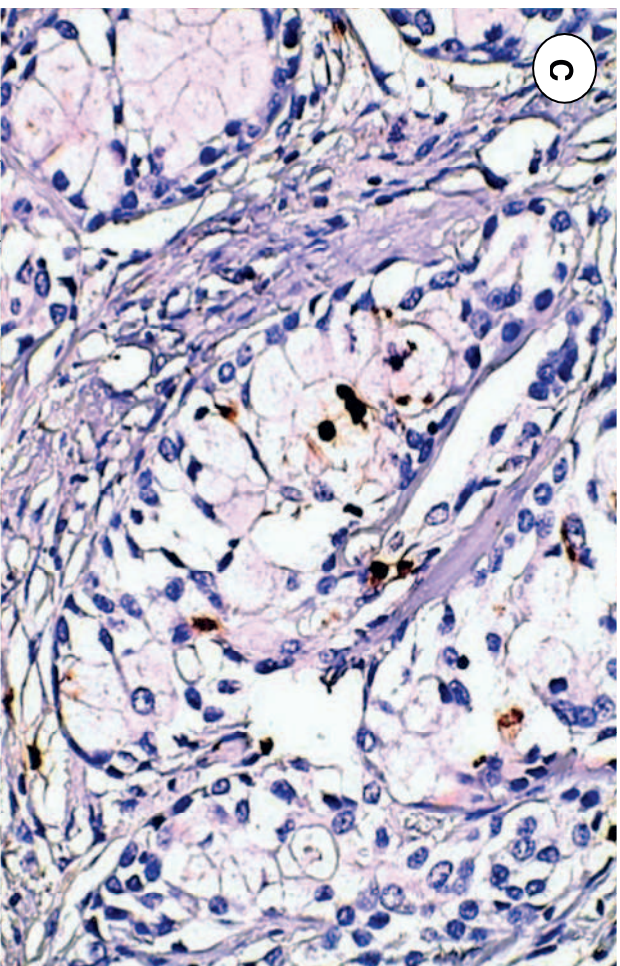
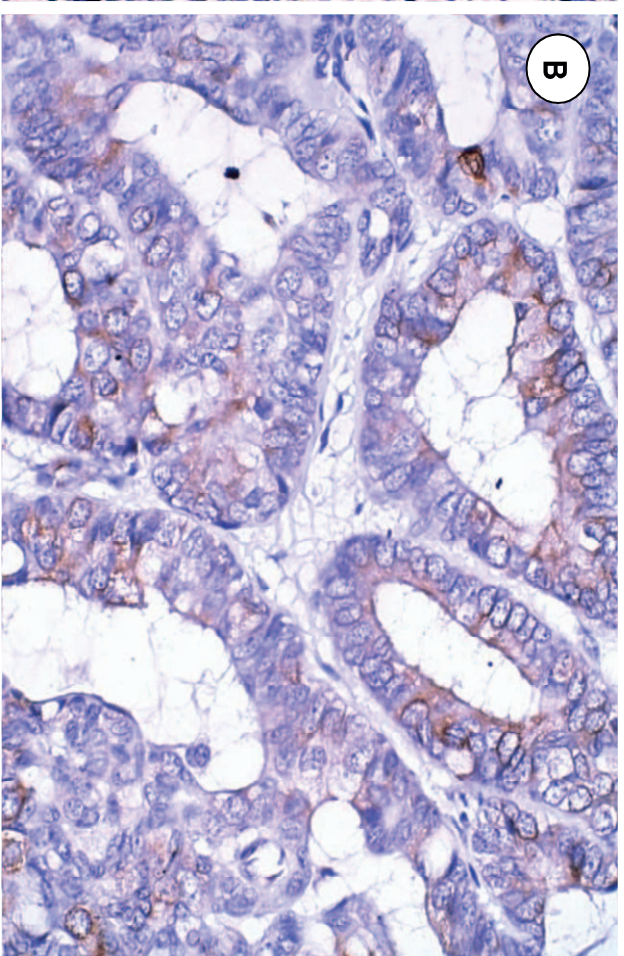
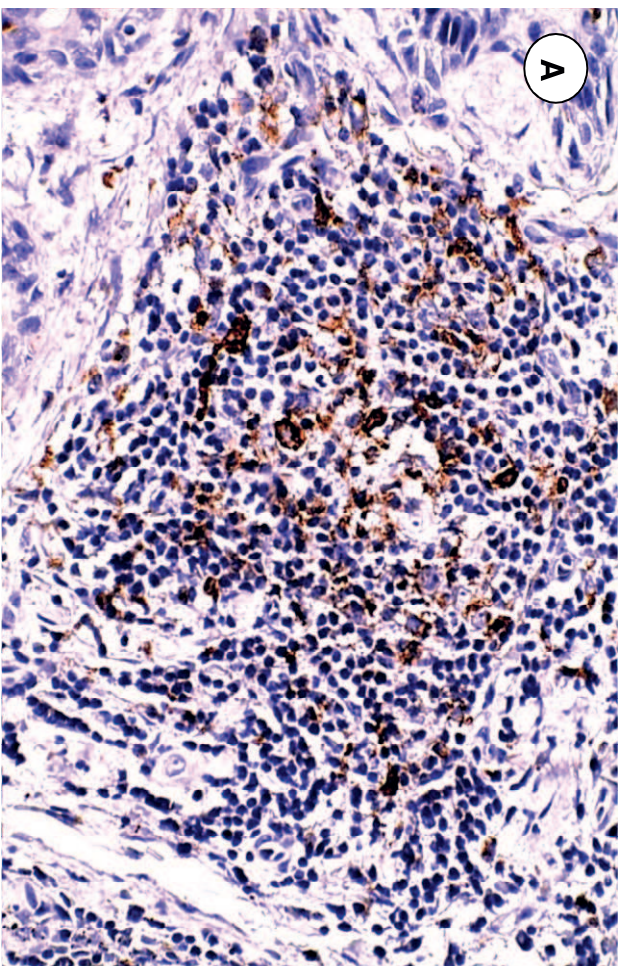
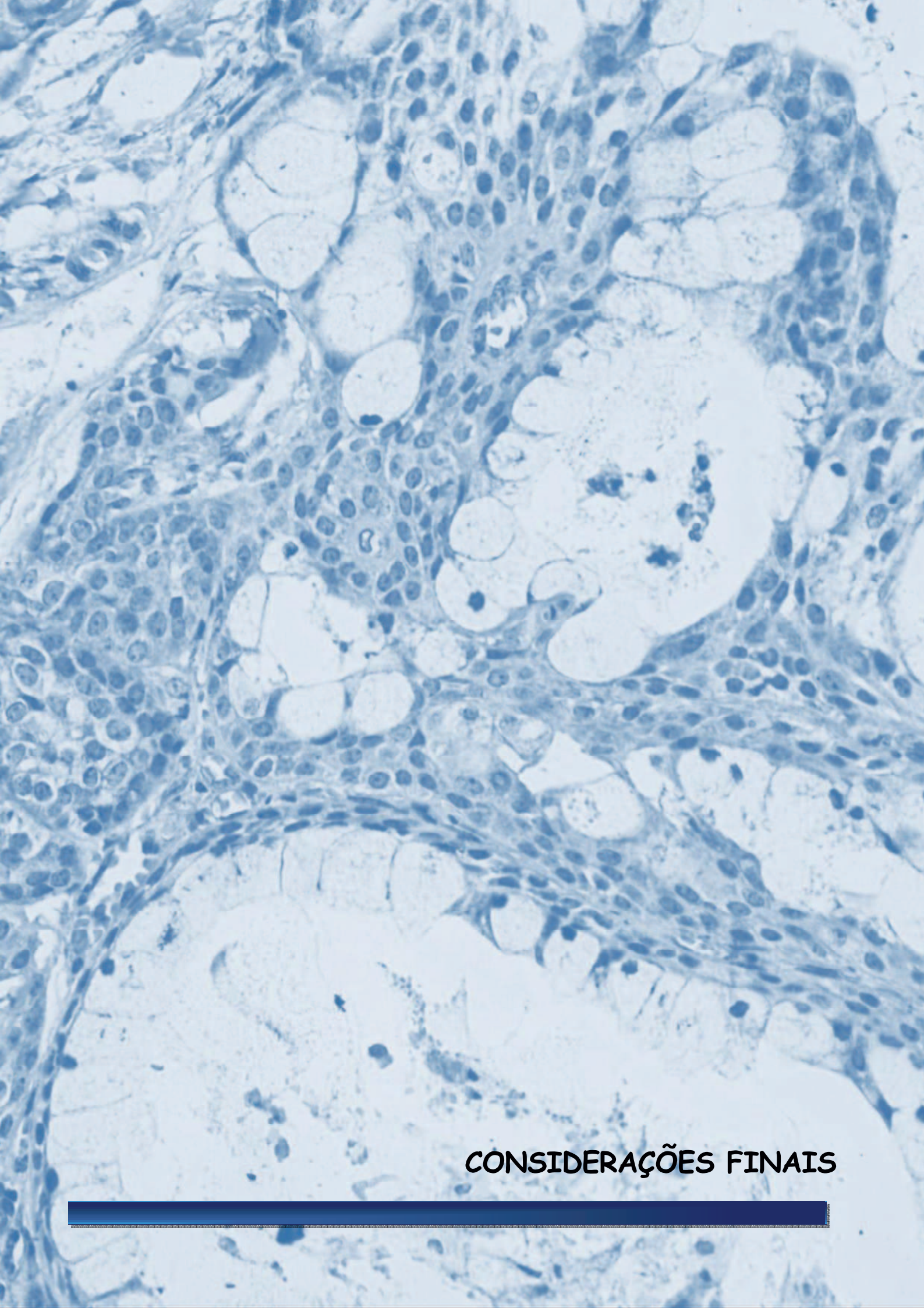


Figura 1. A - Células neoplásicas de AP CXCL12 positivas (Novolink™, Novocasta, x 400); B - Células neoplásicas de CME CXCL12 positivas (Novolink™, Novocasta, x 400); C - Células neoplásicas de AP Bcl-2 positivas (Novolink™, Novocasta, x 400); D - Células neoplásicas de CME Bcl-2 positivas (Novolink™, Novocasta, x 400).

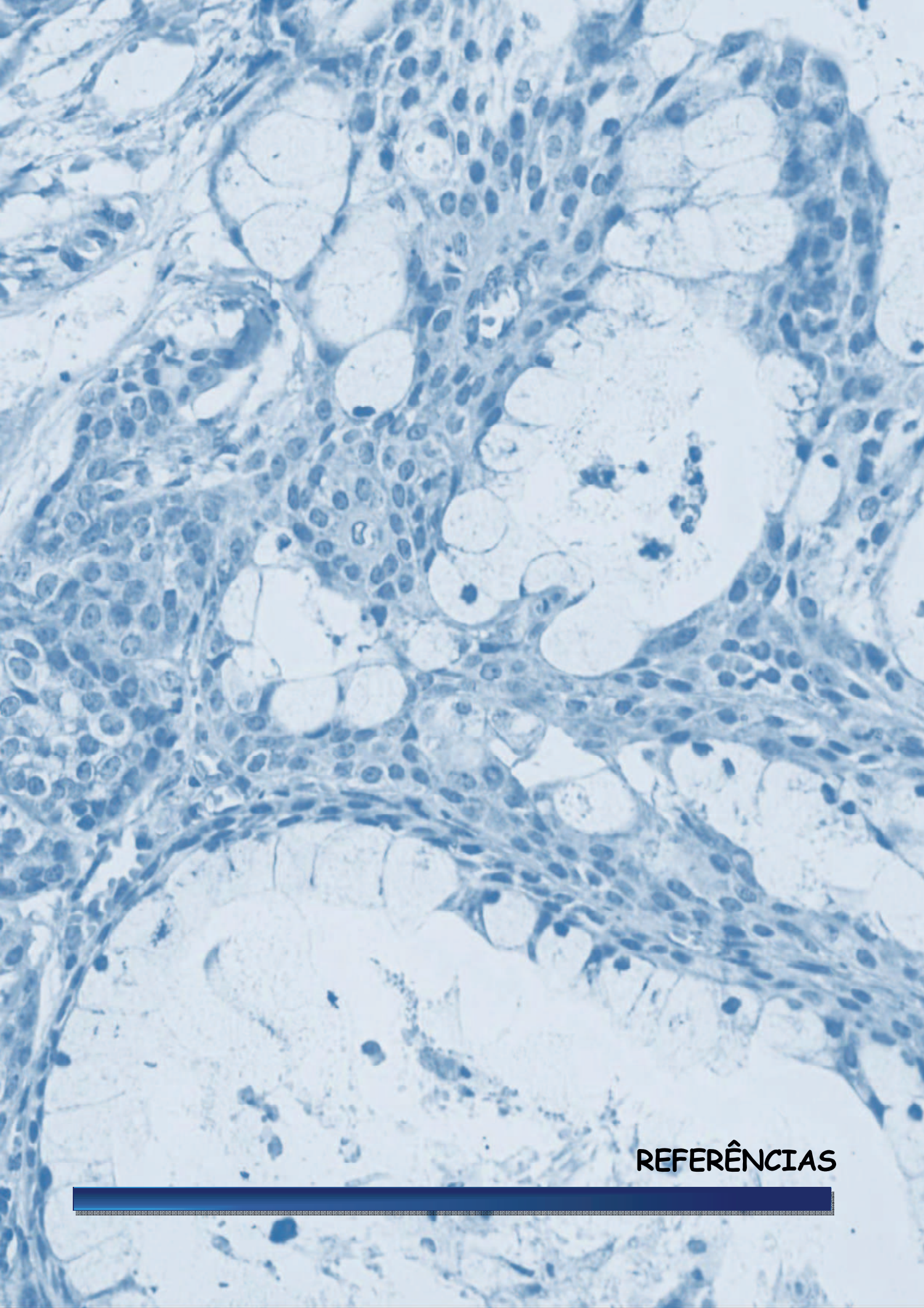




CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O perfil clínico e histopatológico dos Adenomas pleomórficos e Carcinomas mucoepidermóides avaliados foi predominantemente semelhante aos dados da literatura;
- Em relação à expressão das proteínas, os CMEs apresentaram maior índice de positividade de CXCL12 do que os APs, com significância estatística. Porém sem relação estatística entre a expressão e as características histopatológicas. Baseado no exposto sugere-se que essa proteína pode apresentar papel fundamental na patogênese da neoplasia maligna, por mecanismos que ainda não estão claros;
- A maior expressão da Bcl-2 nos APs, com diferença da imunoexpressão em relação às características histopatológicas, sugerem um papel para essa proteína na manutenção da viabilidade celular, um dos mecanismos importantes para desenvolvimento da lesão, porém, a ausência de associação estatisticamente significativa da expressão dessa proteína em relação à expressão da CXCL12, sugere que provavelmente, a via de sinalização regulada por essa quimiocina não estaria relacionada à expressão e ação da Bcl-2 na patogenia dessa neoplasia;
- Todos os casos de CMEs apresentaram imunoexpressão de CXCL12 e Bcl-2, no entanto sem associação significativa, sugerindo-se que a CXCL12 pode não participar da expressão da Bcl-2, e esta não possui papel fundamental na patogênese dos CMEs. A maior expressão da Bcl-2 esteve nos casos de melhor comportamento biológico, podendo sugerir que a Bcl-2 pode ter algum papel como fator prognóstico para os casos de menor agressividade;
- A MMP-9 foi, em geral, imunonegativa nas duas lesões. Os casos de CME que apresentaram pior estadiamento clínico não expressaram a proteína. Baseado no exposto sugere-se que a MMP-9 parece não participar do processo de invasão e metástase dessa neoplasia. De forma semelhante, os APs, em sua maioria, apresentaram-se negativos, sem diferença entre as características histopatológicas, implicando que a expressão de MMP-9 não parece estar relacionada à expansão tumoral. Em relação à expressão de CXCL12 e MMP-9, não houve relação significativa da expressão das duas proteínas e os parâmetros clinicopatológicos. Sugere-se que a expressão da CXCL12 não parece estar diretamente envolvida na expressão de MMP-9. As neoplasias aqui analisadas provavelmente expandem-se, invadem e metastatizam por meio de outros mecanismos, sugere-se que outra metaloproteína esteja envolvida nesse intrincado processo;
- A imunoexpressão da MMP-9 no infiltrado inflamatório presente nas neoplasias pode representar um mecanismo utilizado na patogenia tumoral, principalmente dos CMEs, para tornar o microambiente favorável à viabilidade das células e crescimento tumoral.



REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K. et al. *Imunologia celular e molecular*. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2011, 592p.
- 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.
- AL-KHATEEB, TH; ABABNEH, KT. Salivary tumors in north Jordanians: a descriptive study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v.103 n.5 p.53-9, 2007.
- AL-RAWI, NH; OMER, H; AL KAWAS, S. Immunohistochemical analysis of P(53) and bcl-2 in benign and malignant salivary glands tumors. **J Oral Pathol Med.** v.39, n.1, p.48-55, 2010.
- ANSARI, MH. Salivary gland tumors in an Iranian population: a retrospective study of 130 cases. **J Oral Maxillofac Surg.** v.65, n.11, p.2187-94, 2007.
- ATARBASHI, S; ELAHI, M; KHANI, M; RAKHSHAN, V. Immunohistochemical analysis of B-cell lymphoma -2 in pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma. **Dent Res J (Isfahan).** v.11, n.2, p.257-63, 2014.
- BAI, S. et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma: a multi-institutional review of 76 patients. **Head Neck Pathol.** v.7, n.2, p.105-12, 2013.
- BALKWILL, F. Cancer and the chemokine network. **Nature Rev Cancer**, v. 4, n. 7, p. 540-550, 2004.
- BARNES, L. et al. Pathology and genetics of head and neck tumours. World Health Organization Classification of Tumours. 1st ed. **Lyon: IARC**, p.259–60, 2005
- BASBUG, M. et al. Mucoepidermoid carcinoma in a breast affected by burn scars: comprehensive literature review and case report. **Breast Care**, v. 6, n.4, p. 293-297, 2011.
- BEN-IZHAK, O. et al. TUNEL – an efficient prognosis predictor of salivary malignancies. **Br J Cancer**, v.96, n.7, p.1101-1106, 2007.
- BERNARDES, VF. et al. Intraoral mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: lack of association among clinicopathological features and immunoexpression of c-erbB-2 in 29 cases. **Int. J. Morphol.** v.26, n.4, p.1005-1011, 2008.

BIRKEDAL-HANSEN, H. et al. Matrix metalloproteinases: a review. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.4, n.2, p.197-250, 1993.

BOURBOULIA, D.; STETLER-STEVENSON, W.G. Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. **Semin Cancer Biol**, v.20, n.3, p.161–68, 2010.

CHEN GS, YU HS, LAN CC. et al. CXC chemokine receptor CXCR4 expression enhances tumorigenesis and angiogenesis of basal cell carcinoma. **Br J Dermatol** v.154:910–18, 2006.

DA SILVA AD, et al. In vitro evaluation of the suppressor potential of conditioned medium from benign myoepithelial cells from pleomorphic adenoma in malignant cell invasion. **J Oral Pathol Med**. v.41, n.8, p.610-4, 2012.

DAS NEVES, J. C. et al. clinicopathologic study of 106 pleomorphic adenomas of the major salivary glands. **J Bras Patol Med Lab**. v.43, n.5, p.347-4, 2007.

DE VICENTE, JC. et al. Expression of matrix metalloproteinase-9 in high-grade salivary gland carcinomas is associated with their metastatic potential. **Laryngoscope**. v.118, n.2, p.247-51, 2008.

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

FALCÃO, ASC. et al. A Novel Cell Line Derived from Pleomorphic Adenoma Expresses MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP2, and Shows Numeric Chromosomal Anomalies. **PLoS One**.v. 9n. 8, 2014.

FERREIRA, JC; 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.

GORDÓN-NUÑEZ, M.A. et al. Immunohistochemical expression of PCNA, p53 and bcl-2 in pleomorphic adenomas. **Int J morf**. v.26, n.3, p.567-572, 2008.

HAMADA, T. 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.813-821, 2004.

HEMBRUFF, SL; CHENG, N. Chemokine signaling in cancer: Implications on the tumor microenvironment and therapeutic targeting. **Cancer Ther**. v.7, n.A, p.254-267, 2009.

HERNÁNDEZ-LÓPEZ, C. et al. CXCL12/CXCR4 signaling promotes human thymic dendritic cell survival regulating the Bcl-2/Bax ratio. **Immunol Lett.** V.120, n.1-2, p.72-8, 2008.

HONG, S.D. et al. Expression of metalloproteinase-2 and-9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. **Oral Oncol**, v.36, n.2, p.207-13, 2000.

ITO, F. 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.

JANJUA, OS; QURESHI, SM; KHAN, TS; ALAMGIR, W. Bcl-2 protein expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a single institution experience. **Hematol Oncol Stem Cell Ther.** v.5, n.2, p.96-100, 2012.

JIANG YP, WU XH, SHI B. et al Expression of chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 in human epithelial ovarian cancer: an independent prognostic factor for tumor progression. **Gynecol. Oncol** 2006;103:226–33.

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

JORDAN, R. C. K. et al. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **Oral Oncol, Eur J Cancer**, n.32B, n.6, p.394–400, 1996.

KAHARI, V.M.; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. **Annals of Medicine**, v.31, n.1, p.34-45, 1999.

KERKELÄ, E; SAARIALHO-KERE, U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. **Exp Dermatol.** v.12, n.2, p.109-25, 2003.

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.

LU, P.; WEAVER, V. M.; WERB, Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. **J Cell Biol**, v.196, n.4, p.395-406, 2012.

LUUKKAA, H, et al. Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -9 and -13 as prognostic factors in salivary gland cancer. **Acta Oto-Laryngol**, v.128, n.4, p.482-90, 2008.

MANJUNATHA, BS; KUMAR, GS; RAGHUNATH, V. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in benign and malignant salivary gland tumors. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v.16 n.4, 2011.

MAO, W et al. CXCL12 inhibits cortical neuron apoptosis by increasing the ratio of Bcl-2/Bax after traumatic brain injury. **Int J Neurosci**. v.124, n.4, p.281-90, 2014.

MARDANI, M. et al. Serum level of matrix metalloproteinase-9 in patients with salivary gland tumor. **J Dent(Shiraz)**. v.15, n.4, p.199-203, 2014.

MIRANDA VIANA ADE, C. et al. Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a role in the control of apoptosis? **Acta Histochem**. v.115, n.6, p.564-8, 2013

NASSER, M.W.et al. Crosstalk between Chemokine Receptor CXCR4 and Cannabinoid Receptor CB2 in Modulating Breast Cancer Growth and Invasion. **PLoS One**, v. 6, n.9, 2011.

POLETTE, M, et al. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. **Crit rev Oncol Hematology**, v.49, n.3, p.179-86, 2004.

QI-LUNG et al. Bcl-2: Role in epithelial differentiation and oncogenesis. **Human Pathol**, v.27, n.2, p.102-9, 1996.

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

SAIKUMAR, P. et al. Apoptosis: definition, mechanisms, and relevance to disease., **Am J of Med**, v.107, p.489-506, 1999.

SANTOS, G. C. et al. Neoplasia de glândulas salivares: estudo de 119 casos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v.39, n.4, p.371-5, 2003.

SEIFERT, G. et al. WHO International Histological Classification of Tumours. Path. Res. Pract. 1990; 186,555-581.

SEIFERT, G; LANGROCK, I; DONATH, K. Pathomorphologische Subklassifikation der pleomorphen Speichel drüsen adenome. v.24, p.415-26, 1976.

SHEMIRANI, N. et al. Expression of Mucin (MUC) genes in mucoepidermoid carcinoma. **Laryngoscope**, v. 121, n.1, p.167-170, 2011.

SHEN, B. et al. CXCL12-CXCR4 promotes proliferation and invasion of pancreatic cancer cells. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 9, p. 5403-5408, 2013.

SINGH, B. B. et al. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol and Endod**, v.85, n.6, p.692-698, 1998.

SINGH, B. B. et al. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. **Human Pathol**, v.30, n.9, p.1097-105, 1999.

SOUZA, A. P.; LINE, S. R. P. The biology of matrix metalloproteinases. **Rev FOB**, v.10, n.1, p.1-6, 2002.

SPANO JP, ANDRE F, MORAT L, SABATIER L. et al. Chemokine receptor CXCR4 and early-stage non-small cell lung cancer: pattern of expression and correlation with outcome. **Ann Oncol** 2004;15:613-7.

STRUB, GM; et al Massive transcranial parotid pleomorphic adenoma: recurrence after 30 years. **J Neurol Surg Rep**. V.73, n.1, p.1-5, 2012.

TEICHER, BA; FRICKER, SP. CXCL12 (SDF-1)/CXCR4 pathway in cancer. **Clin Cancer Res**. v.16, n.11, p.2927-31, 2010.

TENI, T; et al. Expression of bcl-2 and bax in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. **Pathol Oncol Res**. V.8,n.2, p.109-14 2002.

VARGAS, P. A. et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. **Ver. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, v.57, n.6, p.271-6, 2002.

VICENTE, J. C. et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v.41, n.3, p.283-293, 2005.

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, Y; XIE, Y; OUPICKÝ, D. Potential of CXCR4/CXCL12 Chemokine Axis in Cancer Drug Delivery. **Curr Pharmacol Rep**. v.2 n.1, p.1-10, 2016

WEN, DS; 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.

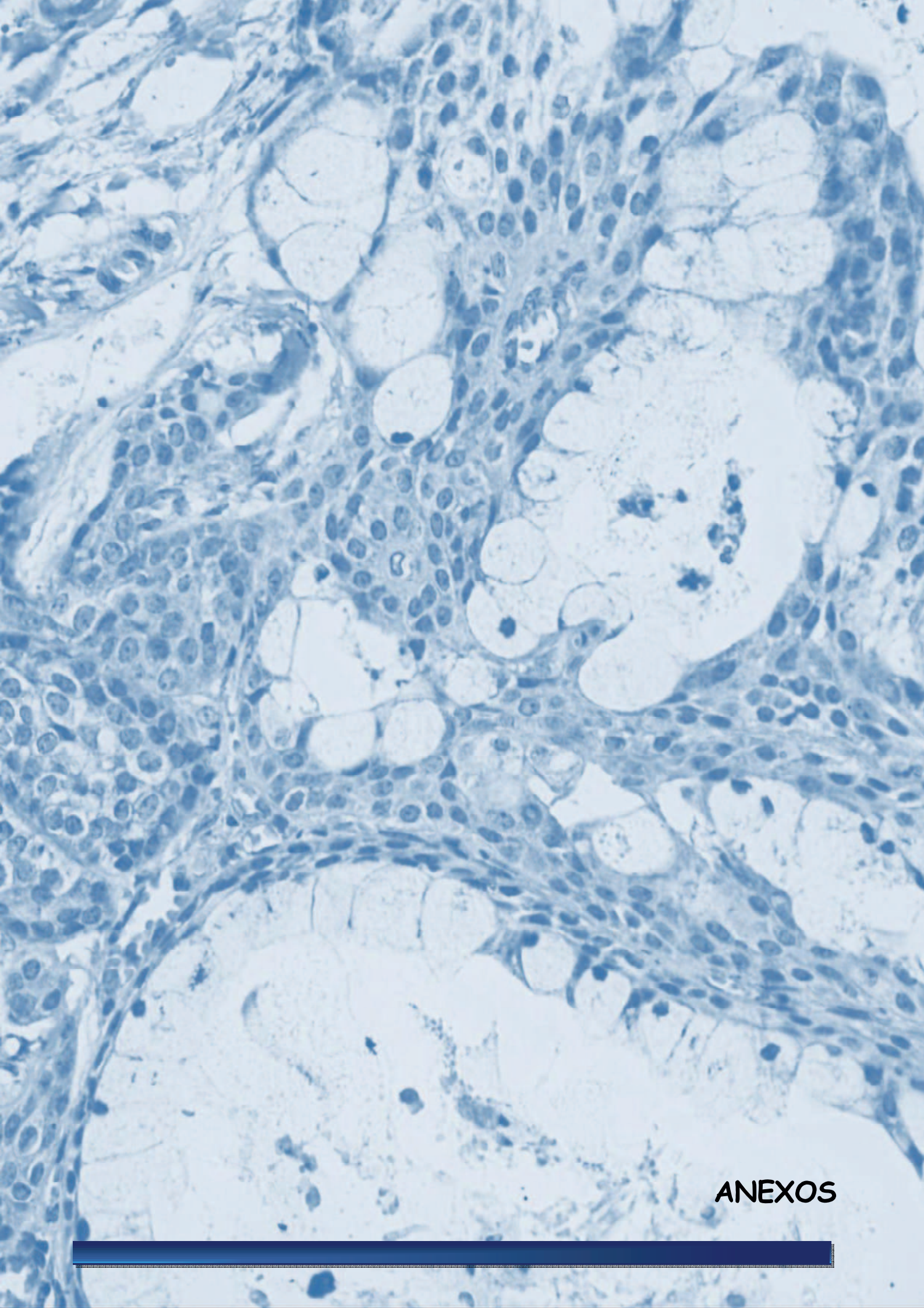
YANO, T; et al. Stromal cell derived factor-1 (SDF-1)/CXCL12 attenuates diabetes in mice and promotes pancreatic beta-cell survival by activation of the prosurvival kinase Akt. **Diabetes**. v.56, n.12, p.2946-57, 2007.

YIN, H-F. et al. Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands. **Pathol Int**, v.50, n. 8, p.603-609, 2000.

YU T, WU Y, HELMAN JI. et al. CXCR4 Promotes Oral Squamous Cell Carcinoma Migration and Invasion through Inducing Expression of MMP-9 and MMP-13 via the ERK Signaling Pathway. **Mol Cancer Res** 2011; 9:161-72, 2011.

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

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



ANEXOS

ANEXO 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											
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 imunoistoquímica 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, CME e CAC que constituirão a amostra. A amostra será intencional, baseada na quantidade de material disponível no bloco e constituída 30 amostras teciduais de AP, 30 mioepitelioma, 30 CME e 30 CAC proveniente de glândulas salivares maiores e menores. O procedimento de coleta dos dados											
<table style="width: 100%; border: none;"> <tr> <td style="width: 50%;">Endereço: Av. das Barúbas, 351- Campus Universitário</td> <td style="width: 50%;"></td> </tr> <tr> <td>Bairro: Bodocongó</td> <td>CEP: 58.109-753</td> </tr> <tr> <td>UF: PB</td> <td>Município: CAMPINA GRANDE</td> </tr> <tr> <td>Telefone: (83)3315-3373</td> <td>Fax: (83)3315-3373</td> </tr> <tr> <td></td> <td>E-mail: cep@uepb.edu.br</td> </tr> </table>		Endereço: Av. das Barúbas, 351- Campus Universitário		Bairro: Bodocongó	CEP: 58.109-753	UF: PB	Município: CAMPINA GRANDE	Telefone: (83)3315-3373	Fax: (83)3315-3373		E-mail: cep@uepb.edu.br
Endereço: Av. das Barúbas, 351- Campus Universitário											
Bairro: Bodocongó	CEP: 58.109-753										
UF: PB	Município: CAMPINA GRANDE										
Telefone: (83)3315-3373	Fax: (83)3315-3373										
	E-mail: cep@uepb.edu.br										

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



Continuação do Parecer: 1.435.401

epidemiológicos basear-se-á nas informações constantes nas fichas de registro e laudos de exame histopatológico da amostra, os quais serão 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 corresponderão às variáveis estudadas. As informações nesta pesquisa serão 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 (Anexo A, B e C). Todos os documentos de apêndices e anexos foram apresentados diretamente ao CEP-UEPB, bem como se encontram disponibilizados na Plataforma Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Tem como objetivo geral: realizar uma análise clínica e histopatológica de adenomas pleomórficos/mioepiteliomas, carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenoide císticos, e através da imunoistoquímica analisar a expressão de CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC1 e VEGF nas lesões citadas, buscando determinar se existem alterações quali-quantitativas na expressão dessas proteínas e se essa expressão guarda relação com aspectos do comportamento biológico, quer seja, potencial de malignização nas lesões benignas e índice de apoptose e invasão tumoral nas malignas. Enquanto Objetivos Específicos busca-se: Determinar o perfil clínico e histopatológico de uma amostra de adenoma pleomórfico, mioepitelioma, carcinoma mucoepidermoide e carcinoma adenoide cístico; Analisar se existe associação entre as características histomorfológicas da amostra avaliada e a expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC1 e VEGF; Analisar se existe diferença da localização e intensidade da expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC1 e VEGF em relação ao tipo de neoplasia de glândula salivar; Determinar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC1 e VEGF e o grau histológico de malignidade do carcinoma mucoepidermoide; Analisar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica da CXCL12/CXCR4 com expressão da MMP-9 e Bcl-2 considerando a natureza benigna ou maligna da amostra avaliada; Determinar se existe associação entre a expressão imunoistoquímica de CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC1 e VEGF e o padrão histológico do Carcinoma adenoide cístico; Avaliar se a expressão imunoistoquímica da CXCL12, CXCR4 possui alguma correlação com a expressão de MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC1 e VEGF em adenomas pleomórfico e mioepiteliomas.

Endereço: Av. das Bananas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

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



Continuação do Parecer: 1435-801

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores responsáveis: Por se tratar de um estudo retrospectivo de dados clínicos, análise morfológica e imunoistoquímica de lâminas que contêm cortes de tecidos de peças cirúrgicas advindas de biópsia e excisão cirúrgica, o risco oferecido aos pacientes é mínimo, já que não há intervenção do estudo nos pacientes. Enquanto benefícios: O estudo visa analisar a expressão de CXCL12, CXCR4, MMP-9, Bcl-2, Ki-67, MUC-1 e VEGF em Adenoma pleomórfico, Mioepitelioma, Carcinoma mucoepidermoide e Carcinoma adenoide cístico, testar a possível associação dessas proteínas com o comportamento biológico das lesões. Não existe benefícios diretos sobre os participantes dessa pesquisa, mas ao final, a expressão das proteínas poderá ser utilizado como fator de prognóstico de outros pacientes acometidos com as mesmas lesões, possibilitando o diagnóstico mais fidedigno, tratamento adequado ao comportamento biológico da lesão e melhora da qualidade de vida do paciente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A presente proposta de pesquisa é de suma importância quanto papel e atribuições das Instituições de Ensino Superior (IES), mormente pesquisa (bem como extensão), estando dentro do perfil das pesquisas de construção do ensino-aprendizagem significativa, perfilando a formação profissional baseada na tríade conhecimento-habilidade-competência, preconizada pelo MEC. Portanto, tem retorno social, caráter de pesquisa científica e, contribuição na formação de profissionais da área de saúde (graduando e pós-graduados), dentre outras áreas do saber científico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos necessários e obrigatórios encontram-se presentes.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se completo, sem pendências. Diante do exposto, somos pela aprovação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Sendo o protocolo de pesquisa um conjunto de documentos contemplando a descrição de pesquisa em seus aspectos fundamentais o atual projeto, atende assim aos critérios e diretrizes da Resolução 466/12 do CNS/MS.

Endereço: Av. das Barronias, 351 - Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

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



Continuação do Parecer: 1.435.401

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_637546.pdf	16/02/2016 21:00:33		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_dissertacao.doc	16/02/2016 20:59:15	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	carta.pdf	16/02/2016 20:54:32	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_institucional.jpg	16/02/2016 20:49:04	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao_uepb.jpg	16/02/2016 20:46:07	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromisso_pesquisadores.jpg	16/02/2016 20:45:15	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito
Declaração de Pesquisadores	compromisso_coordenador.pdf	29/12/2015 03:29:26	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito
Folha de Rosto	folh_de_rosto.pdf	29/12/2015 03:21:57	JOSE MATHEUS ALVES DOS SANTOS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

CAMPINA GRANDE, 03 de Março de 2016

Assinado por:
Doralúcia Pedrosa de Araújo
(Coordenador)



Endereço: Av. das Barbas, 351- Campus Universitário

Bairro: Bodocongó

CEP: 58.109-753

UF: PB

Município: CAMPINA GRANDE

Telefone: (83)3315-3373

Fax: (83)3315-3373

E-mail: cep@uepb.edu.br

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. The journal does not usually consider papers on periodontal or related diseases. 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

All papers are handled by the editor and an associate editor and after peer review and any reject decision is final. The editors will not enter in to correspondence with authors about rejected papers.

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 manuscript 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

Systematic reviews:

A systematic review is a comprehensive high-level summary of primary research on a specific research question that attempts to identify, select, synthesise and appraise all (high quality) evidence relevant to that question. A meta-analysis uses statistical methods to quantitatively evaluate pooled data from single studies. Many pathological reviews are likely not to have sufficient data on clinical outcomes to warrant a meta-analysis.

While the content of a systematic review will be partly determined by the topic and evidence, as a minimum the review should:

- Clearly state the purpose of the review
- Determine inclusion and exclusion criteria to generate a PRISMA flowchart that includes identification of studies, screening, eligibility and inclusion data (See Liberati A, Altman DG, Tetzlaff J et al, The PRISMA statement for reporting systematic reviews and meta-analyses of studies that evaluate healthcare interventions: explanation and elaboration. *BMJ* 2009; 339: b2700)
- Determine the primary end point of the review ie. acceptance or rejection of the null hypothesis
- Clearly describe the search methodology [databases (preferably more than one), search terms]
- Describe the process of data extraction
- Undertake statistical assimilation if appropriate
- Evaluate the quality and/or risk of bias of the studies included preferably using a standard assessment tool (See Guyatt, GH, Oxman AD, Vist GE et al. GRADE: an emerging consensus on rating quality of evidence and strength of recommendations. *BMJ* 2008; 336: 924-926)
- Provide recommendations for future researches
-

Systematic reviews must be registered in the PROSPERO (International Prospective Register of Systematic Reviews) database and the registration number provided in the text.

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. Reference numbers are cited in superscript. 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 AMA style. 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 AMA 10th edition and follow below points:

- If there are more than 6 author names in a reference then first three author names are retained with 'et al.' and et al. is in roman.
- Article title in roman and sentence case.
- Journal title in italics and abbreviated with period at the end of the title only and not for all abbreviated terms.
- Semicolon used between year of publication and volume number.
- Colon used between volume number and page range.
- Full page range is used.
- End period at the end of a reference
- Place of publication is given first and then publisher name is given.
- Colon used between publisher location and publisher name.
- Year of publication is given after publisher name with semicolon separator.
- Chapter title given in roman and sentence case
- Book title given in italics and title case
- Query is raised for page range if it is not given
- Accessed date is must for websites

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

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow

Journal article: 1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book: 2. Voet D, Voet JG. *Biochemistry*. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style

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/bauthor> 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.