NELISE ALEXANDRE DA SILVA LASCANE

**Expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no
adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma
adenoide cístico das glândulas salivares**

São Paulo

2014

NELISE ALEXANDRE DA SILVA LASCANE

**Expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no
adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma
adenoide cístico das glândulas salivares**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo
para obtenção do título de Doutora em
Odontologia.

Área de Concentração: Patologia e
Estomatologia Básica e Aplicada

Orientadora: Profa. Dra. Suzana Cantanhede
Orsini Machado de Sousa

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Lascane, Nelise Alexandre da Silva.

Expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares / Nelise Alexandre da Silva Lascane; orientadora Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa. -- São Paulo, 2015.

80 p. : fig., graf., 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Adenoma pleomórfico. 2. Adenocarcinoma. 3. Neoplasias das glândulas salivares. 4. Carcinogênese bucal. I. Sousa, Suzana Cantanhede Orsini Machado de. II. Título.

Lascane NAS. Expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Aprovada em: ____ / ____ /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico a concretização deste trabalho aos meus pais, Nelson (*in memorian*) e Denise, por sempre acreditarem e me apoiarem incondicionalmente.

Aos meus tios, Ricardo e Maria Teresa, que foram meus segundos pais durante a pós-graduação, por terem feito de seu lar, o meu também.

Ao meu irmão e cunhada, Nelson e Juliana, pelo carinho e apoio.

A todos, pela compreensão e amor, sem os quais não teria chegado até aqui.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

À minha orientadora, Profa. Dra. Suzana, por me conceder a oportunidade em fazer o doutorado sob sua orientação, pela confiança em mim depositada e pelo prazer e satisfação em conviver mais de perto com um ser humano extraordinário e exemplo de profissional. Agradeço ainda, pelas palavras ditas e não ditas, experiência e paciência, com os quais nos transmite valiosos ensinamentos. Sem dúvidas, fonte de inspiração de vida, espelho profissional, não apenas para mim, como para muitos. Os meus mais sinceros agradecimentos não são suficientes para expressar quão grande é a minha gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

À Profa. Dra. Marina Helena Cury Gallottini. Exemplo de competência e liderança. Seu comprometimento com a pós-graduação serve como incentivo para trabalharmos e crescermos.

Ao Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior, guardião de um imensurável conhecimento, por mostrar que profissionalismo e alto astral podem ser peças fundamentais para o sucesso. Foi um prazer desfrutar esse período com sua presença, sempre divertido e compartilhando conhecimento.

Aos Professores da Patologia Bucal, Profa. Dra. Andrea Mantesso, Prof. Dr. Fábio Daumas, Profa. Dra. Karen Ortega e Profa. Dra. Marília Martins, pelo agradável convívio e aos ensinamentos transmitidos;

Às funcionárias Zilda, Néia e Nair, pela atenção e pela disposição em sempre nos ajudar a resolver quaisquer problemas e dúvidas;

Ao amigo Bruno Sedassari, pela fraternidade, amizade, por ser verdadeiro e com tão pouco tempo de convivência, já saber interpretar no silêncio, meus pensamentos. Com toda certeza, um dos principais responsáveis por tornar os meus dias na patologia interessantes e divertidos. É um orgulho tê-lo como amigo e posso afirmar que foi um dos melhores presentes que a patologia pôde me proporcionar;

Aos amigos da patologia, Lara Gimenez, Lourdes Chiok, Mário, Priscila Tobouti, Fernanda Pigatti, Carol Mussi pelas palavras de apoio, força e principalmente por estarem ao meu lado em todos os momentos, tornando os dias na patologia melhores;

Ao Prof. Dr. Mário Cláudio Mautoni, meu eterno professor, exemplo de profissional e pessoa, o meu incentivador acadêmico e inspiração profissional;

Aos Professores da Patologia Geral, Profa. Dra. Maria Isete Fares Franco, Profa. Dra. Luciana Corrêa e Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, pela disponibilidade, ensinamentos e sugestões no decorrer do curso;

Aos amigos da vida e familiares, Anna e João Felipe Lascane, Flávia Pasqualini, Dani Munari, Ana Lídia, Marcella e Carla Dinelli, pela compreensão e paciência com a minha ausência;

À Andréa Carvalho, pela atenção que me dispensou e paciência com que me ensinou os primeiros passos no laboratório;

Aos técnicos do laboratório, Adriana, Elisa e Juvani, pela disposição em nos assistir e colaborar com os experimentos;

Por fim, agradeço às pessoas que passaram pela minha vida no decorrer dessa caminhada, dificultando essa jornada, pois, por meio delas, me mostraram o tipo de pessoa que não quero ser.

RESUMO

Lascane NAS. Expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Os tumores de glândula salivar compreendem em torno de 2 a 6,5% dos tumores de cabeça e pescoço. Entre os tumores de glândula salivar, o adenoma pleomórfico é benigno e o mais comum. O carcinoma adenoide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau encontram-se entre os mais frequentes malignos. Jab1 é uma de muitas proteínas que afetam diversos estágios da tumorigênese sendo importante na regulação variadas vias de sinalização e/ou proteínas como p27 e AP-1, a última composta por c-jun e c-fos, que são principalmente relacionadas com o ciclo celular e proliferação celular. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico das glândulas salivares. Foi realizada análise imuno-histoquímica semi-quantitativa das células marcadas nos tumores de glândula salivar e glândula salivar normal de acordo com o escore 0 (células sem expressão), 1 ($> 0 \leq 5\%$ de células marcadas), 2 ($> 5 \leq 50\%$) and 3 ($> 50\%$). Para Jab1, c-jun e c-fos foi considerado apenas marcação nuclear e para p27, nuclear e citoplasmática, separadamente. Os resultados foram analisados utilizando-se os testes de Kruskal-Wallis, de Mann-Whitney, do Qui-quadrado e o teste de correlação de Spearman, cujo nível de significância foi de $p < 0,05$ e processados com o auxílio do software GraphPad Prisma 5.0. A análise estatística revelou que a expressão de Jab1 foi significativa no adenoma pleomórfico e no carcinoma adenoide cístico em relação aos ductos e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau em relação ao carcinoma adenoide cístico ($p=0,0136$, $0,0001$ e $0,0344$, respectivamente); a expressão de p27 nuclear foi significativa no adenoma pleomórfico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau quando comparados ao carcinoma adenoide cístico ($p=0,0074$ e $0,0004$, respectivamente) e a expressão citoplasmática em todos os grupos quando comparados aos ácinos; c-fos, a expressão foi significativa nos ductos ao compará-

los ao adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico ($p=0,0002$, $0,0048$ e $0,0352$, respectivamente). O teste de correlação de Spearman de Jab1, p27, c-jun e c-fos em cada lesão separadamente revelou que no adenoma pleomórfico houve correlação significativa entre Jab1 e p27 ($r=0,371$; $p=0,020$) e entre c-jun e c-fos ($r=0,452$; $p=0,004$). No adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, houve correlação entre Jab1 e p27 ($r=0,494$; $p=0,044$) e no carcinoma adenoide cístico, entre p27 e c-fos ($r=0,513$; $p=0,035$). Foi concluído que a tumorigênese do adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico parece estar associada à expressão de Jab1 e p27.

Palavras-chave: Jab1. p27. c-jun. c-fos. Adenoma pleomórfico. Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. Carcinoma adenoide cístico. Tumores de glândula salivar.

ABSTRACT

Lascano NAS. Immunohistochemistry expression of Jab1, p27, c-jun and c-fos proteins in pleomorphic adenoma, low grade polymorphous adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary glands [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Salivary gland tumors comprise about 2 to 6.5% of the head and neck tumors. Among the salivary gland tumors, pleomorphic adenoma is the most common and benign tumor. Adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma are the most frequent malignant tumors. Jab1 is one of many proteins which affects many stages of the tumorigenesis and regulates positively and negatively several pathways and/or proteins such as p27 and AP-1, the latter composed by c-jun and c-fos, which are mostly related to cell cycle and cell proliferation. The aim of this study was to evaluate the immunoexpression of the proteins Jab1, p27, c-jun and c-fos in pleomorphic adenoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. The semi-quantitative immunohistochemical analysis was performed in salivary gland tumors and in normal salivary gland according to the score 0 (no stained cells), 1 ($> 0 \leq 5\%$ of stained cells), 2 ($> 5 \leq 50\%$) and 3 ($> 50\%$). Nuclear immunostaining alone was considered for Jab1, c-jun and c-fos proteins and cytoplasmic and nuclear staining for p27. Results were analyzed in GraphPad Prisma 5.0 software using Kruskal-Wallis, Mann-Whitney and Chi-square tests and Spearman correlation test in which significance level was $p < 0,05$. Statistical analysis revealed that Jab1 expression was significant in pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma in relation to ducts and in polymorphous low-grade adenocarcinoma in relation to adenoid cystic carcinoma ($p=0,0136$, $0,0001$ e $0,0344$, respectively); the p27 nuclear expression was significant in pleomorphic adenoma and in polymorphous low-grade adenocarcinoma when compared to adenoid cystic carcinoma ($p=0,0074$ e $0,0004$, respectively) and cytoplasmic immunostaining was significant in all groups when compared to acini; c-fos expression was significant in ducts if compared to pleomorphic adenoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma ($p=0,0002$, $0,0048$ e $0,0352$, respectively). Spearman correlation test to Jab1, p27, c-jun and c-fos in each lesion separately revealed significant correlation

between Jab1 and p27 ($r=0,371$; $p=0,020$) and c-jun and c-fos ($r=0,452$; $p=0,004$) in pleomorphic adenoma. There was correlation between Jab1 and p27 ($r=0,494$; $p=0,044$) in polymorphous low-grade adenocarcinoma and between p27 and c-fos ($r=0,513$; $p=0,035$) in adenoid cystic carcinoma. In conclusion, tumorigenesis in pleomorphic adenoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma seems to be associated to expression of Jab1 and p27.

Keywords: Jab1. p27. c-jun. c-fos. Pleomorphic adenoma. Low grade polymorphous adenocarcinoma. Adenoid cystic carcinoma. Salivary gland tumors.

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AP	Adenoma pleomórfico
AP-1	Proteína de ativação 1
APBG	Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau
BSA	Albumina de soro bovino
CAC	Carcinoma adenoide cístico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CSN5	Signalossomo COP9 subunidade 5
CXAP	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HE	Hematoxilina e eosina
kDa	Kilodalton
Jab1	Proteína 1 ligada ao domínio de ativação Jun
OMS	Organização Mundial de Saúde
pH	Potencial hidrogeniônico
Ser	Serina
Thr	Treonina
Tyr	Tirosina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO	18
2.2 ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU	19
2.3 CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO	20
2.4 JAB1 E SUA RELAÇÃO COM P27, C-JUN E C-FOS	21
2.4.1 Jab1	21
2.4.2 Jab1 e p27	23
2.4.3 c-jun	25
2.4.4 c-fos	26
3 PROPOSIÇÃO	29
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 AMOSTRA	32
4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO	33
4.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO	33
4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA	33
4.5 ANÁLISE DE DADOS	35
4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA	35
5 RESULTADOS	37
5.1 DADOS CLÍNICOS	38
5.2 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	40
5.2.1 Jab1	40
5.2.2 p27	42
5.2.3 c-jun	45
5.2.4 c-fos	46
6 DISCUSSÃO	55
6.1 DADOS CLÍNICOS	56
6.2 JAB1	57
6.3 P27	59
6.4 C-JUN	61

6.5 C-FOS	62
7 CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	66
ANEXO	76

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de glândula salivar compreendem cerca de 2 a 6,5% dos tumores de cabeça e pescoço (1, 2). Ainda que aparentem uma alta casuística, os tumores de glândula salivar são considerados raros. Há uma diversidade enorme desses tumores e estudos são escassos, principalmente no que concerne sua patogênese, sendo assim, a tumorigênese permanece obscura.

Este grupo de tumores é mais frequente entre a quarta e sétima décadas de vida e as mulheres são as mais acometidas. De longe, a glândula parótida é o sítio anatômico mais acometido seguido pelo palato. Entre os tumores de glândula salivar, o adenoma pleomórfico (AP) é o tumor mais comum e benigno. O carcinoma mucoepidermoide (CME) é o mais frequente maligno seguido pelo carcinoma adenoide cístico (CAC) e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG) (1, 2).

Embora o AP seja benigno e de crescimento lento, acredita-se que muitos carcinomas ex-adenoma pleomórfico (CXAP) sejam resultado do acúmulo de instabilidade genética em um duradouro AP (2-6). O APBG é um tumor maligno porém de baixo grau de malignidade com rara emissão de metástase (1, 2). Em contrapartida, em relação ao CAC, a literatura evidencia dados de maior frequência relacionados à metástase linfonodal e à distância (7-10).

Atualmente, as pesquisas tem buscado a possibilidade de se oferecer tratamento mais individualizado para obtenção de um melhor prognóstico e sobrevida e desse modo, a instituição de terapias-alvo tem sido foco de muitos estudos.

Jab1 (proteína 1 ligada ao domínio de ativação Jun) é uma de muitas proteínas que afetam estágios da tumorigênese e consequentemente, pode ser considerada um alvo terapêutico. Essa proteína regula positiva e negativamente diversas vias de sinalização, como por exemplo, proteína de ativação 1 (AP-1) e p27, as quais são principalmente relacionadas à proliferação e ciclo celular (11, 12).

AP-1 é formada por membros da família de proto-oncogenes Jun e Fos, como c-jun e c-fos respectivamente, embora pareçam ativar genes alvos diferentes. c-jun é o principal component de AP-1 e tem papel na proliferação e diferenciação celular. Jab1 interage com c-jun e potencializa seletivamente sua transativação

enquanto que c-fos converte sinais extracelulares em mudanças na expressão gênica (13-18).

Além disso, Jab1 também se liga a p27, induzindo à exportação nuclear e sua subsequente degradação. Jab1 promove proliferação celular e inativa p27, translocando-a do núcleo ao citoplasma. Ainda, p27 pode quebrar o ciclo celular em qualquer fase, especialmente G1(19-22).

Neste trabalho, propusemo-nos a avaliar a expressão imuno-histoquímica em tumores com origem de glândula salivar de comportamentos biológicos distintos, AP, APBG e CAC, das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos, buscando determinar se há participação importante destas proteínas na carcinogênese de glândula salivar.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

Os tumores de glândula salivar compreendem cerca de 2 a 6,5% dos tumores de cabeça e pescoço (1). Entre eles, o adenoma pleomórfico (AP) é o mais comum, seguido pelo cistoadenoma papilar linfomatoso (tumor de Warthin). Quanto às neoplasias malignas, a maioria das séries referem como sendo o carcinoma mucoepidermoide o tumor mais frequente, seguido pelo carcinoma adenoide cístico (CAC), sendo este o mais comum em pacientes britânicos (2). Entretanto, o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG) é considerada a segunda neoplasia mais comum de glândula salivar intra-oral (2), sendo o palato, o sítio anatômico mais acometido entre estes. A glândula parótida é a localização mais frequente acometida pelos tumores de glândula salivar, incluindo tanto as glândulas maiores como menores.

2.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO

O AP é uma neoplasia benigna e representa cerca de 60% das neoplasias de glândula salivar, sendo a glândula parótida a mais acometida (80%), seguida pela glândula submandibular e glândulas salivares menores, correspondendo a 10% cada. Entre as glândulas menores, o palato é o sítio de maior frequência, sendo o duro mais acometido que o mole, seguido pela mucosa jugal e lábio superior. Há uma discreta predileção pelas mulheres, numa proporção de 1,3:1 e envolvendo em média, a quinta década de vida (1-3, 23) .

Seu crescimento é lento e indolor, frequentemente apresentando-se como uma lesão única, total ou parcialmente encapsulada. A ausência de cápsula ou ainda, seu parcial desenvolvimento ocorre principalmente em lesões que se originam em glândulas menores. Em casos de recidiva, os APs geralmente apresentam-se multilobulados. Histologicamente, exibe grande diversidade morfológica, entre células epiteliais e mioepiteliais; e, ainda, elementos estromais ou mesenquimais. O componente epitelial inclui tipos celulares, tais como células cuboidais, basaloides, pavimentosas, fusiformes, plasmocitoides, claras, oncocitoides. Raramente, tipos

celulares como células sebáceas, mucosas e serosas são encontrados. As estruturas ductiformes frequentemente exibem material eosinofílico no seu interior. Ainda, metaplasia escamosa e pérolas córneas podem ser observadas, tanto nos ductos como em lençol de células. As estruturas ductais podem apresentar uma camada de células abluminais de células mioepiteliais ou apresentar citoplasma claro e núcleo hipercromático, por vezes, angulado. Já as células mioepiteliais, podem exibir padrão reticular ou em lençol de células fusiformes em palisada e menos comumente, células plasmocitoides ou hialinas. O mesênquima/estroma pode ser mucoide/mixoide, cartilaginoso ou hialinizado, bem como apresentar metaplasia óssea. A deposição hialina é uma característica marcante em APs. Mitoses e necrose são raras, exceto em casos em que houve manipulação prévia por biópsia ou punção (1, 2).

O tratamento de escolha é a excisão cirúrgica, entretanto alguns autores consideram a realização de margem de segurança em casos que apresentam células morfológicamente atípicas. Há diversos trabalhos que relatam recorrência e transformação maligna do AP. Em glândulas salivares menores, a recorrência é rara, mas um estudo meta-analítico, observou 3,4% de recorrência em 5 anos e 6,8% em 10 anos, em parótida, com variação de 1 a 50%. Conceitualmente, o carcinoma ex-adenoma pleomórfico (CXAP) origina-se em ou a partir de um AP e, embora sua patogênese seja incerta, acredita-se que muitos CXAP resultem do acúmulo de instabilidades genéticas em um duradouro AP. O CXAP compreende 3,6% de todos os tumores de glândula salivar e seu diagnóstico é definido quando do achado do AP junto com o carcinoma ou do histórico de ressecção de um AP prévio na mesma localização (2, 4-6, 24).

2.2 ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade é uma neoplasia de glândula salivar caracterizada por um crescimento lento e raramente associado à metástase. Acomete principalmente as glândulas salivares menores sendo 60% em palato, seguido por mucosa jugal e lábio superior. A proporção entre mulheres e homens é de 2:1 com pico de incidência entre os 50 e 70 anos (1, 2, 25).

Clinicamente, pode aparecer como uma massa indolor, entretanto, há casos sintomáticos. Ainda, sangramento, teleangiectasia e ulceração podem estar presentes. Histologicamente é caracterizado por uniformidade citológica e padrão de crescimento infiltrativo. As células são pequenas e morfologia uniforme, núcleos ovais e vesiculados. O APBG apresenta uma variedade de subtipos histológicos, sendo os principais lobular, papilar ou cístico-papilar, cribriforme e trabecular. De um modo geral, sua arquitetura apresenta estruturas lobulares cujo lúmen é formado por uma camada única de células cuboidais, e com certa frequência, exhibe arranjo enfileirado e concêntrico (alvo-símile). Seu principal diagnóstico diferencial histopatológico é o carcinoma adenoide cístico (CAC). Apesar de sua aparente inocuidade, o APBG invade os tecidos adjacentes e é encapsulado. Neurotropismo e invasão óssea também podem ser vistos (2).

2.3 CARCINOMA ADENOIDE CÍSTICO

O CAC representa cerca de 10% dos carcinomas de glândula salivar (1, 23, 26). Sua localização mais frequente é a glândula parótida, seguida pelas glândulas menores – palato, língua, mucosa jugal e assoalho (1, 27). Sua incidência se dá por volta da quinta e sexta décadas de vida (1, 3, 27) com leve predileção pelo sexo feminino, numa proporção de 1,3:1 (3, 27, 28).

O CAC é uma neoplasia maligna de origem epitelial composta por células epiteliais e mioepiteliais modificadas. Histologicamente, trata-se de um tumor basaloide, composto por células que apresentam, ora fenótipo epitelial ora mioepitelial. As epiteliais (ductais), morfologicamente, são cuboidais ou colunares, núcleo arredondado, nucléolo pequeno e citoplasma moderadamente eosinofílico. Já as mioepiteliais, são menores e apresentam núcleo angular hiper cromático ou poligonal e muitas vezes citoplasma claro (28, 29). O CAC possui 3 padrões morfológicos distintos: tubular, cribriforme e sólido, entretanto os 3 padrões podem coexistir no mesmo tumor e o diagnóstico é dado pelo mais predominante (28), sendo o subtipo sólido considerado o de pior prognóstico (30-32).

Há na literatura relato de que o subtipo sólido/grau III tem maior probabilidade de metástase linfonodal (7, 8) e à distância (9, 10), embora se encontre dados que

sugerem que seja improvável metástase linfonodal (por volta de 5%) do CAC e que sua graduação parece ter efeito limitado (10). Amit et al., 2014, sugerem que se realize esvaziamento cervical como tratamento eletivo em CACs de cavidade oral devido à alta incidência encontrada, em seu estudo, de metástases linfonodais ocultas (33).

Além do padrão histológico e sua associação com metástase, invasão perineural e angiolinfática são considerados fatores prognósticos do CAC, mostrado por diversos estudos (9, 10, 34, 35).

Estudos, em nível proteico e molecular, são amplamente utilizados na pesquisa em diversos tipos de neoplasias. Atualmente, a compreensão do comportamento biológico bem como o prognóstico dos tumores são dois dos muitos elementos pesquisados. Moléculas de adesão, proteínas relacionadas à proliferação celular, apoptose, entre outras características tem sido estudadas em neoplasias de glândula salivar.

2.4 JAB1 E SUA RELAÇÃO COM P27, C-JUN E C-FOS

2.4.1 Jab1

O gene humano Jab1/CSN5 (proteína 1 ligada ao domínio de ativação Jun/signalossomo COP9 subunidade 5) é localizado no cromossomo 8q13.2 e a proteína de mesmo nome, consiste de 334 aminoácidos e possui massa molecular de 58 kDa (36, 37).

Jab1/CSN5 associado a CSN é localizado primariamente no núcleo, enquanto que sua forma livre pode ter presença tanto citoplasmática como nuclear (19, 38).

Poucas proteínas parecem regular os níveis, localização e atividade de Jab1. Entre elas, psoriasina (S100 A7), cuja superexpressão aumenta a atividade nuclear de Jab1, que resulta no aumento da atividade de AP-1 e reduz a expressão de p27. A mesma proteína foi altamente expressa em tumores de mama, melhorando a atividade de Jab1 e promovendo a tumorigênese. Outra proteína é o receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER-2), que aumenta a expressão de

Jab1 através da via do AKT. Ainda podem ser citados os fatores de transcrição 4 (TCF-4), a β -catenina, receptor γ ativado por proliferador de peroxissoma (PPAR γ) Foi observado ainda que, o tratamento com wortmannin (metabólito similar à fosfatase homóloga à tensina (PTEN)), inibidor da via PI3K/AKT, reduz a expressão de Jab1(39-41).

Por outro lado, Jab1 se liga a uma grande quantidade de proteínas, as quais acabam resultando em proliferação celular, sobrevivência celular e em alguns casos, angiogênese e invasão (42, 43).

A figura 2.1 esboça grande parte dessas interações que agem regulando positiva ou negativamente a proteína Jab1. Em cores, as que fazem parte deste estudo.

Figura 2.1 - Seta indica regulação positiva; traço indica regulação negativa ou bloqueio. Abreviação: AP-1: proteína ativadora 1. Adaptado e modificado de Shackelford, Claret (11).

Jab1 foi originalmente identificada como um co-ativador do fator de transcrição AP-1, formado pelos proto-oncogenes Jun e Fos, envolvidos no controle da proliferação celular (13).

Embora c-jun e c-fos, membros da família Jun e Fos respectivamente, tenham ligações de DNA (ácido desoxirribonucleico) e domínios de dimerização muito similares, eles parecem ativar genes alvos diferentes (14, 15).

Sabe-se que Jab1 interage com c-jun, estimulando sua atividade e potencializando seletivamente sua transativação (13).

2.4.2 Jab1 e p27

Jab1 também se liga a p27 e induz sua exportação do núcleo e subsequente degradação. O gene p27 ou Kip1 localiza-se no cromossomo 12p13 e sua proteína, p27, assim como a p21 e a p57, pertence à família das CIP/kip (proteínas inibitórias das ciclinas), sendo assim, através de sua ligação a sítios específicos das moléculas de ciclina, inibe a ação dos complexos ciclinas-CDK, podendo interromper o ciclo celular em qualquer fase, especialmente G1 (19-22).

A p27, além de estar relacionada com a regulação do ciclo celular, está envolvida na transdução de sinal, proliferação, diferenciação, apoptose e adesão celular. A atividade de p27 depende de seus níveis e de sua localização celular: sua função inibitória está associada à sua localização nuclear e atua como uma proteína antiproliferativa, porém, quando no citoplasma, promove aumento da motilidade celular e reorganização dos filamentos de actina regulada pela GTPase, favorecendo a metastatização (44, 45). Quanto aos níveis de p27, parecem aumentados nas células quiescentes quando comparados às células proliferativas (46, 47).

A proteína p27 é regulada através da fosforilação em variados sítios: a ciclina E/CDK2 fosforila no sítio treonina (Thr) 187, a via do AKT, nos sítios Thr 157 e 198 e SRC em tirosina (Tyr) 74 e 88; a primeira fosforila durante a fase tardia de G1 e precoce de S, levando por fim, à degradação de p27, a segunda, impede a importação nuclear de p27, ficando acumulada no citoplasma e a última, resulta em menos p27 nuclear, acumulando a proteína no citoplasma. Essa regulação por meio do transporte de p27 do núcleo ao citoplasma tem sido recentemente muito estudada. Para poder inibir a atividade das CDKs, p27 precisa estar localizada em

núcleo. Alvo de nosso trabalho, a proteína Jab1 participa da degradação de p27 via sistema ubiquitina-proteossoma (48-51).

Jab1 promove a proliferação celular e inativa p27 por induzir a translocação da mesma do núcleo ao citoplasma, acelerando a degradação. Diversas pesquisas estudaram a Jab1 e sua associação com p27, incluindo neoplasias de origem epitelial, sarcomas (52, 53) e doenças hematológicas (54, 55). Identificaram que a expressão de Jab1 é inversa à expressão de p27 em carcinoma epidermoide de boca (56-58), de laringe (59), de esôfago (60), carcinoma nasofaríngeo (61) e ainda, outras localizações que não na região de cabeça e pescoço, como em carcinoma de mama (16, 62, 63), de ovário (64, 65), adenocarcinoma de pâncreas (17, 66), entre outros (67). A superexpressão de Jab1 nessas neoplasias foi igualmente associada a um pobre prognóstico.

Wang et al. (63) identificaram que Jab1 apresentou baixa expressão nuclear no tecido mamário normal adjacente, ao passo que, sua expressão foi aumentada no carcinoma de mama. Outro estudo, realizado com carcinoma hepatocelular, os autores observaram que Jab1 foi expresso tanto em núcleo como no citoplasma das células neoplásicas, embora essa expressão tenha sido considerada fortemente expressa apenas no núcleo das células da neoplasia; e p27, obteve apenas expressão nuclear, sendo forte no tecido hepático sem tumor e fraca, no carcinoma (67).

A p27 foi estudada em neoplasias de glândula salivar com maior ênfase nos CACs. O estudo de Akrish, Ben-Izhak, Peled, (68) além de identificar alta expressão da proteína no APBG, identificou no CAC, entretanto diversos outros estudos mostraram baixa expressão no CAC (69-72). Em contrapartida, o AP mostrou alta expressão da p27 (68, 71, 72). Outro dado identificado por Takata et al. (71). foi que nos CACs em que os níveis de expressão foram menores, houve metástase.

Ito et al. (73) relataram que a expressão de p27 nos APs foi preservada, assim como em tecidos normais da boca, como glândulas salivares e epitélio da mucosa, o que não ocorrera nos carcinomas mucoepidermóides.

O resultado do estudo de Ben-Izhak et al. (74) sugere que neoplasias de glândula salivar com expressão de p27 menor de 50% demonstram comportamento biológico mais agressivo, assim como metástase linfonodal, acometimento extracapsular aumentado. Dentro desse parâmetro, o APBG e o CAC, apresentaram 1 de 5 casos e 1 de 7, respectivamente.

Além disso, foi observada metilação de p27 em 26,5% (9 de 34) (75) e em 2 de 17 (76) dos casos estudados, este último estudo apresentando apenas um deles com perda de expressão da proteína e, portanto, sem relação entre metilação e expressão.

Quanto ao subtipo histológico do CAC, Shahsavari et al. e Takata et al. identificaram maior expressão de p27 nos subtipos tubular, cribriforme e sólido nessa ordem, embora não tenha sido possível estabelecer relação entre a graduação histológica com a expressão da proteína (71, 72).

2.4.3 c-jun

JUN localiza-se no cromossomo 1p32-p31 e sua expressão proteica é constituída por 334 aminoácidos, possuindo quatro domínios, envolvidos na ligação ao DNA, transcrição e dimerização. JUN foi originalmente isolada a partir do vírus do sarcoma de aves 17 e, portanto, c-jun corresponde à forma celular da versão viral oncogênica, v-jun (77, 78).

A proteína c-jun, da família Jun (além de junD e junB), é codificada por um proto-oncogene, atuando como um regulador positivo do ciclo celular por meio de outras vias de sinalização, como a MAPK e AKT, que bloqueia atividade de p27. A c-jun forma o principal componente de AP-1, importante, além da proliferação, na diferenciação celular, sendo assim, ao ser bloqueada, inibe a proliferação e induz à apoptose (16, 17, 79).

C-jun, além de ser regulada positivamente por Jab1, o que faria aumentar seus níveis de expressão e promover a tumorigênese, é também regulada por diversas outras proteínas. Foi observado que c-jun está presente nas células na forma fosforilada nos sítios de inibição de ligação ao DNA. Ao sofrer estímulos, como mitogênicos, oncogênicos, fator de crescimento, entre outros, c-jun fosforila nesses sítios e aumenta sua atividade de ligação ao DNA (80).

Essa proteína é fosforilada nos resíduos serina (Ser) 63 e 73, Thr 231 e Ser 243 e 249, ocorrendo aumento de sua estabilidade e potencial de transativação nas duas primeiras; e, inibe a ligação ao DNA, nas últimas pela GSK3. E, mediada por

JNK, c-jun fosforila nos resíduos Thr 91 e 93, estimulando a atividade de transcrição (77, 80).

2.4.4 c-fos

c-fos é um proto-oncogene que é o homólogo humano do oncogene retroviral v-fos. É parte da família Fos de fatores de transcrição que inclui, além de c-fos, FosB, Fra-1 e Fra-2 e outras variantes menores. c-fos codifica proteína constituída de 380 aminoácidos que forma heterodímero com c-jun, resultando na formação do complexo AP-1 que liga o DNA a sítios específicos de AP-1 em regiões de genes alvos e converte sinais extracelulares em mudanças na expressão gênica (18, 81).

A atividade de c-fos é modulada por modificações pós-translacionais. c-fos fosforila pela ação de MAPK, cdc2, PKA ou PKC, os quais influenciam a estabilidade proteica, atividade de ligação ao DNA e o potencial de transativação dos fatores de transcrição (81, 82).

Os membros da família Fos não são capazes de formar homodímeros, mas formam heterodímeros com parceiros da família Jun. Os heterodímeros JUN-FOS são mais estáveis e possuem atividade de ligação de DNA mais fortes que os JUN-JUN. Um estudo com cultivo de células de teratocarcinoma, observou-se que c-fos melhorou as propriedades de transativação e transformação de c-jun e junB. Sendo assim, sugere-se que a expressão das proteínas da família FOS pode ser crucial para a atividade de regulação dos genes de AP-1 (81, 83, 84).

O fator de transcrição AP-1 foi estudado em diversos tumores (77), inclusive de origem epitelial, como carcinoma de útero, de pele, mama, próstata, epidermoide de boca (85, 86).

A expressão e atividade de c-jun tem sido detectada em diversos tumores, como o aumento de expressão no carcinoma de pulmão e no epidermoide de boca (87, 88), assim como foi identificada superexpressão em cânceres de próstata e mama (89, 90).

Em epitélio alveolar normal, c-jun não foi expressa, em contrapartida, em 31% dos tumores primários e metastáticos de pulmão, houve expressão da proteína,

sugerindo que c-jun estivesse alterada nos eventos iniciais da carcinogênese pulmonar (87).

Estudos relacionados à carcinogênese oral também sugerem que c-jun e c-fos tenham participação nesse processo. Estudo realizado por Sousa et al. (91) identificou que no epitélio da mucosa normal, a proteína c-jun foi expressa no citoplasma das células das camadas mais superiores ao passo que no carcinoma epidermoide, sua expressão foi nuclear. Quanto à c-fos, observaram que a proteína foi expressa no núcleo das células, tanto de mucosa normal como de carcinoma epidermoide de boca, entretanto houve variação entre as camadas epiteliais da mucosa e grau de diferenciação da neoplasia.

Outro estudo evidenciou maior expressão de acordo com o grau da displasia e aumentada nos carcinomas epidermóides. Foi realizada comparação entre leucoplasia (com displasia de leve a intensa) e carcinoma epidermoide, utilizando como controle mucosa oral normal (todas as amostras eram provenientes de língua). Os autores sugeriram que c-jun e c-fos tenham participação na transformação da mucosa oral. Como resultado identificaram maior expressão de c-jun e c-fos nos carcinomas epidermóides. Embora c-jun não tenha apresentado expressão nuclear na mucosa normal, c-fos apresentou expressividade nuclear em mucosa normal num meio termo entre displasia moderada a intensa e carcinoma epidermoide (92).

Em câncer de próstata, a superexpressão de c-jun ocorreu em doença avançada e foi associado com recorrência enquanto que altos níveis de c-fos foram associados apenas à doença avançada (89)

Embora haja diversas neoplasias de glândula salivar, selecionamos o AP, APBG e CAC, por serem mais frequentes e seu comportamento biológico bastante explorado, nesse sentido podemos ressaltar que o AP é uma neoplasia benigna com rara transformação maligna, o APBG, neoplasia maligna de baixo grau de malignidade e emissão de raras metástases e o CAC, com maior probabilidade de emissão de metástases (Figura 2.2).

Figura 2.2 – Esquema ilustrando em síntese, a agressividade dos tumores.

Ainda que essas proteínas tenham sido estudadas em diversas neoplasias de origem epitelial, neoplasias de glândula salivar não foram objeto de estudo com a utilização de Jab1, p27, c-jun e c-fos, com a técnica de imuno-histoquímica, à exceção da p27.

3 PROPOSIÇÃO

Verificar a expressão imuno-histoquímica das proteínas Jab1, p27, c-jun e c-fos no adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico;

Comparar a expressão de cada proteína separadamente em relação às diferentes neoplasias estudadas;

Avaliar a possível associação das proteínas investigadas em cada neoplasia separadamente.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP: 367.060, ANEXO A) e desenvolvido no Laboratório de Anatomia Patológica da disciplina de Patologia Bucal da FOUSP.

4.1 AMOSTRA

Primeiramente, foi realizado cálculo amostral e o teste Exato de Fisher com 80% de confiabilidade. Devido à inexistência de trabalhos com tumores de glândula salivar e as proteínas estudadas com a técnica de imuno-histoquímica, o cálculo foi realizado entre tumores de origem glandular não salivar. O estudo selecionado foi realizado com adenocarcinoma pancreático e amostra de tecido adjacente pancreático normal com a técnica de imuno-histoquímica (17). Como o resultado desse cálculo sugeriu uma grande quantidade de tumores a serem utilizados neste estudo, sendo 41 casos para cada lesão e 18 para amostra controle, optamos por utilizar todos os casos encontrados no arquivo (Laboratório de Anatomia Patológica da FOUSP), no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2013.

Foram obtidos 39 casos de adenoma pleomórfico, 17 de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e 17 de carcinoma adenoide cístico (apenas um era do subtipo sólido), todos de glândula salivar. As lesões foram analisadas histomorfologicamente com cortes de 5µm de espessura corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE) a partir de material fixado em formalina a 10% e embocado em parafina, e revisadas a fim de confirmar o diagnóstico das lesões estudadas segundo a última classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS) (2).

Foram incluídos no estudo ainda, 12 espécimes de glândula salivar com aspecto de normalidade adjacentes aos tumores utilizados.

Além disso, foram coletados dados clínicos referentes à localização do tumor, idade e sexo do paciente.

4.2 CRITÉRIO DE INCLUSÃO:

Lesões com diagnóstico confirmado de adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico, com origem em glândula salivar e que apresentassem blocos de parafina em bom estado de conservação.

4.3 CRITÉRIO DE EXCLUSÃO:

Casos com material insuficiente para confirmação de diagnóstico e para realização de todas as reações com as proteínas utilizadas neste estudo.

4.4 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Cortes de 3µm de espessura foram obtidos dos espécimes emblocados em parafina e estendidos em lâmina de vidro previamente tratadas com solução de 3-aminopropiltrietoxilano (Sigma St. Louis, MO, USA) 20% em etanol absoluto.

Estes cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro por 30 minutos e o outro por 15 minutos. Em seguida, procedeu-se à reidratação dos cortes em série de etanol com concentrações descendentes (3 vezes em etanol absoluto, 1 vez em etanol 95%, 1 vez em etanol 90%, 1 vez em 85% e outra 80%) em banhos de 3 minutos cada. Para remoção do pigmento formólico, foi realizado um banho de 5 minutos em hidróxido de amônio 10%, seguido de lavagem em água destilada por 5 minutos.

A seguir foi realizada a recuperação antigênica por 30 minutos em banho-maria a 95°C e após, o resfriamento até temperatura ambiente com lavagem em água destilada por 5 minutos.

Os cortes foram submetidos ao bloqueio da peroxidase endógena tecidual com solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes e metanol na proporção de 1:1

em 2 banhos de 15 minutos cada. Posteriormente, foram realizadas 2 lavagens em solução tampão TRIS (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,6 por 5 minutos cada. Incubação de BSA (albumina de soro bovino) 1% por 30 minutos para bloqueio de sítio inespecífico. Em câmara úmida, foi incubado, manualmente, o anticorpo primário diluído em BSA 1%, conforme Quadro 4.1. Após esse período, realizou-se 2 banhos em solução tampão TRIS, pH 7,6, por 5 minutos cada.

Utilizou-se a incubação com polímero (EnVision®+ Dual Link System-HRP, Dako, Carpinteria, CA, USA), por 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, 2 banhos com tampão TRIS pH 7,6 por 5 minutos cada. A revelação da reação foi feita com o cromógeno diaminobenzidina (DAB, 3,3- diaminobenzidina, Dako North America, Inc.®, Carpinteria, CA, USA). Os cortes foram então lavados em água corrente por 5 minutos e contra-corados com Hematoxilina de Mayer por 5 minutos. Posteriormente, lavados novamente em água corrente por 5 minutos.

A seguir, as lâminas foram desidratadas em uma série de etanol em concentrações crescentes (70%, 75% e 80% com banhos de passagem e 3 minutos cada em 85%, 90%, 95%, sendo 3 banhos no absoluto), e diafanizadas 2 vezes em xilol em banhos de 3 minutos. Por fim, as lâminas foram montadas por sistema automatizado (Tissue-Tek® Film® Coverslipper).

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
Jab1	Santa Cruz	Policlonal	1:200	Ácido cítrico pH 6,0	1 hora
		Coelho			
p27 ^{KIP1}	Abcam	Monoclonal	1:100	Ácido cítrico pH 6,0	1 hora
		EPFHCR16			
		Camundongo			
c-jun	Santa Cruz	Policlonal	1:200	Ácido cítrico pH 6,0	Overnight
		Coelho			
c-fos	Santa Cruz	Policlonal	1:100	Ácido cítrico pH 6,0	1 hora
		Coelho			

Quadro 4.1 – Especificações dos anticorpos utilizados.

4.5 ANÁLISE DE DADOS

As lâminas foram observadas em microscópio óptico de luz com aumento final de 400X, sob um foco fixo e clareza de campo por 2 observadores e quando houve discordância, uma análise conjunta de ambos foi realizada. Foram consideradas positivas, as células que expressaram coloração castanha no citoplasma e/ou no núcleo. A análise foi realizada em duas etapas: Na primeira, foi observada a presença ou ausência de marcação nuclear ou citoplasmática, para cada proteína, em cada lâmina. Estes dados foram apresentados na forma de números absolutos e percentuais de casos negativos ou positivos (no núcleo ou no citoplasma), de cada proteína estudada (Jab1, p27, c-jun e c-fos), em cada grupo experimental (neoplasias e controle). A segunda análise foi semiquantitativa, observando-se o corte como um todo, excluindo as margens, obedecendo à graduação da quantidade de células marcadas em cada lâmina, sendo atribuído um dos seguintes escores: 0 = sem positividade; 1 = até 5% das células positivas; 2 = de 5% a 50% das células positivas e 3 = acima de 50% das células positivas. Houve ainda uma subclassificação quanto à localização da imunorreatividade celular, se citoplasmática ou nuclear, sendo que apenas para a p27 considerou-se citoplasma e núcleo e para as outras proteínas, apenas marcação nuclear. Nesta avaliação, os dados foram apresentados como mediana dos escores das lâminas de cada proteína estudada (Jab1, p27, c-jun e c-fos), em cada grupo experimental.

Ainda, apenas em relação ao CAC, a análise da imunomarcação foi observada se, em áreas sólidas ou em áreas tubulares/cribriformes da neoplasia.

As imagens obtidas foram capturadas com vídeo-câmera de alta resolução (AxioCam®, Carl Zeiss MicroImaging GmbH, Germany) e transmitidas para um monitor de vídeo de 15 polegadas do Departamento de Estomatologia da FOU SP.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para a análise estatística foram incluídos os dados clínicos quanto à idade, sexo e sítio anatômico. Estes dados foram descritos através de suas respectivas

frequências relativas e absolutas. Além disso, a idade também foi apresentada na forma de média, mediana e porcentagem.

O estudo imuno-histoquímico foi analisado de duas formas: O teste não-paramétrico do Qui-quadrado foi utilizado para comparar o dados percentuais de casos positivos e negativos, obtidos a partir da primeira avaliação do estudo imuno-histoquímico (ver item 4.5 de análise de dados). O teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido do teste de Mann-Whitney, foram utilizados para comparar os dados semiquantitativos, referentes às medianas, obtidas a partir da segunda avaliação do estudo imuno-histoquímico (ver item 4.5 de análise de dados). O teste de correlação de Spearman foi utilizado para avaliar a presença ou ausência de correlação significativa entre as diferentes proteínas avaliadas neste estudo, dentro de cada grupo experimental, separadamente. Adicionalmente, o teste não-paramétrico do Qui-quadrado também foi utilizado para análise dos percentuais referentes à distribuição por faixa etária dos tumores estudados.

Em todos os testes, utilizou-se o nível de significância de 5%, onde $p < 0,05$ foi utilizado para indicar significância estatística. Os resultados obtidos foram processados com o auxílio do software GraphPad Prisma 5.0.

5 RESULTADOS

5 RESULTADOS

5.1 DADOS CLÍNICOS

Dos 39 casos de adenoma pleomórfico analisados neste trabalho, 27 eram mulheres e 12 eram homens, representando uma proporção de 2,25:1, com idades variando de 11 a 80 anos, sendo a média 41,3 anos e a mediana 39,5 anos. A idade não foi informada em 9 casos. O palato foi o sítio anatômico mais acometido representado por 24 casos (61,6%), seguido pela glândula parótida com 7 casos (18,1%), lábio superior 4 (10,1%), glândula submandibular 3 (7,6%) e 1 (2,6%) caso em mucosa jugal.

Em relação ao adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, dos 17 casos, 14 eram mulheres e apenas 3 homens (4,6:1), com idades variando de 11 a 78 anos, com média de idade de 52,1 anos e mediana de 58 anos. O sítio anatômico mais acometido foi o palato com 9 casos (53%), seguido pela mucosa jugal com 5 casos (30%) e lábio superior com 3 (17%).

Quanto ao carcinoma adenoide cístico, dos 17 casos estudados, 9 eram mulheres e 5 eram homens (1,8:1), sendo 3 casos com ausência dessa informação. A idade variou dos 20 aos 73 anos, com média de idade de 51,2 anos e mediana de 53 anos. A idade não foi informada em 5 casos. A localização com maior frequência foi o palato com 5 casos (35,65%), seguido com 2 casos cada (14,30%), região retromolar, assoalho de boca e fundo de sulco e 1 caso cada (7,15%), glândula parótida, maxila e rebordo. Três casos não continham informação quanto ao local acometido.

O teste do Qui-quadrado utilizado para análise dos percentuais referentes à distribuição por faixa etária dos tumores estudados não apresentou significância estatística.

Os resultados, representados na forma de porcentagem, em relação à faixa etária e aos sítios anatômicos mais acometidos, podem ser visualizados no gráfico 5.1 e gráfico 5.2, respectivamente.

Gráfico 5.1 – Distribuição das neoplasias de glândula salivar segundo faixa etária. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

Gráfico 5.2 - Distribuição das neoplasias de glândula salivar segundo sítio anatômico. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

5.2 EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foram consideradas positivas, as células neoplásicas com expressão nuclear para Jab1, c-jun e c-fos e nuclear e citoplasmática para p27, assim como nuclear para ácinos e ductos de glândulas salivares com aspecto de normalidade.

O quadro 5.1 exhibe os dados referentes à mediana e variação dos escores, bem como seu *status* de significância das proteínas em relação aos grupos estudados.

GRUPOS EXPERIMENTAIS	Jab1	p27 núcleo	p27 citoplasma	c-jun	c-fos
Glândula salivar (ácinos)	3 (0;3)	0 (0;3)	2,5 (0;3)	0 (0;0)	0 (0;2)
Glândula salivar (ductos)	3 (2;3)	0 (0;3)	0 (0;0) ^c	0 (0;0)	1,5 (0;3)
Adenoma Pleomórfico	2 (0;3) ^a	2 (0;3) ^b	0 (0;3) ^c	0 (0;2)	0 (0;2) ^a
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	2 (0;3) ^b	2 (0;3) ^b	0 (0;2) ^c	0 (0;0)	0 (0;3) ^a
Carcinoma adenoide cístico	1 (0;2) ^a	0 (0;2)	0 (0;3) ^c	0 (0;1)	0 (0;3) ^a

Quadro 5.1 - Kruskal-Wallis e pós-teste de Mann Whitney. Dados expressos em mediana (mínimo e máximo). ^asignifica diferença estatística em relação ao ducto; ^bsignifica diferença estatística em relação ao CAC; ^csignifica diferença estatística em relação ao ácino. ^{a,b e c} significa $p < 0,05$.

A análise estatística revelou que a expressão de Jab1 foi significativa no AP e no CAC em relação aos ductos e o APBG em relação ao CAC; a expressão de p27 nuclear foi significativa no AP e no APBG quando comparados ao CAC e a citoplasmática em todos os grupos quando comparados aos ácinos; c-fos, a expressão foi significativa nos ácinos ao compará-los ao AP, APBG e CAC e c-jun, não teve expressão significativa.

Os valores de p referentes aos dados contidos no quadro 5.1 indicado pelo teste de Mann-Whitney encontram-se no ANEXO B.

5.2.1 Jab1

A avaliação imuno-histoquímica de Jab1 em ductos de glândulas salivares normais evidenciou positividade nuclear em 91,7% das amostras. As amostras de AP, APBG e CAC apresentaram percentuais de positividade de 82,1%, 94,1% e

70,6%, respectivamente. Os percentuais de casos positivos avaliados não apresentaram diferença estatística entre si ($p=0,251$; teste do qui-quadrado; Tabela 5.1).

Tabela 5.1: Distribuição absoluta e relativa (percentual) dos casos positivos e negativos para Jab1, no núcleo de ductos de glândulas salivares normais e das seguintes neoplasias: adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico.

Grupos experimentais	Jab1 - Núcleo		p-Valor
	Negativo	Positivo	
Adenoma Pleomórfico	7 (17,9%)	32 (82,1%)	0,251
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	1 (5,9%)	16 (94,1%)	
Carcinoma adenoide cístico	5 (29,4%)	12 (70,6%)	
Ducto	1 (8,3%)	11 (91,7%)	

$p=0,251$; teste do qui-quadrado.

Para a glândula salivar normal, Jab1 obteve escores variando de 0 a 3, com mediana de 3, para ácino e para ducto variando de 2 a 3 com mediana de 3. Dos 12 casos de glândulas normais, todos (100%) apresentaram expressão ductal e 11 em ácino (91,6%) e um caso não teve expressão da proteína (8,4%). A expressão de Jab1 pode ser vista na Figura 5.1a.

O AP apresentou escores variando de 0 a 3, com mediana de 2. Dos 39 casos, 32 (82,1%) apresentaram expressão nuclear e em 7 (17,9%) casos, a proteína Jab1 não foi expressa.

Com relação ao APBG, a Jab1 obteve escores variando de 0 a 3, com mediana 2, sendo que dos 17 casos, 16 (94,1%) apresentaram expressão nuclear e em 1 (5,9%) a proteína não foi expressa.

No CAC, a Jab1 obteve escores variando de 0 a 2, com mediana de 1 e dos 17 casos, 12 (70,6%) expressaram em núcleo e em 5 (29,4%) casos, sua expressão foi negativa.

A expressão de Jab1 no AP, APBG e CAC pode ser vista na Figura 5.2.

O gráfico 5.3 mostra a distribuição da expressão de Jab1 nas neoplasias e ducto de glândula salivar normal segundo a graduação por escores.

Gráfico 5.3 – Expressão imuno-histoquímica de Jab1 nos tumores de glândula salivar e ducto de glândula salivar normal. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

5.2.2 p27

A análise da imunomarcção nuclear de p27 em ductos de glândulas salivares normais evidenciou positividade em 41,7% das amostras. As amostras de AP, APBG e CAC apresentaram percentuais de positividade de 87,2%, 82,4% e 35,3%, respectivamente. Dentre estes percentuais analisados, o adenoma pleomórfico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau apresentaram valores significativamente maiores de casos positivos para p27 ($p < 0,001$; teste do qui-quadrado; Tabela 5.2). A avaliação da imunomarcção citoplasmática de p27 não demonstrou nenhum caso positivo em ductos de glândulas salivares normais, entretanto, os casos de AP, APBG e CAC apresentaram 17,9%, 29,4% e 17,6%, de amostras positivas, respectivamente. Todavia, não houve diferença estatística ao se comparar estes valores percentuais entre si ($p = 0,241$, teste do qui-quadrado; tabela 5.2).

Tabela 5.2 Distribuição absoluta e relativa (percentual) dos casos positivos e negativos para p27, no núcleo e citoplasma de ductos de glândulas salivares normais e das seguintes neoplasias: adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico.

p27 - Núcleo				p27 - Citoplasma			
	Negativo	Positivo	p-Valor		Negativo	Positivo	p-Valor
AP	5 (12,8%)	34*(87,2%)	<0,001	AP	32 (82,1%)	7 (17,9%)	0,241
APBG	3 (17,6%)	14*(82,4%)		APBG	12 (70,6%)	5 (29,4%)	
CAC	11*(64.7%)	6 (35,3%)		CAC	14 (82,4%)	3 (17,6%)	
Ducto	7*(58.3%)	5 (41,7%)		Ducto	12 (100%)	0 (0%)	

AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico. ($p < 0,001$ para avaliação nuclear; $p = 0,0241$ para avaliação citoplasmática; teste do qui-quadrado).

A proteína p27 obteve escores variando de 0 a 3 em núcleo de ducto de glândula salivar com mediana 0; e, citoplasma não apresentou variação sendo expressão negativa. Os ácinos obtiveram escores variando de 0 a 3 com mediana 0 para núcleo e de 0 a 3, com mediana 2,5 para citoplasma. Dos 12 casos, 5 (41,6%) expressaram a proteína em núcleo de ducto, 4 (33,3%) expressaram a proteína em núcleo de ácino, sendo 7 (58,3%) negativos para o primeiro e 8 (66,7%) para o segundo. Considerando a expressão citoplasmática da proteína, nenhum (100%) apresentou expressão ductal e em 8 (66,7%) casos, a proteína foi expressa em ácino. A expressão de p27 pode ser vista na Figura 5.1b.

O adenoma pleomórfico apresentou escores variando de 0 a 3, com mediana de 2 para núcleo e de 0 a 3, com mediana 0 para citoplasma. Dos 39 casos, 34 (87,2%) apresentaram expressão nuclear e em 5 (12,8%) a proteína não foi expressa. A expressão citoplasmática ocorreu em 7 (17,9%) dos 39 casos e foi negativa em 32 (82,1%).

Quanto ao APBG, a p27 obteve escores variando de 0 a 3, com mediana 2 para núcleo e de 0 a 2 com mediana 0 para citoplasma, sendo que dos 17 casos, 14 (82,4%) expressou a proteína em núcleo e em 3 (17,6%), a expressão foi negativa. A expressão citoplasmática foi positiva em 5 (29,4%) casos e negativa em 12 (70,6%).

No CAC, a p27 obteve escores variando de 0 a 2, com mediana de 0 para núcleo e variando de 0 a 3, com mediana de 0 para citoplasma. Dos 17 casos, 6

(35,3%) casos expressaram em núcleo e 11 foram negativos (64,7%). Em citoplasma, 3 foram positivos (17,6%) e 14 (82,4%) foram negativos.

A expressão de p27 no AP, APBG e CAC pode ser vista na Figura 5.3.

Abaixo, a distribuição da expressão de p27 nas neoplasias e ducto de glândula salivar normal segundo a graduação por escores e sua localização celular. Os gráficos 5.4 e 5.5 exibem a distribuição nuclear e citoplasmática, respectivamente.

Gráfico 5.4 - Expressão imuno-histoquímica de p27 nuclear nos tumores de glândula salivar e ducto de glândula salivar normal. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

Gráfico 5.5 - Expressão imuno-histoquímica de p27 citoplasmática nos tumores de glândula salivar e ducto de glândula salivar normal. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

5.2.3 c-jun

A avaliação imuno-histoquímica de c-jun em ductos de glândulas salivares normais evidenciou positividade nuclear em 100% das amostras. As amostras de AP, APBG e CAC apresentaram percentuais de positividade de 2,6%, 0% e 5,9%, respectivamente. Os percentuais de casos positivos avaliados não apresentaram diferença estatística entre si ($p=0,653$; teste do qui-quadrado; Tabela 5.3).

Tabela 5.3: Distribuição absoluta e relativa (percentual) dos casos positivos e negativos para c-jun, no núcleo de ductos de glândulas salivares normais e das seguintes neoplasias: adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico.

	c-jun - Núcleo		p-Valor
	Negativo	Positivo	
Adenoma Pleomórfico	38 (97,4%)	1 (2,6%)	0,653
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	17 (100%)	0 (0%)	
Carcinoma adenoide cístico	16 (94,1%)	1 (5,9%)	
Ducto	12 (100%)	0 (0%)	

$p=0,653$; teste do qui-quadrado.

Em glândula salivar, a proteína c-jun não obteve variação de escores, apresentando, tanto em ducto como em ácino, mediana de 0. Em todos os 12 casos (100%) a proteína não foi expressa. A expressão de c-jun pode ser vista na Figura 5.1c.

O adenoma pleomórfico apresentou escores variando de 0 a 2, com mediana de 0. Dos 39 casos, apenas 1 (2,4%) caso expressou a proteína e o restante, 38 (97,4%), c-jun não foi expressa.

No APBG, c-jun não obteve variação de escores, apresentando mediana de 0, sendo que todos os 17 (100%) casos não expressaram a proteína.

O CAC obteve escores que variaram de 0 a 1, com mediana de 0, sendo que dos 17 casos estudados, 1(5,9%) caso apresentou marcação e nos 16 (94,1%) casos restantes, a marcação foi negativa.

A expressão de c-jun no AP, APBG e CAC pode ser vista na Figura 5.4.

O gráfico 5.6 mostra a distribuição da expressão de c-jun nas neoplasias e ducto de glândula salivar normal segundo a graduação por escores.

Gráfico 5.6 - Expressão imuno-histoquímica de c-jun nos tumores de glândula salivar e ducto de glândula salivar normal. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

5.2.4 c-fos

A análise da imunomarcção de c-fos em ductos de glândulas salivares normais evidenciou positividade em 66,7% das amostras. As amostras de AP, APBG e CAC apresentaram percentuais de positividade de 10,3%, 11,8% e 23,5%, respectivamente. Dentre estes percentuais analisados, o AP, o APBG e o CAC apresentaram valores significativamente maiores de casos negativos e o ducto, de casos positivos para c-fos ($p < 0,001$; teste do qui-quadrado; Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Distribuição absoluta e relativa (percentual) dos casos positivos e negativos para c-fos, no núcleo de ductos de glândulas salivares normais e das seguintes neoplasias: adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico.

	c-fos - Núcleo		p-Valor
	Negativo	Positivo	
Adenoma Pleomórfico	35* (89,7%)	4 (10,3%)	<0,001
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	15* (88,2%)	2 (11,8%)	
Carcinoma adenoide cístico	13* (76,5%)	4 (23,5%)	
Ducto	4 (33,3%)	8* (66,7%)	

p<0,001; teste do qui-quadrado.

A proteína c-fos obteve escores variando de 0 a 2 nos ácinos com mediana de 0 e variando de 0 a 3 com mediana de 1,5 nos ductos. Dos 12 casos, 4 (33,3%) expressaram em ácino e 8 (66,7%) em ducto e 8 (66,7%) foram negativos em ácino e 4 em ducto (33,3%). A expressão de c-fos pode ser vista na Figura 5.1d.

O adenoma pleomórfico apresentou escores variando de 0 a 2, com mediana de 0. Dos 39 casos, 4 (10,3%) apresentaram expressão e 35 (89,7%) casos foram negativos.

Em relação ao APBG, c-fos obteve escores que variaram de 0 a 3 com mediana de 0. Dos 17 casos, 2 (11,8%) apresentaram marcação e 15 (88,2%) casos não expressaram a proteína.

Quanto ao CAC, foram obtidos escores que variaram de 0 a 3 com mediana de 0. Dos 17 casos, 4 (23,5%) apresentaram expressão e os outros 13 (76,5%) foram negativos.

A expressão de c-fos no AP, APBG e CAC pode ser vista na Figura 5.5.

O gráfico 5.7 mostra a distribuição da expressão de c-fos nas neoplasias e ducto de glândula salivar normal segundo a graduação por escores.

Gráfico 5.7 - Expressão imuno-histoquímica de c-fos nos tumores de glândula salivar e ducto de glândula salivar normal. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

O teste de correlação de Spearman de Jab1, p27, c-jun e c-fos em cada lesão separadamente resultou que no AP, houve correlação significativamente entre Jab1 e p27, sendo coeficiente de correlação de $r=0,371$ e $p=0,020$ e entre c-jun e c-fos, sendo $r=0,452$ e $p=0,004$. No APBG, houve correlação significativamente entre Jab1 e p27, com $r=0,494$ e $p=0,044$ e no CAC, a correlação foi estatisticamente significativa entre p27 e c-fos, com $r=0,513$ e $p=0,035$. No ducto, as proteínas não apresentaram correlação significativa entre si (ANEXO C).

O gráfico 5.8 revela a distribuição das proteínas nos casos positivos considerando apenas a localização nuclear em relação às lesões estudadas e ao ducto salivar.

Gráfico 5.8. Expressão imuno-histoquímica nos casos em que expressaram as proteínas Jab1, p27 nuclear, c-jun e c-fos dos tumores de glândula salivar e ducto de glândula salivar normal. AP, adenoma pleomórfico; APBG, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau; CAC, carcinoma adenoide cístico.

Ducto de glândula salivar normal

Figura 5.1 - Expressão imuno-histoquímica de Jab1, p27, c-jun e c-fos em glândulas salivares. A. Expressão positiva de Jab1 nuclear ductal e acinar (400x). B. Expressão positiva de p27 nuclear acinar e ductal (400x). C. Expressão de c-jun negativa nuclear tanto ductal como acinar (400x). D. Expressão de c-fos positiva nuclear ductal e negativa acinar (400x).

Jab1

Adenoma pleomórfico

Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

Carcinoma adenoide cístico

Figura 5.2 - A. AP com expressão nuclear de Jab1 (400x). B. AP com expressão citoplasmática e nuclear de Jab1 (400x). C e D. APBG com expressão citoplasmática e nuclear de Jab1 (100x e 400x, respectivamente). E. CAC com expressão nuclear de Jab1. Predomínio de marcação nas células da camada luminal (400x). F. CAC com expressão citoplasmática e nuclear de Jab1 (400x).

p27

Adenoma pleomórfico

Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

Carcinoma adenoide cístico

Figura 5.3 - G e H. AP com expressão nuclear e discreta expressão citoplasmática de p27 (100x e 400x, respectivamente). I e J. APBG com expressão citoplasmática e nuclear de p27 (100x e 400x, respectivamente). K. CAC com discreta expressão nuclear de p27 (400x).

c-jun

Adenoma pleomórfico

Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau

Carcinoma adenoide cístico

Figura 5.4 - L. AP com expressão citoplasmática de c-jun (400x). M. APBG com expressão citoplasmática de c-jun (400x). N. CAC com expressão citoplasmática nas áreas de necrose (100x). No quadro inferior, em maior aumento (400x).

c-fos**Adenoma pleomórfico** **Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau** **Carcinoma adenoide cístico**

Figura 5.5 - O. AP com expressão nuclear de c-fos (400x). P. AP com expressão citoplasmática de c-fos (400x). Q. APBG com expressão nuclear de c-fos (400x). R. CAC com expressão nuclear de c-fos. Predomínio de marcação nas células que permeia a área de necrose (100x). S. CAC com expressão nuclear de c-fos (400x).

6 DISCUSSÃO

6.1 DADOS CLÍNICOS

O resultado dos dados clínico-demográficos do presente estudo compartilham em sua maioria com os achados da literatura.

As lesões aqui estudadas foram mais frequentes nas mulheres, sendo o AP com picos de incidência na 4ª e 6ª décadas de vida, o APBG, na 6ª e 8ª décadas e o CAC, na 4ª, 6ª e 7ª décadas, enquanto que o palato foi o sítio anatômico mais acometido seguido pela glândula parótida no AP e CAC e lábio superior no APBG.

Estudos na literatura mostram maior frequência de ocorrência no AP na 5ª década, período intermediário em nosso estudo, representado por 13,3% (4ª década com 23,3% e 6ª, com 20%) (1-3, 23). Já para o APBG, a literatura relata, assim como observado em nosso estudo, maior incidência entre a 6ª e 8ª décadas (1, 2, 25), enquanto o CAC, na 5ª e 6ª décadas (1, 3, 27).

Tanto o AP, como o APBG e o CAC foram mais presentes nas mulheres, como demonstrado na maioria dos estudos (1-3, 23, 25, 27, 28). Outros trabalhos, em menor quantidade, citam o sexo masculino mais acometido pelos tumores malignos (93-95).

A divergência apenas ocorre em relação ao sítio mais acometido. Em se tratando de um serviço apenas de diagnóstico, as biopsias recebidas são realizadas em sua maioria em nível ambulatorial, fazendo com que as biopsias de cavidade oral sejam mais frequentes, ao passo que, as realizadas em glândulas salivares maiores, menos (3). Os estudos que envolvem centros de tratamento apresentam maior acometimento da glândula parótida (1, 23, 93), por exceção do APBG, que raramente é localizado em glândulas maiores (96, 97).

6.2 JAB1

Jab1 é uma proteína que apresenta interação com diversas vias de sinalização. Entre essas interações, podem ser citadas a família AP-1 e a proteína p27; a primeira regulada positivamente e relacionada à proliferação celular e a segunda, negativamente, relacionada ao ciclo celular.

Apesar da interação de Jab1 com a família AP-1, da qual faz parte c-jun e c-fos, sabe-se que Jab1 ao interagir com c-jun, potencializa sua transativação, entretanto não há estudos envolvendo lesões que as relacionem; no entanto, muitos outros trabalhos associados a p27, relacionam a superexpressão de Jab1 a um pobre prognóstico.

Jab1 pode estar presente tanto em citoplasma como em núcleo e embora sua presença nuclear seja associada à sua forma não livre, ainda faltam informações quanto ao processo celular que envolve essa associação (19, 38)

No presente trabalho, quando comparamos a expressão de Jab1 entre os tecidos glandulares normais e as neoplasias, esta mostrou-se reduzida no CAC, redução esta estatisticamente significativa. Este resultado opõe-se ao mostrado na literatura, onde a superexpressão de Jab1 em câncer de mama, adenocarcinoma de pâncreas, fígado, entre outras (16, 17, 62, 65-67), tem sido relacionada a um prognóstico pobre, sendo o CAC, entre as lesões aqui estudadas, a de pior prognóstico (9, 10, 33-35). Embora, também tenha sido estatisticamente significativa quando comparou-se ducto e AP, neoplasia esta benigna, de comportamento biológico oposto ao do CAC.

O APBG não apresentou alteração de expressão de Jab1 em relação à glândula normal, porém foi estatisticamente significativa quando comparado ao CAC, sendo o APBG, dentre os 3 tumores aqui estudados, o de comportamento biológico intermediário (maligno de baixo grau e raras metástases), encontrando-se entre o AP (benigno) e o CAC (maligno, com emissão de metástase mais frequente).

Os nossos resultados para Jab1 e o CAC, mostraram menor expressão, estatisticamente significativa em relação ao tecido normal, sendo que o CAC apresentou mediana 1 (assim como o AP, e o APBG apresentou mediana 2) contrariando os resultados dos estudos publicados com outras neoplasias, tanto de origem glandular como outras origens (16, 17, 52, 54, 66) que mostram maior

expressão de Jab1 nos tumores em relação ao tecido normal. Entretanto, nosso parâmetro de comparação é diferente destes estudos já que neles a expressão em tecido normal foi bastante baixa ao contrário da expressão em glândula salivar normal. Podemos considerar para nosso estudo algumas assertivas importantes: presença de apenas um caso de CAC do subtipo sólido (considerado o subtipo histológico de pior prognóstico); as amostras com hipótese diagnóstica de tumor de origem de glândula salivar, em sua grande maioria, são provenientes de biopsias incisionais (impossibilitando o estudo numa amostra mais representativa do tumor), uma vez que nosso laboratório consiste apenas em oferecer o diagnóstico anátomo-patológico e não o tratamento, e, portanto, sua excisão cirúrgica torna-se amostra de um centro de tratamento; a quantidade de casos inseridos em nosso estudo pode não refletir o real resultado quando de uma amostra ideal; material que porventura tenha sido mal fixado, mal armazenado; e, ainda, a interação de outras proteínas e vias de sinalização com a atividade de Jab1 (39-41).

O APBG mostrou expressão de Jab1 semelhante aos ductos ao considerar casos apenas os casos positivos e não a graduação por escores, sendo assim, seu resultado em comparação ao CAC foi estatisticamente maior, concordando com as considerações feitas em relação ao CAC e Jab1, pois o APBG, apesar de ser maligno como o CAC, seu grau da malignidade é baixo e consequentemente, seu prognóstico é menos sombrio. Esse resultado, assim como em relação ao CAC, de que provavelmente haja interferência de outros fatores, como a interação de outras proteínas e vias de sinalização com Jab1.

Com relação ao AP, embora não tenha sido estatisticamente significativa, Jab1 mostrou tendência de menor expressão em relação aos outros tumores, concordando com a literatura, já que o mesmo, entre os tumores aqui estudados, é o único benigno. Porém, apesar dessa tendência estatística, quando observada a tabela (tabela 5.1), Jab1 não foi expressa em mais casos no CAC que no AP configurando, discordância com a literatura, pois a mesma salienta que Jab1 tem maior expressão em tumores malignos, embora tenha sido expressa quase que na sua totalidade (94,1%) nos APBGs.

A associação Jab1/CSN5-CSN é predominantemente nuclear, enquanto que as formas livres parecem ser citoplasmática e nuclear (36). Revisão recente da proteína Jab1/CSN5 afirma que Jab1/CSN5 tem papel crucial em diversos tumores e acrescenta que sua expressão parece ser citoplasmática e nuclear. Se Jab1/CSN5

age como um complexo ou independentemente de um complexo nessas neoplasias ainda precisa ser determinado (98).

O CAC foi a lesão estudada que apresentou expressão em menor quantidade dos casos, tanto em relação aos ductos de glândula salivar normal como do AP e APBG. Por essa ótica, o CAC corresponderia à lesão mais afastada ao compará-la aos demais grupos estudados (AP, APBG e ductos de glândulas salivares normais).

6.3 p27

Uma das interações da proteína Jab1 se dá com a p27. Jab1 se liga a p27 e induz sua exportação do núcleo e subsequente degradação no citoplasma (19, 21).

A p27 é uma proteína pertencente à família das CIP/kip, proteínas tais, inibitórias das ciclinas, ou seja, podem interromper o ciclo celular em qualquer fase, especialmente a G1 (20, 22).

Diversos estudos realizados associaram Jab1 e p27 e observaram que a expressão de uma era inversa à outra: Jab1 apresentou maior expressão nas neoplasias malignas e p27, nas benignas, assim como, menor expressão nas benignas e malignas, respectivamente (16, 17, 56-67).

Embora Jab1, estatisticamente, não tenha apresentado maior expressão no CAC, p27 (nuclear) apresentou expressão aumentada no AP e APBG em comparação ao CAC, corroborando com o observado na literatura. Sendo assim, a p27 nuclear exibiu maior expressão no AP, seguido pelo APBG e por último, CAC, embora, os ductos tenham apresentado expressão semelhante ao CAC. Ainda, pôde ser observado que o CAC, APBG e AP obtiveram escore 0 em 64,7%, 17,6% e 12,8%, respectivamente, e, nesse sentido, p27 nuclear apresentou-se com resultados compatíveis com o exibido na literatura.

Esses dados podem sugerir ainda uma regulação independente, tanto de Jab1 como de p27 nesses tumores, uma vez que a expressão de ambas não foi inversa nos tumores estudados e a expressão de Jab1 tenha ocorrido quase que na totalidade dos casos.

Na dependência da localização celular de p27, sua atividade varia, quando nuclear, sua função inibitória está ativa e atuando como uma proteína

antiproliferativa; quando no citoplasma, promove aumento da motilidade celular, favorecendo a metastatização (44, 45).

A p27 citoplasmática não apresentou significância estatística. Ela foi negativa praticamente em quase todos os casos, com 82,4%, 70,6% e 82,1% no CAC, APBG e AP, respectivamente, assim como a graduação por escores foi bastante semelhante, demonstrando valores muito aproximados entre o AP e o CAC, sendo o primeiro um tumor benigno e o segundo, um tumor maligno com alta associação à metástase. Com o resultado da expressão citoplasmática de p27, poder-se-ia sugerir que os casos que compõem esse estudo apresentam baixa taxa de metastatização.

A mediana de p27 nuclear apresentou graduação 2, tanto para AP e APBG; e mediana 0 para CAC. Esses dados encontram-se em concordância quanto aos níveis de p27 observados nas neoplasias estudadas, pois a literatura sugere que, os níveis são aumentados nas células quiescentes ao compará-los às proliferativas (46)

A maioria dos estudos associando a proteína p27 e neoplasias de glândula salivar identificou baixa expressão da proteína no CAC (69-72), o mesmo foi observado no presente trabalho, embora Akrish, Ben-Izhak, Peled, (68) tenham encontrado alta expressão. O mesmo encontraram para o APBG, corroborando com nossos achados da p27 para esta lesão. Em concordância com nossos resultados, foi também a alta expressão nos APs, apesar de que Ito et al. (73) observaram que a expressão da proteína nos APs foi preservada ao compará-los com os tecidos normais bucais, incluindo glândulas salivares, embora não tenham qualificado se ducto ou ácino. Outro estudo observou que os casos de APBG e CAC com expressão de p27 menor de 50% apresentaram comportamento biológico mais agressivo, 1/5 e 1/7, respectivamente (74). Em nosso estudo, dos 17 casos, 9 (53%) apresentaram expressão em menos de 50% das células neoplásicas do APBG e em todos (100%), 17 dos 17, do CAC. Ainda, dentro desse parâmetro, dos 39 casos do AP, 33 (84,6%) expressaram a proteína em menos de 50% da neoplasia, concordando com o achado da literatura quanto ao comportamento biológico.

Embora, a análise estatística tenha mostrado significante apenas a menor expressão no CAC em relação ao APBG e ductos e do AP em relação a ductos, a proteína Jab1 foi expressa em 82,1% (32/39) dos casos de AP, em 94,1% (16/17) de APBG e 70,6% de CAC (12/17); e sendo suas medianas 2, 2 e 1, respectivamente. Já a proteína p27 foi expressa em 87,2% (34/39) dos casos de AP, 82,4% (14/17) de APBG e 35,3% (6/17) de CAC, com medianas 2, 2 e 0, respectivamente. Com esses

valores, podemos observar igualdade entre os níveis celular de expressão (medianas) do AP e APBG, porém, maior nível celular de Jab1 no CAC em Jab1. Desse modo, poder-se-ia sugerir uma inversão da expressão entre as duas proteínas, Jab1 e p27, no CAC.

6.4 C-JUN

A proteína c-jun, é codificada por um proto-oncogene, atuando como um regulador positivo do ciclo celular por meio de outras vias de sinalização, como a MAPK e AKT, que por sua vez, bloqueiam atividade de p27. A c-jun forma o principal componente de AP-1, relacionado à proliferação e diferenciação celular, assim, ao ser bloqueada, inibe a proliferação e induz à apoptose (16, 17, 79).

A análise estatística para c-jun não foi significativa. Ao se observar o gráfico 5.6, a expressão em ducto foi semelhante às neoplasias estudadas. Os grupos experimentais apresentaram quase que na sua totalidade expressão negativa de c-jun, sugerindo a não participação dessa proteína na tumorigênese desses tumores. Esse resultado se opoe aos dados fornecidos pela literatura, uma vez que o aumento da expressão de c-jun significaria proliferação e sobrevivência celular.

O estudo de Turatti et al. (92) identificou que na displasia epitelial discreta e na moderada a intensa, c-jun foi expressa em núcleo e citoplasma enquanto que no carcinoma epidermoide, a expressão foi nuclear sugerindo que à medida que a lesão potencialmente maligna vai se intensificando, a expressão citoplasmática diminui e a nuclear aumenta. Sendo assim, o AP e o CAC apresentaram expressão nuclear em apenas 1 caso cada, o CAC com escore 1 e o AP com escore 2. A expressão nuclear de c-jun nesse único caso de AP poder-se-ia considerar um indício de um forte candidato à transformação maligna, à sua evolução para um CXAP assim como ter um comportamento biológico mais agressivo que o APBG, neoplasia na qual não se observou expressão da proteína.

Outro dado a se observar é que o mesmo trabalho utilizou apenas amostras da língua, tanto para controle como para as lesões estudadas; e, Sousa et al. (2002), incluíram em seu estudo, amostras de diversos sítios, incluindo localidades em que há presença de glândulas salivares menores, como assoalho e língua (91,

92). Desse modo, poderíamos até suscitar que parte dos carcinomas epidermóides diagnosticados nessas localidades poderiam ter origem nas células epiteliais ductais das glândulas salivares menores daquela região, embora não seja possível ainda realizar a distinção dos carcinomas epidermóides primários de glândula salivar menor e dos originados do epitélio de superfície da mucosa oral (99), fazendo com que os dados deste trabalho com tumores de glândula salivar possam apresentar resultados mais compatíveis quando comparados aos carcinomas epidermóides do estudo de Turatti et al. (92).

Outros estudos trabalharam com tumores de variadas localidades: em pulmão, apesar de ter ocorrido expressão citoplasmática, consideraram como positiva apenas marcação nuclear e identificaram que em epitélio alveolar de pulmão, c-jun não foi expressa, porém, em aproximadamente um terço dos tumores primários e metastáticos, houve expressão da mesma (87); em tumores glandulares, como o de próstata, em que se observou maior expressão nuclear de c-jun nas metástases e nos adenomas a expressão foi ausente; e, como o de mama, em que sua superexpressão foi identificada nos adenocarcinomas (89, 90), dados estes que suportam a ideia de quanto mais agressiva a lesão, maior é a expressão nuclear de c-jun.

6.5 C-FOS

Assim como c-jun, c-fos é um proto-oncogene, pertencente à família Fos que faz parte do complexo AP-1. Os membros da família Fos formam heterodímeros com proteínas da família Jun. Os heterodímeros JUN-FOS são mais estáveis e possuem atividade de ligação de DNA mais fortes que os homodímeros JUN-JUN (81, 83).

Algumas pesquisas sugerem que a expressão das proteínas de FOS pode ser crucial para a regulação dos genes de AP-1 e desse modo, melhorando as propriedades de transativação e transformação de c-jun, por exemplo (83, 84).

Sendo assim, pode significar que, quanto maior a expressão de c-fos, maior a de c-jun; e, se reduzida a expressão de c-fos, menor será a de c-jun; porém, a correlação de Spearman foi compatível com a relação c-fos/c-jun, que sugeriu que a redução de c-jun pode estar correlacionada à redução de c-fos no AP, em que

$p=0,004$, apesar de que no CAC, o teste sugeriu que a redução de p27 pode estar relacionada à redução de c-fos ($p=0,04$) e do mesmo modo, se c-jun, por meio de MAPK e AKT, bloqueia p27, pode-se sugerir que, havendo redução de c-fos, reduz c-jun, bloqueando p27. E, por fim, no APBG, o teste não identificou correlação entre c-jun e c-fos.

Embora a análise estatística para c-jun e c-fos não tenham sido semelhantes, ao se observar os gráficos 5.5 e 5.6, as duas proteínas obtiveram na maioria dos casos escore 0 para as neoplasias estudadas.

Todavia, muitos estudos realizados com o fator de transcrição AP-1, poucos utilizaram a c-fos. A proteína c-fos apresentou expressão apenas nuclear, tanto na mucosa oral normal, nas camadas suprabasais, excluindo a granulosa e a paraqueratinizada, como nos carcinomas epidermóides, principalmente nos bem e moderadamente diferenciados e pouca expressão nos pobremente diferenciados (91) e em outro estudo, a proteína mostrou-se aumentada nas displasias moderada a intensa (em 60% dos casos) e nos carcinomas epidermóides (em 80% dos casos) e sua expressão foi apenas nuclear (92), contrastando com nossos achados, cuja expressão ocorreu em 10,3% dos casos de AP, 11,8% dos APBGs e 23,5% dos CACs.

Ainda, nossos resultados demonstraram redução da proteína em todos os tumores em relação aos ductos e poucos casos demonstraram expressão da mesma, contradizendo o exposto no trabalho realizado com adenocarcinoma prostático, evidenciando superexpressão da proteína, mesmo que representando associação à doença avançada (89).

De acordo com o exposto, a p27 é a proteína que aparenta estar mais condizente com os parâmetros exibidos na literatura, entretanto, sua associação com Jab1 necessita ser estabelecida em virtude da grande quantidade de interações que essas proteínas possuem, as quais interferem diretamente em sua atividade, implicando na tumorigênese glandular salivar.

7 CONCLUSÕES

7 CONCLUSÕES

Jab1 parece estar relacionada à tumorigênese do AP, APBG e CAC independentemente;

p27 parece estar fortemente associada à tumorigênese do AP, APBG e CAC;

c-jun parece não estar envolvida na tumorigênese glandular salivar;

c-fos parece não estar associada na tumorigênese das lesões estudadas;

O padrão de expressão dessas proteínas entre o AP e o APBG apresentou resultados muito similares, sugerindo um comportamento biológico equivalente.

REFERÊNCIAS¹

1. Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the Salivary Gland. 4th ed. Washington DC: ART Press; 2008. 524 p.
2. Eveson J, Auclair P, Gnepp D, El-Naggar A. Tumours of the Salivary Glands. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. World Health Organization - Classification of Tumours - Pathology & Genetics - Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005. p. 209-82.
3. Loyola AM, de Araújo VC, de Sousa SO, de Araújo NS. Minor salivary gland tumours. A retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1995;31B(3):197-201.
4. Maxwell EL, Hall FT, Freeman JL. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. J Otolaryngol. 2004;33(3):181-4.
5. Olsen KD, Lewis JE. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review. Head Neck. 2001;23(9):705-12.
6. Gnepp DR. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. Pathol Annu. 1993;28 Pt 1:279-328.
7. Pedersen D, Overgaard J, Søgaaard H, Elbrønd O, Overgaard M. Malignant parotid tumors in 110 consecutive patients: treatment results and prognosis. Laryngoscope. 1992;102(9):1064-9.
8. Bhattacharyya N, Fried MP. Nodal metastasis in major salivary gland cancer: predictive factors and effects on survival. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2002;128(8):904-8.
9. Seethala RR. Histologic grading and prognostic biomarkers in salivary gland carcinomas. Adv Anat Pathol. 2011;18(1):29-45.
10. Spiro RH. Distant metastasis in adenoid cystic carcinoma of salivary origin. Am J Surg. 1997;174(5):495-8.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

11. Shackleford TJ, Claret FX. JAB1/CSN5: a new player in cell cycle control and cancer. *Cell Div.* 2010;5:26.
12. Chamovitz DA, Segal D. JAB1/CSN5 and the COP9 signalosome. A complex situation. *EMBO Rep.* 2001;2(2):96-101.
13. Claret FX, Hibi M, Dhut S, Toda T, Karin M. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature.* 1996;383(6599):453-7.
14. Eferl R, Wagner EF. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 2003;3(11):859-68.
15. Vogt PK. Jun, the oncoprotein. *Oncogene.* 2001;20(19):2365-77.
16. Kouvaraki MA, Rassidakis GZ, Tian L, Kumar R, Kittas C, Claret FX. Jun activation domain-binding protein 1 expression in breast cancer inversely correlates with the cell cycle inhibitor p27(Kip1). *Cancer Res.* 2003;63(11):2977-81.
17. Kouvaraki MA, Korapati AL, Rassidakis GZ, Tian L, Zhang Q, Chiao P, et al. Potential role of Jun activation domain-binding protein 1 as a negative regulator of p27kip1 in pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res.* 2006;66(17):8581-9.
18. Chiu R, Boyle WJ, Meek J, Smeal T, Hunter T, Karin M. The c-Fos protein interacts with c-Jun/AP-1 to stimulate transcription of AP-1 responsive genes. *Cell.* 1988;54(4):541-52.
19. Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, Mori S, Maeda M, Tanaka T, et al. The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J Biol Chem.* 2002;277(3):2302-10.
20. Nomura H, Sawada Y, Fujinaga K, Ohtaki S. Cloning and characterization of rat p27Kip1, a cyclin-dependent kinase inhibitor. *Gene.* 1997;191(2):211-8.
21. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes Dev.* 1999;13(12):1501-12.
22. Bringold F, Serrano M. Tumor suppressors and oncogenes in cellular senescence. *Exp Gerontol.* 2000;35(3):317-29.

23. Ito FA, Ito K, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005;34(5):533-6.
24. Friedrich RE, Li L, Knop J, Giese M, Schmelzle R. Pleomorphic adenoma of the salivary glands: analysis of 94 patients. *Anticancer Res.* 2005;25(3A):1703-5.
25. Evans HL, Luna MA. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a study of 40 cases with long-term follow up and an evaluation of the importance of papillary areas. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(10):1319-28.
26. Tian Z, Li L, Wang L, Hu Y, Li J. Salivary gland neoplasms in oral and maxillofacial regions: a 23-year retrospective study of 6982 cases in an eastern Chinese population. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010;39(3):235-42.
27. Martínez-Rodríguez N, Leco-Berrocal I, Rubio-Alonso L, Arias-Irimia O, Martínez-González JM. Epidemiology and treatment of adenoid cystic carcinoma of the minor salivary glands: a meta-analytic study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011;16(7):e884-9.
28. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, MacDonald D, et al. Tumours of the Salivary Glands. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, editors. *World Healthy Organization - Classification of Tumors - Pathology & Genetics - Head and Neck Tumours.* Lyon: IARC Press; 2005. p. 163-208.
29. Chhieng DC, Paulino AF. Basaloid tumors of the salivary glands. *Ann Diagn Pathol.* 2002;6(6):364-72.
30. Perzin KH, Gullane P, Clairmont AC. Adenoid cystic carcinomas arising in salivary glands: a correlation of histologic features and clinical course. *Cancer.* 1978;42(1):265-82.
31. Szanto PA, Luna MA, Tortoledo ME, White RA. Histologic grading of adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Cancer.* 1984;54(6):1062-9.
32. Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg.* 1992;164(6):623-8.
33. Amit M, Binenbaum Y, Sharma K, Ramer N, Ramer I, Agbetoba A, et al. Incidence of cervical lymph node metastasis and its association with outcomes in

patients with adenoid cystic carcinoma. An international collaborative study. *Head Neck*. 2014; Jul 24. doi: 10.1002/hed.23711. [Epub ahead of print]

34. Barrett AW, Speight PM. Perineural invasion in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands: a valid prognostic indicator? *Oral Oncol*. 2009;45(11):936-40.

35. PEREZ DE, DE ABREU ALVES F, NOBUKO NISHIMOTO I, DE ALMEIDA OP, KOWALSKI LP. Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma *Oral Oncol*. 2006;42(2):139-46.

36. Kwok SF, Solano R, Tsuge T, Chamovitz DA, Ecker JR, Matsui M, et al. Arabidopsis homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic cop/det/fus mutations. *Plant Cell*. 1998;10(11):1779-90.

37. Kwok SF, Staub JM, Deng XW. Characterization of two subunits of Arabidopsis 19S proteasome regulatory complex and its possible interaction with the COP9 complex. *J Mol Biol*. 1999;285(1):85-95.

38. Fukumoto A, Tomoda K, Kubota M, Kato JY, Yoneda-Kato N. Small Jab1-containing subcomplex is regulated in an anchorage- and cell cycle-dependent manner, which is abrogated by ras transformation. *FEBS Lett*. 2005;579(5):1047-54.

39. Emberley ED, Niu Y, Leygue E, Tomes L, Gietz RD, Murphy LC, et al. Psoriasin interacts with Jab1 and influences breast cancer progression. *Cancer Res*. 2003;63(8):1954-61.

40. Hsu MC, Chang HC, Hung WC. HER-2/neu transcriptionally activates Jab1 expression via the AKT/beta-catenin pathway in breast cancer cells. *Endocr Relat Cancer*. 2007;14(3):655-67.

41. Hsu MC, Huang CC, Chang HC, Hu TH, Hung WC. Overexpression of Jab1 in hepatocellular carcinoma and its inhibition by peroxisome proliferator-activated receptor{gamma} ligands in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res*. 2008;14(13):4045-52.

42. Bae MK, Ahn MY, Jeong JW, Bae MH, Lee YM, Bae SK, et al. Jab1 interacts directly with HIF-1alpha and regulates its stability. *J Biol Chem*. 2002;277(1):9-12.

43. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, Kim SH, Kim KW. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp Mol Med*. 2004;36(1):1-12.

44. Larrea MD, Wander SA, Slingerland JM. p27 as Jekyll and Hyde: regulation of cell cycle and cell motility. *Cell Cycle*. 2009;8(21):3455-61.
45. Bar-Sagi D, Hall A. Ras and Rho GTPases: a family reunion. *Cell*. 2000;103(2):227-38.
46. Lee J, Kim SS. The function of p27 KIP1 during tumor development. *Exp Mol Med*. 2009;41(11):765-71.
47. Besson A, Gurian-West M, Chen X, Kelly-Spratt KS, Kemp CJ, Roberts JM. A pathway in quiescent cells that controls p27Kip1 stability, subcellular localization, and tumor suppression. *Genes Dev*. 2006;20(1):47-64.
48. Borriello A, Bencivenga D, Criscuolo M, Caldarelli I, Cucciolla V, Tramontano A, et al. Targeting p27Kip1 protein: its relevance in the therapy of human cancer. *Expert Opin Ther Targets*. 2011;15(6):677-93.
49. Shin I, Yakes FM, Rojo F, Shin NY, Bakin AV, Baselga J, et al. PKB/Akt mediates cell-cycle progression by phosphorylation of p27(Kip1) at threonine 157 and modulation of its cellular localization. *Nat Med*. 2002;8(10):1145-52.
50. Fujita N, Sato S, Tsuruo T. Phosphorylation of p27Kip1 at threonine 198 by p90 ribosomal protein S6 kinases promotes its binding to 14-3-3 and cytoplasmic localization. *J Biol Chem*. 2003;278(49):49254-60.
51. Chu I, Sun J, Arnaout A, Kahn H, Hanna W, Narod S, et al. p27 phosphorylation by Src regulates inhibition of cyclin E-Cdk2. *Cell*. 2007;128(2):281-94.
52. Sorbye SW, Kilvaer TK, Valkov A, Donnem T, Smeland E, Al-Shibli K, et al. Prognostic impact of Jab1, p16, p21, p62, Ki67 and Skp2 in soft tissue sarcomas. *PLoS One*. 2012;7(10):e47068.
53. Tsuchida R, Miyauchi J, Shen L, Takagi M, Tsunematsu Y, Saeki M, et al. Expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1 and AP-1 coactivator p38/Jab1 correlates with differentiation of embryonal rhabdomyosarcoma. *Jpn J Cancer Res*. 2002;93(9):1000-6.
54. Rassidakis GZ, Claret FX, Lai R, Zhang Q, Sarris AH, McDonnell TJ, et al. Expression of p27(Kip1) and c-Jun activation binding protein 1 are inversely

correlated in systemic anaplastic large cell lymphoma. *Clin Cancer Res.* 2003;9(3):1121-8.

55. Wang Y, Fei M, Cheng C, Zhang D, Lu J, He S, et al. Jun activation domain-binding protein 1 negatively regulate p27 kip1 in non-Hodgkin's lymphomas. *Cancer Biol Ther.* 2008;7(3):460-7.

56. Harada K, Kawashima Y, Yoshida H, Sato M. High expression of Jun activation domain-binding protein 1 (Jab1) is a strong prognostic marker in oral squamous cell carcinoma patients treated by UFT in combination with radiation. *Anticancer Res.* 2006;26(2B):1615-9.

57. Shintani S, Li C, Mihara M, Hino S, Nakashiro K, Hamakawa H. Skp2 and Jab1 expression are associated with inverse expression of p27(KIP1) and poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. *Oncology.* 2003;65(4):355-62.

58. Gao L, Huang S, Ren W, Zhao L, Li J, Zhi K, et al. Jun activation domain-binding protein 1 expression in oral squamous cell carcinomas inversely correlates with the cell cycle inhibitor p27. *Med Oncol.* 2012;29(4):2499-504.

59. Dong Y, Sui L, Watanabe Y, Yamaguchi F, Hatano N, Tokuda M. Prognostic significance of Jab1 expression in laryngeal squamous cell carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2005;11(1):259-66.

60. Wang F, Wang Y, Yu X, Yang D, Wang Z, Lu C, et al. Significance of Jab1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma. *J Clin Gastroenterol.* 2009;43(6):520-6.

61. Pan Y, Zhang Q, Tian L, Wang X, Fan X, Zhang H, et al. Jab1/CSN5 negatively regulates p27 and plays a role in the pathogenesis of nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Res.* 2012;72(7):1890-900.

62. Esteva FJ, Sahin AA, Rassidakis GZ, Yuan LX, Smith TL, Yang Y, et al. Jun activation domain binding protein 1 expression is associated with low p27(Kip1) levels in node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003;9(15):5652-9.

63. Wang H, Liu XB, Chen JH, Wang QQ, Chen JP, Xu JF, et al. Decreased expression and prognostic role of cytoplasmic BRSK1 in human breast carcinoma: Correlation with Jab1 stability and PI3K/Akt pathway. *Exp Mol Pathol.* 2014;97(2):191-201.

64. Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tai Y, et al. Jab1 expression is associated with inverse expression of p27(kip1) and poor prognosis in epithelial ovarian tumors. *Clin Cancer Res*. 2001;7(12):4130-5.
65. Wang Y, Cheng C, Ji Y, Zhao Y, Zou L, Shen A. Expression of Jun activation domain-binding protein 1 and Ser10 phosphorylated p27 protein in human epithelial ovarian carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009;135(7):951-9.
66. Fukumoto A, Ikeda N, Sho M, Tomoda K, Kanehiro H, Hisanaga M, et al. Prognostic significance of localized p27Kip1 and potential role of Jab1/CSN5 in pancreatic cancer. *Oncol Rep*. 2004;11(2):277-84.
67. Wang Y, Yu YN, Song S, Li TJ, Xiang JY, Zhang H, et al. JAB1 and phospho-Ser10 p27 expression profile determine human hepatocellular carcinoma prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(6):969-78.
68. Akkrish S, Ben-Izhak O, Peled M. P27/SKP-2 histochemical profile is relevant to malignant salivary gland tumors (MST) histogenesis and tumor grade. *Head Neck Pathol*. 2012;6(2):157-65.
69. Affolter A, Helmbrecht S, Finger S, Hörmann K, Götte K. Altered expression of cell cycle regulators p21, p27, and p53 in tumors of salivary glands and paranasal sinuses. *Oncol Rep*. 2005;13(6):1089-94.
70. Keikhaee MR, Kudo Y, Siriwardena S, Wu L, Ogawa I, Takata T. Skp2 expression is associated with down-regulation of p27 protein and cell proliferation in salivary adenoid cystic carcinoma. *Virchows Arch*. 2007;450(5):567-74.
71. Takata T, Kudo Y, Zhao M, Ogawa I, Miyauchi M, Sato S, et al. Reduced expression of p27(Kip1) protein in relation to salivary adenoid cystic carcinoma metastasis. *Cancer*. 1999;86(6):928-35.
72. Shahsavari F, Eslami M, Baghaie F, Tirgari F, Motahhary P. Immunohistochemical evaluation of p27 (kip1) in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas of the minor salivary glands. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2005;6(4):527-30.
73. Ito R, Yasui W, Ogawa Y, Toyosawa S, Tahara E, Ijuhin N. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) in oral malignant tumors. *Pathobiology*. 1999;67(4):169-73.

74. Ben-Izhak O, Akrish S, Gan S, Nagler RM. p27 and salivary cancer. *Cancer Immunol Immunother.* 2009;58(3):469-73.
75. Daa T, Kashima K, Kondo Y, Yada N, Suzuki M, Yokoyama S. Aberrant methylation in promoter regions of cyclin-dependent kinase inhibitor genes in adenoid cystic carcinoma of the salivary gland. *APMIS.* 2008;116(1):21-6.
76. Kishi M, Nakamura M, Nishimine M, Ikuta M, Kirita T, Konishi N. Genetic and epigenetic alteration profiles for multiple genes in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol.* 2005;41(2):161-9.
77. Lopez-Bergami P, Lau E, Ronai Z. Emerging roles of ATF2 and the dynamic AP1 network in cancer. *Nat Rev Cancer.* 2010;10(1):65-76.
78. Maki Y, Bos TJ, Davis C, Starbuck M, Vogt PK. Avian sarcoma virus 17 carries the jun oncogene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(9):2848-52.
79. Bagui TK, Cui D, Roy S, Mohapatra S, Shor AC, Ma L, et al. Inhibition of p27Kip1 gene transcription by mitogens. *Cell Cycle.* 2009;8(1):115-24.
80. Hunter T, Karin M. The regulation of transcription by phosphorylation. *Cell.* 1992;70(3):375-87.
81. Milde-Langosch K. The Fos family of transcription factors and their role in tumourigenesis. *Eur J Cancer.* 2005;41(16):2449-61.
82. Hurd TW, Culbert AA, Webster KJ, Tavaré JM. Dual role for mitogen-activated protein kinase (Erk) in insulin-dependent regulation of Fra-1 (fos-related antigen-1) transcription and phosphorylation. *Biochem J.* 2002;368(Pt 2):573-80.
83. Ryseck RP, Bravo R. c-JUN, JUN B, and JUN D differ in their binding affinities to AP-1 and CRE consensus sequences: effect of FOS proteins. *Oncogene.* 1991;6(4):533-42.
84. Schütte J, Viallet J, Nau M, Segal S, Fedorko J, Minna J. jun-B inhibits and c-fos stimulates the transforming and trans-activating activities of c-jun. *Cell.* 1989;59(6):987-97.

85. Chen TK, Smith LM, Gebhardt DK, Birrer MJ, Brown PH. Activation and inhibition of the AP-1 complex in human breast cancer cells. *Mol Carcinog.* 1996;15(3):215-26.
86. Prusty BK, Das BC. Constitutive activation of transcription factor AP-1 in cervical cancer and suppression of human papillomavirus (HPV) transcription and AP-1 activity in HeLa cells by curcumin. *Int J Cancer.* 2005;113(6):951-60.
87. Szabo E, Riffe ME, Steinberg SM, Birrer MJ, Linnoila RI. Altered cJUN expression: an early event in human lung carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996;56(2):305-15.
88. Acay RR, dos Santos E, de Sousa SO. Correlation between c-Jun and human papillomavirus in oral premalignant and malignant lesions. *Oral Oncol.* 2008;44(7):698-702.
89. Ouyang X, Jessen WJ, Al-Ahmadie H, Serio AM, Lin Y, Shih WJ, et al. Activator protein-1 transcription factors are associated with progression and recurrence of prostate cancer. *Cancer Res.* 2008;68(7):2132-44.
90. Langer S, Singer CF, Hudelist G, Dampier B, Kaserer K, Vinatzer U, et al. Jun and Fos family protein expression in human breast cancer: correlation of protein expression and clinicopathological parameters. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2006;27(4):345-52.
91. de Sousa SO, Mesquita RA, Pinto DS, Gutkind S. Immunolocalization of c-Fos and c-Jun in human oral mucosa and in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(2):78-81.
92. Turatti E, da Costa Neves A, de Magalhães MH, de Sousa SO. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci.* 2005;47(2):71-6.
93. Lawal AO, Adisa AO, Kolude B, Adeyemi BF, Olajide MA. A review of 413 salivary gland tumours in the head and neck region. *J Clin Exp Dent.* 2013;5(5):e218-22.
94. de Oliveira FA, Duarte EC, Taveira CT, Máximo AA, de Aquino EC, Alencar ReC, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in a Brazilian population. *Head Neck Pathol.* 2009;3(4):271-5.

95. Li LJ, Li Y, Wen YM, Liu H, Zhao HW. Clinical analysis of salivary gland tumor cases in West China in past 50 years. *Oral Oncol.* 2008;44(2):187-92.
96. Lee DH, Yoon TM, Lee JK, Lim SC. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the maxillary sinus. *J Craniofac Surg.* 2013;24(3):e213-4.
97. Fife TA, Smith B, Sullivan CA, Browne JD, Waltonen JD. Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a 17 patient case series. *Am J Otolaryngol.* 2013;34(5):445-8.
98. Pan Y, Claret FX. Targeting Jab1/CSN5 in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Lett.* 2012;326(2):155-60.
99. Cury SEV. Expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 7 e 8 em carcinomas epidermóides de assoalho bucal [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2008.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão proteica de tumores benignos e malignos de glândula salivar

Pesquisador: Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 20529813.9.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 367.060

Data da Relatoria: 21/08/2013

Apresentação do Projeto:

Casos de adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico, todos de glândula salivar serão obtidos do arquivo do Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). As lesões serão analisadas histomorfologicamente com cortes de 5µm de espessura corados pelo método da hematoxilina e eosina (HE). Posteriormente, os casos serão avaliados quanto à expressão imunoistoquímica das proteínas JAB1, p27, c-jun e c-fos pela técnica com EnVision. A mesma técnica, com as mesmas proteínas serão utilizadas em glândulas salivares normais para controle.

Dados como, idade e sexo do paciente e localização da lesão também serão incluídos no estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar expressão imunoistoquímica das proteínas JAB1, p27, c-jun e c-fos no adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e carcinoma adenoide cístico;

Comparar a expressão dessas proteínas entre o AP, APBG e o CAC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Ambos mensurados.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nada a declarar.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 387.080

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados: Folha de Rosto, autorização para a utilização do material arquivado no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSS e Projeto de Pesquisa.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSS relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Aprovado.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 21 de Agosto de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

ANEXO B – Teste de Mann-Whitney

Valores de p para JAB1:

Grupos experimentais comparados	p
ducto x ácino	> 0,9999
ducto x AP	0,0136
ducto x APBG	0,7810
ducto x CAC	< 0,0001
ácino x AP	> 0,9999
ácino x APBG	> 0,9999
ácino x CAC	0,0331
AP x APBG	> 0,9999
AP x CAC	0,3574
APBG x CAC	0,0344

Valores de p para p27 - núcleo

Grupos experimentais comparados	P
ducto x ácino	> 0,9999
ducto x AP	> 0,9999
ducto x APBG	> 0,9999
ducto x CAC	> 0,9999
ácino x AP	0,8787
ácino x APBG	0,6052
ácino x CAC	> 0,9999
AP x APBG	> 0,9999
AP x CAC	0,0074
APBG x CAC	0,0104

Valores de p para p27 - citoplasma

Grupos experimentais comparados	P
ducto x ácino	0,0003
ducto x AP	> 0,9999
ducto x APBG	0,9249
ducto x CAC	> 0,9999
ácino x AP	0,0007
ácino x APBG	0,0449
ácino x CAC	0,0046
AP x APBG	> 0,9999
AP x CAC	> 0,9999
APBG x CAC	> 0,9999

Valores de p para c-jun

Grupos experimentais comparados	P
ducto x ácido	> 0,9999
ducto x AP	> 0,9999
ducto x APBG	> 0,9999
ducto x CAC	> 0,9999
ácido x AP	> 0,9999
ácido x APBG	> 0,9999
ácido x CAC	> 0,9999
AP x APBG	> 0,9999
AP x CAC	> 0,9999
APBG x CAC	> 0,9999

Valores de p para c-fos

Grupos experimentais comparados	p
ducto x ácido	0,2681
ducto x AP	0,0002
ducto x APBG	0,0048
ducto x CAC	0,0352
ácido x AP	> 0,9999
ácido x APBG	> 0,9999
ácido x CAC	> 0,9999
AP x APBG	> 0,9999
AP x CAC	> 0,9999
APBG x CAC	> 0,9999

ANEXO C – Teste de correlação de Spearman

AP					
		Jab	p27	c-jun	c-fos
Jab1	r	-	0,371 [*]	0,195	0,250
	p-Valor	-	0,020	0,235	0,125
p27	r	0,371 [*]	-	0,252	0,176
	p-Valor	0,020	-	0,122	0,283
c-jun	r	0,195	0,252	-	0,452 ^{**}
	p-Valor	0,235	0,122	-	0,004
c-fos	r	0,250	0,176	0,452 ^{**}	-
	p-Valor	0,125	0,283	0,004	-
APBG					
		Jab	p27	c-jun	c-fos
Jab	r	-	0,494 [*]	0,000	0,359
	p-Valor	-	0,044	1,000	0,157
p27	r	0,494 [*]	-	0,000	0,426
	p-Valor	0,044	-	1,000	0,088
c-jun	r	0,000	0,000	-	0,000
	p-Valor	1,000	1,000	-	1,000
c-fos	r	0,359	0,426	0,000	-
	p-Valor	0,157	0,088	1,000	-
CAC					
		Jab	p27	c-jun	c-fos
Jab	r	-	0,197	0,000	0,516
	p-Valor	-	0,499	1,000	0,059
p27	r	0,197	-	0,360	0,513 [*]
	p-Valor	0,499	-	0,156	0,035
c-jun	r	0,000	0,360	-	-0,138
	p-Valor	1,000	0,156	0,980	0,598
c-fos	r	0,516	0,513 [*]	-0,138	-
	p-Valor	0,059	0,035	0,598	-
Ducto					
		Jab	p27	c-jun	c-fos
Jab	r	-	0,316	0,000	0,103
	p-Valor	-	0,317	1,000	0,750
p27	r	0,316	-	0,000	0,325
	p-Valor	0,317	-	1,000	0,302
c-jun	r	0,000	0,000	-	0,000
	p-Valor	1,000	1,000	-	1,000
c-fos	r	0,103	0,325	0,000	-
	p-Valor	0,750	0,302	1,000	-

*p < 0,05, Correlação de Spearman (Dados expressos em forma de p-Valor e Coeficiente de Correlação (r)).