ROBERTO ANAXIMANDRO GARCIA REJAS

**ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS C-JUN E JUNB EM
CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO E ADENOCARCINOMA
POLIMORFO DE BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

São Paulo

2008

Roberto Anaximandro Garcia Rejas

**Estudo da imunoexpressão das proteínas c-jun e junB em carcinoma
adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de
malignidade de glândulas salivares**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

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

São Paulo

2008

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rejas RAG. Estudo da imunoexpressão das proteínas c-jun e junB em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

São Paulo, ____/____/____

Banca Examinadora

1) Prof(a).Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a).Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a).: _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

A Deus, pois sem a tua promessa não teria conseguido.

“Não temas, porque Eu sou contigo, não te assombres, porque Eu sou teu Deus:
Eu te esforço e te ajudo, da tua mão direita Eu te sustento”.

Isaias 41:10

Aos meus pais, Roberto e Lindaura e aos meus irmãos; Jonatan e Jaqueline que foram para mim um exemplo de vida e me deram apoio demonstrando amor incondicional.

A minha família, Dubeiza e Santiago que foram meu incentivo para continuar e acreditaram no meu sonho.

Amo vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. **Suzana Cantanhede Orisini Machado de Sousa**, pela disponibilidade e conselhos para melhorar este trabalho, pela paciência, sabedoria que demonstra ao transmitir seus conhecimentos e, principalmente por ter acreditado em mim nas diferentes atividades desenvolvidas na disciplina. O meu reconhecimento e gratidão sincera.

Aos Professores Dr. **Décio dos Santos Pinto Jr.**, Dr. **Fábio Daumas Nunes** pelo apoio, carinho e invejável dedicação à patologia, cujos ensinamentos e incentivos foram fundamentais para minha formação profissional e pessoal, minha admiração e agradecimento especial.

Ao **Dr. Marco Squadrans** pela ajuda e amizade incondicional.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, Dra. **Marília Trierveiler Martins**, Dra. **Marina Helena Cury Gallottini de Magalhães** pelos ensinamentos concedidos.

A meus amigos **Elder e Flavia, Cury, Brunno, Alexandre, Yonara, Tuti, Aluana, Fabio, Marina, Patrícia, Ângelo** pela convivência fraternal, troca de conhecimentos e muitas horas de bandeirão.

À **Renata Acay** por ter me ensinado as técnicas e a interpretação dos resultados no laboratório de imunoistoquímica e, por sua amizade e estímulo constante.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação pelas experiências e informações compartilhadas, foram muito valiosos durante todo o curso.

À **Elisa Santos** e **Bia**, minha mãe adotiva no departamento, por me acolher dia a dia fazendo minha estada no laboratório muito mais agradável. Agradeço também, pelo importante auxílio técnico prestado.

Às funcionarias da Disciplina de Patologia Bucal **Nair, Zilda** e **Neia** pela atenção prestada durante o curso.

À **Glauci Elaine Damasio Fidelis** pela eficiência, eficácia e ajuda prestada na revisão deste trabalho.

A **CAPES** pelo apoio financeiro com a bolsa de Mestrado.

Rejas RAG. Estudo da imunoexpressão das proteínas c-jun e junB em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

RESUMO

O carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade são neoplasmas de glândulas salivares. O carcinoma adenóide cístico pode apresentar-se em glândulas salivares maiores e menores, porém o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade acomete principalmente as glândulas salivares menores distribuídas na cavidade oral. Ambos os tumores compartilham muitas características comuns, como a alta propensão de invasão perineural e o padrão de infiltração: sólido, tubular e cribriforme. Mas o carcinoma adenoide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau são tipos distintos de adenocarcinomas com prognóstico diferente, que ocasionalmente podem resultar em um diagnóstico errado. As proteínas c-jun e junB são membros da família JUN, capazes de homodimerizar ou heterodimerizar com c-fos ou com outras proteínas bzip. Evidências das funções específicas das subunidades do AP-1 foram mostradas por c-jun e junB, que atuam antagonicamente no controle da transformação celular, diferenciação e expressão do AP-1 dependente do gene alvo. Mas a função de ambos é complexa e pode depender do tipo celular. O objetivo deste estudo foi determinar a expressão imunoistoquímica das proteínas c-jun e junB em 13 casos de carcinoma adenoide cístico e 12 de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares. Espécimes de mucosa normal foram incluídos e evidenciaram forte

marcação nuclear e citoplasmática para junB e c-jun respectivamente. No presente estudo, independente da arquitetura histológica, ambos tumores mostraram muitas células tumorais com marcação nuclear e citoplasmática para a proteína c-jun e ausente para a proteína junB. As lesões do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade expressaram um maior número de células com marcação nuclear quando comparados ao do carcinoma adenoide cístico de mais baixo grau. De acordo com este estudo e com alguns estudos publicados na literatura, a c-jun é expressa em tumores de baixo grau e parece estar mais relacionada à diferenciação celular do que à proliferação celular.

Palavras Chave: c-jun, junB, carcinoma adenoide cístico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Rejas RAG. c-Jun and junB immunoprofile in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma of salivary glands [Dissertação de Mestrado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2008.

ABSTRACT

Adenoid cystic carcinoma and polymorphous low grade are salivary gland neoplasms. ACC can arise in both, major or minor salivary glands. However, Polymorphous low-grade adenocarcinoma, occurs specifically in minor salivary glands dispersed in the oral cavity. They share many common histologic features, as infiltrating solid, tubular and cribriform patterns and also high propensity for perineural invasion. Nevertheless, adenoid cystic carcinoma and polymorphous low grade are distinct types of adenocarcinomas with different prognosis, which occasionally may result in a diagnostic pitfall. C-jun and junB are family JUN members that may form homodimerizes or heterodimerizes with c-fos or other bzip proteins. Evidence for specific functions of AP-1 subunits was shown for c-jun and junB, which act antagonistically to control cell transformation, differentiation and expression of AP-1 depending on the target genes. However, the role of both of them is complex and it depends on cell type. The aim of this study was to determine immunohistochemistry of c -jun and junB expression in 13 cases of adenoid cystic carcinoma and 12 cases of polymorphous carcinoma low-grade adenocarcinoma of salivary glands. Moreover slides of normal mucosa were included and there were strong nuclei and cytoplasmic for junB and c-jun respectively. In the present study, independent of the histologic architecture, in both tumors shown many tumoral cells presented nuclear and cytoplasmic staining of c-jun and were absent to the protein junB. In polymorphous low-grade adenocarcinoma lesions expressed in a

greater number cells staining than in the adenoid cystic carcinoma of the most low-grade. According with this study and with some studies of the literature, the c-jun is expressed in low-grade tumors and seems to be related to cell differentiation more than with cell proliferation.

Keywords: c-jun, junB, adenoid cystic carcinoma, polymorphous low-grade adenocarcinoma

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 – Aspectos histológicos do carcinoma adenóide cístico	40
Figura 5.2 – Aspectos histológicos do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	41
Figura 5.3 – Expressão da proteína c-jun no carcinoma adenóide cístico.....	42
Figura 5.4 – Expressão da proteína c-jun no carcinoma adenóide cístico.....	43
Figura 5.5 – Expressão da proteína c-jun no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	44
Figura 5.6 – Expressão da proteína c-jun no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	45
Figura 5.7 – Expressão da proteína junB e c-jun	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 – Dados epidemiológicos dos pacientes estudados.....	30
Tabela 5.1 – Percentual da expressão imunoistoquímica das proteínas c-jun e junB em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	39

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP-1	Ativador da proteína 1
APB	Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau
BSA	Sigla em inglês para albumina de soro bovino
c-jun	Proteína c-jun
CA	Califórnia
CAC	Carcinoma adenoide cístico
Co	Sigla em inglês “company”
DAB	Diaminobenzidina
Et al	e colaboradores
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
JunB	Proteína junB
Lido	Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia
Sup.	Superior
Tris	Tris-hidroxi-metil-aminometano
USP	Universidade de São Paulo

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Valores percentuais
°C	Graus Celsius
μl	Microlitro
ml	Mililitro
pH	Medida do potencial hidrogeniônico
μm	Micrômetro
x	vezes

SUMÁRIO

	p.
INTRODUÇÃO	15
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 Carcinoma adenóide Cístico.....	17
2.2 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	19
2.3 c-Jun e junB.....	22
3 PROPOSIÇÃO	28
4 MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Seleção dos casos e análise morfológica.....	29
4.1.1 Dados epidemiológicos dos pacientes estudados.....	29
4.2 Técnica de imunoistoquímica.....	31
4.2.1 Imunoistoquímica da proteína c-jun.....	32
4.2.1 Imunoistoquímica da proteína junB.....	33
4.3 Análise quantitativa da expressão da c-jun..	34
5 RESULTADOS	36
5.1 Aspectos histológicos do Carcinoma adenóide Cístico e Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	36
5.2 Expressão imunoistoquímica da c-jun e junB.....	37
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÕES	55
REFERÊNCIAS	56
ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma adenóide cístico representa uma neoplasia maligna originada a partir das glândulas salivares menores ou maiores, bem como pode estar localizado em outras regiões. O carcinoma adenóide cístico de glândula salivar é uma neoplasia maligna de crescimento lento caracterizada por um grande potencial de invasão aos tecidos adjacentes, além de grande propensão a recidivas e metástases. Dentre os três subtipos histológicos, o padrão sólido é reconhecidamente o de pior prognóstico.

O carcinoma adenóide cístico está entre as duas neoplasias malignas mais freqüentes acometendo as glândulas salivares, sendo a maior parte originada a partir de glândulas salivares menores. A faixa etária de maior incidência encontra-se entre a quinta e sétima décadas de vida, não apresentando uma predileção significativa por sexo.

Dentre todas as neoplasias malignas glandulares, o carcinoma adenóide cístico, sem sombra de dúvida, merece atenção distinta em função de seu aspecto microscópico, curso clínico e prognóstico.

Vários trabalhos têm sido realizados no intuito de verificar a relação entre o padrão histológico do carcinoma adenóide cístico, comportamento clínico e prognóstico.

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade é caracterizado por um crescimento lento e raramente está associada à metástase, e acomete principalmente as glândulas salivares menores. A faixa etária de maior incidência é semelhante ao carcinoma adenóide cístico assim como os aspectos histológicos,

porém o comportamento clínico, tratamento e prognóstico são completamente diferentes.

As proteínas c-jun e junB fazem parte da família JUN e juntamente com outras proteínas fazem parte do fator de transcrição AP-1(ativador da proteína 1) que regula variados processos como proliferação celular, morte, diferenciação e sobrevivência.

A atividade da proteína c-jun é induzida por diversos estímulos extracelulares e fosforilada pela família das MAPquinase (GEE et al., 2000) e cuja atividade transcricional poderia estar atenuada e/ou antagonizada por jun B. Esta proteína tem sido indicada como marcador de proliferação tumoral e mais recentemente com metástase devido ao seu envolvimento na angiogênese.

Neste trabalho propomo-nos a estudar o carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e seus subtipos histológicos, através da imunomarcagem da c-jun, junB e tentar estabelecer diferenças nos diversos padrões histológicos correlacionando ao comportamento clínico descritos na literatura.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma adenóide cístico

O Carcinoma adenóide cístico foi descrito originalmente por Robin & Laboulbene em 1853 (WHEAR; ADDY, 1993) e até 1856 foi denominado como cilindroma por apresentar uma única aparência histológica. Em 1928 foi denominado Carcinoma Adenóide Cístico, e desde então houve uma aceitação deste termo na literatura mundial (BILROTH et al., 1856).

Dentre todas as malignidades que afetam as glândulas salivares, o carcinoma adenóide cístico é considerado uma das neoplasias mais comuns, podendo ocorrer em qualquer glândula salivar. Segundo Seaver & Kuenh (1979) as glândulas parótida e submandibular são os locais mais freqüentes acontecendo cerca de 55% dos casos; por outro lado Kolude et al. (2001) e Qureshi et al. (2005) apontam as glândulas menores e a glândula submandibular como as localizações mais freqüentes sendo raramente encontrada na glândula parótida.

Quanto à faixa etária o carcinoma adenóide cístico é mais freqüente em adultos apresentando uma média de idade de 47 a 56 anos e observa-se uma discreta predileção pelo sexo feminino (RAUX-RAKOTOMALALA et al., 2003; HASHIMOTO et al., 2002).

Geralmente o tumor apresenta-se como uma massa de crescimento lento e persistente, e os sinais e sintomas irão depender, entre outros fatores de sua localização e extensão anatômica, não havendo características clínicas específicas

para determinar o diagnóstico de carcinoma adenóide cístico. O tumor tem uma predileção pela invasão perineural o que parcialmente explica a tendência à recorrência local do tumor, sendo também responsável pelo desconforto e a dor nos pacientes em aproximadamente 50% dos casos (WISEMAN et al., 2002; ELLIS; AUCLAIR, 1996; SPIRO, HUVOS, 1992).

Existem três subtipos histológicos diferentes para esta neoplasia: cribriforme, tubular e sólido; tornando à classificação difícil porque o tumor pode evidenciar mais de um subtipo histológico; portanto a classificação deverá ser feita baseada no padrão histológico predominante. Entretanto, as células tumorais que a compõem são de dois tipos: células luminais e células mioepiteliais (BARNES et al., 2005; FURUSE et al., 2005; HASHIMOTO et al., 2002).

O carcinoma adenóide cístico típico apresenta um padrão cribriforme com ninhos de células epiteliais arranjadas concetricamente formando numerosos espaços cilíndricos dando um aspecto de “queijo suíço”. Estes espaços são na sua maioria pseudocistos que apresentam no seu interior proteoglicanas e material semelhante à membrana basal.

As células que envolvem estes pseudocistos são células mioepiteliais de núcleo basofílico ovóide e citoplasma escasso. Os espaços ductais são preenchidos por material mucinoso eosinofílico e cercado por células cuboidais “duct-like” apresentando citoplasma mais volumoso e eosinofílico. As figuras de mitose são dificilmente encontradas (BARNES et al., 2005; FIGUEIREDO, 1997).

O padrão tubular é formado por estruturas ductiformes ou tubulares, envoltas por um estroma hialino. Os espaços tubulares são revestidos por células do tipo epitelial luminal, que por sua vez são cercadas por uma camada periférica de células mioepiteliais (BARNES et al., 2005; FIGUEIREDO et al., 1997).

O padrão sólido apresenta células formando lençóis ou ninhos de variados formatos e tamanhos, e ocasionalmente, áreas de necrose podem ser vistas. As células tumorais são pequenas com núcleo hipercromático denso cuja morfologia varia de cuboidal a basaloide. (BARNES et al., 2005; FIGUEIREDO, 1997).

Muito tem sido feito na tentativa de se determinar fatores prognósticos para o carcinoma adenóide cístico. Alguns desses estudos se baseiam em parâmetros clínicos, onde é levada em consideração a localização de ocorrência do tumor, outros se baseiam no padrão morfológico, onde se acredita que o subtipo sólido é mais agressivo e está relacionado a um pior diagnóstico.

Nenhum desses fatores prognósticos descritos, entretanto são inteiramente confiáveis e muitos questionamentos existem com relação a sua eficácia. Na busca de fatores prognósticos mais seguros, alguns pesquisadores tem investigado a existência de marcadores imunoistoquímicos que possam esclarecer a origem e desenvolvimento desses tumores.

No momento existe pouca evidência sobre o tratamento sistêmico que mude o curso do carcinoma adenóide cístico. Alguns demonstraram uma grande variedade de quimioterapia, porém inconsistentes e geralmente pobres.

2.2 Adenocarcinoma Polimorfo de baixo grau de malignidade

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade foi descrito por Freedman e Lumerman (1983) sob a denominação de carcinoma lobular e

posteriormente por Batsakis et al. (1984) como carcinoma do ducto terminal. Finalmente Evans e Batsakis (1984) definiram como adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade e até hoje é uma neoplasia bem estabelecida, considerando que é o segundo tipo mais comum, ocorrendo quase exclusivamente nas glândulas salivares menores. Na cavidade bucal aproximadamente 60% dos casos envolvem o palato duro, porém pode ocorrer com menor frequência em outras localizações. A faixa etária tem um pico de prevalência entre a quinta e sétima décadas da vida com predileção pelo sexo feminino em uma proporção de 2:1 (EVANS; LUNA et al., 2000).

Histologicamente o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau é caracterizado por uniformidade citológica e diversidade histológica. As células tumorais variam em tamanho de pequenas a medias, palidamente coradas com núcleos ovóides e às vezes nucléolos evidentes. A presença de mitose é incomum e necrose não é um achado típico, porém o neurotropismo é evidente. As células tumorais podem invadir glândulas salivares, músculo, tecido conjuntivo e osso (WALDROM; EL MOFTY; GNEPP, 1988; ELLIS; AUCLAIR, 1996).

Os padrões histológicos são: cribriforme (lembrando o carcinoma adenóide cístico), trabecular, tubular e lobular ou sólido. A variedade de configurações morfológicas que podem existir de um tumor para outro, ou mesmo dentro de um mesmo tumor, torna este tumor diferente.

Com o objetivo de caracterizar o componente celular do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, foi realizado um estudo morfológico e imunoistoquímico com 30 casos utilizando as citoqueratinas 7, 8, 10, 13, 14, 18, 19, vimentina e actina músculo específica. A maioria das células tumorais foi positiva para vimentina e para as citoqueratinas 8, 14 e 18 mais foi negativa para actina músculo específica. Dessa

forma os autores concluíram que o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau deriva das células da junção ácino-ducto intercalar e não das células mioepiteliais (ARAÚJO et al., 1999).

Vários estudos imunoistoquímicos já foram feitos na tentativa de descobrir marcadores eficientes para diferenciar o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau do carcinoma adenóide cístico. Entretanto, o único marcador que apresentou uma clara diferença no padrão de marcação entre esses dois tumores foi a vimentina que é negativa nas células lumbais no carcinoma adenóide cístico e positiva praticamente em todas as células neoplásicas do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade. A presença de vimentina nas células neoplásicas não é exclusiva dessas células e pode ser expressa por outras células originárias do ducto intercalar, o que justificaria a positividade da vimentina nas células do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, que se originaria das células da junção ácino-ducto intercalar (DARLING, SHNEIDER, PHILIPS, 2002; ARAÚJO et al., 2000).

As áreas cribriformes do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau e do carcinoma adenóide cístico embora sejam similares, não são idênticas, e a diferença esta na composição celular de cada uma dessas lesões que podem ser diferenciadas pelas integrinas, pelas proteínas do citoesqueleto ou por ambas (LODUCCA et al., 2003; ARAÚJO et al., 2001).

Epivatianos et al. (2007) analisaram a expressão imunoistoquímica da actina músculo liso e c-Kit em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. A marcação foi positiva para actina músculo liso em todos os carcinomas adenóide císticos e em 25% dos adenocarcinomas polimorfos de baixo grau. A imunoreatividade para o c-Kit foi positiva para 83% e 41% dos casos respectivamente. O padrão de expressão de ambos os marcadores, c-Kit e actina

músculo liso, nas estruturas tubulares do carcinoma adenóide cístico e do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau foram diferentes. Os autores concluíram que os marcadores usados c-Kit e actina músculo liso alfa podem auxiliar no diagnóstico diferencial entre as duas neoplasias. Outros autores concluíram que os marcadores c-Kit e actina músculo liso alfa são estatisticamente significantes e sugerem como painel para distinguir essas duas neoplasias (BELTRAN et al., 2006).

2.3 C-JUN e JUNB

As proteínas c-jun e junb são membros da família JUN e fazem parte juntamente com a família de proteínas FOS, MaF e ATF do fator de transcrição AP-1 (Ativador da proteína 1) que regula variados processos, como proliferação celular, morte, sobrevivência e diferenciação.

A família JUN é composta também pela proteína jun D onde o c jun é o mais potente ativador transcricional deste grupo e cuja atividade transcricional é atenuada e/ou antagonizada por jun B. As diferentes proteínas da família JUN e da família de proteínas FOS são capazes de formar homo ou heterodímeros estáveis que se ligam ao DNA no sítio regulatório denominado sítio de união (ligação) do AP-1 que regula a transcrição dos genes alvos, positivamente ou negativamente, dependendo da composição dos dímeros (SASSONE-CORSI et al., 1988; RYSECK; BRAVO, 1991; SHUTTE et al., 1989).

Com o aumento das evidências que o fator de transcrição AP-1 participa ativamente nos processos de proliferação celular, os pesquisadores começaram a

avaliar qual seria o papel desse fator de transcrição e seus variados componentes na promoção tumoral, considerando que a família AP-1 é um dos alvos nucleares para uma série de vias de tradução de sinal, sendo de particular interesse a ação da via RAS-MAPquinase (HILL; TRIESMAN et al., 1995), principalmente porque essa via apresenta-se freqüentemente desregulada pela ativação de vários oncogenes.

Estudos iniciais mostraram que os sítios de acoplamento e substratos específicos do JNK 1 e JNK 2 são diferentes; que a proteína c-jun esta preferencialmente ligada e fosforilada por JNK 1 e ATF 2 fosforilado e ligado a JNK 2 (KALLUNKI et al., 1996).

A atividade da proteína c-jun é induzida por estímulos extracelulares (fatores de crescimento, estresse celular, citocinas e estímulos constantes de UV) e fosforilado por JNK (JUNquinase) nos sítios específicos Ser-63 e Tyr-73. Outras proteínas da família AP-1, incluindo jun B, jun D e ATF 2 também podem ser ativadas por JNK (IP, 1998; PULVERER et al., 1991).

Volm et al. (1993) analisaram a expressão imunoistoquímica de algumas proteínas, entre elas c-jun, e a relacionaram com o prognóstico de 121 pacientes com carcinoma de pulmão. Os autores constataram que os pacientes que exibiram a superexpressão da proteína c-jun tiveram uma sobrevida significativamente menor de aqueles que não apresentaram superexpressão dessa proteína. Nesse trabalho, as análises univariada (Kaplan-Meier-estimates) e multivariada (Cox-regression-model) revelaram que a expressão da proteína c-jun é um importante fator prognóstico dessa doença. Esses autores constataram, em outro trabalho --no qual foram estudados 217 pacientes com câncer de pulmão de grandes células --, que tumores com superexpressão da proteína c-jun apresentaram um número significativamente maior de metástase.

Gee et al. (2000) realizaram um trabalho avaliando com reações imunoistoquímicas a expressão do c-jun em carcinomas epidermóides de mama e associação com suas características clínicas e biológicas. Foi observado que o c-jun apresentou uma associação positiva com os elementos de sinalização da MAPquinase, fator de crescimento alfa, fator de crescimento epidérmico e com a JUNquinase (JNK), enquanto que a associação com c-fos foi pequena, talvez indicando que pudesse haver outros componentes do fator AP-1 presentes. Também não foi observada associação entre o aumento do c-jun com proliferação e a gradação histológica dos pacientes. Com base nestes resultados os autores sugeriram que a alteração dos componentes do fator de transcrição AP-1 pode influenciar os aspectos fenotípicos dos carcinomas de mama.

Langosh et al. (2000) estudaram a expressão de várias proteínas envolvidas no ciclo celular, correlacionando-as como os membros da família AP-1 (c-fos, fos-B, fra-1, fra-2, c-jun, jun B, jun D) em 53 casos de carcinoma de mama e quatro linhagens celulares, através de análise pela técnica Western-Blot. Foi observado que ocorreram varias relações entre ambos grupos: enquanto c-jun foi associado com a expressão da pRb, a alta expressão de jun D e c-fos estavam associadas também com a alta expressão da ciclina E. A super expressão do fos-B foi detectada principalmente nos casos com grande marcação para pRb e fraca positividade para o p16. A expressão do fra-1 foi também associada com a super expressão das ciclinas D1 e E, enquanto que a expressão do fra -2 correlaciona-se tanto com a ciclina D1 como com a ciclina E. com estes resultados os autores sugeriram que pode haver uma ativação direta ou indireta das proteínas no ciclo celular com os complexos protéicos da família do fator de transcrição AP-1, que fatores

estimuladores ou inibidores do ciclo celular podem depender da abundância de tipos específicos de proteínas pertencentes à família do fator de transcrição AP-1.

Meyers et al. (2000) realizaram um estudo para determinar o efeito do bloqueio do fator de transcrição AP-1 no crescimento de células normais, imortais e malignas da região de mama, utilizando um mutante com o domínio c jun negativo. Foi observado primeiramente que a utilização deste mutante inibiu a atividade do fator AP-1 nas células normais e também nas malignas, e que a formação de colônias também foi inibida nas células imortais. Com base nestes resultados os autores demonstraram que as células normais, imortais e algumas linhagens de células malignas necessitam do fator AP-1 para a tradução dos sinais proliferativos nas células, sugerindo que o fator de transcrição AP-1 pode ser um alvo para o desenvolvimento de futuros agentes para a prevenção ou tratamento dos cânceres de mama.

Sousa et al. (2002) estudaram a proteína c jun, comparando sua expressão imunoistoquímica, em 20 casos de carcinoma epidermóide de boca e em 15 de tecido normal de mucosa. Os autores constataram que a c jun está expressa tanto no carcinoma epidermóide como no tecido normal. Porém, a diferença é que nas mucosas, essa proteína é expressa no citoplasma das células das camadas superiores e, nos carcinomas, a expressão é nuclear. Os autores consideraram essa diferença como um importante indicativo de participação dessa proteína nos casos de carcinoma epidermóide bucal.

Stepniak et al. (2006) demonstraram uma fraca regeneração após a hepatectomia parcial em fígado de ratos. Este fenótipo se correlacionava com os aumentos dos níveis de proteína p21 inibitórias da cdKs nos fígados de ratos. Os autores pesquisaram várias vias implicadas na regulação de expressão da proteína

p21, e foi observado a atividade da Stress Kinase p38 na regeneração. É importante mencionar que a deleção condicional de p38 alfa restabelece completamente a proliferação e atenua os níveis da proteína p21 após hepatectomia parcial. Neste estudo os autores concluíram que os dados demonstraram que o c-jun/AP1 regula a regeneração hepática através de vias moleculares que envolvem p53, p21 e a Stress Kinase p38 alfa.

Vleugel et al. (2006) analisaram 103 casos de câncer de mama invasivo com o anticorpo c-jun fosforilado em serina 73. C-jun ativado foi observado predominantemente expresso no núcleo, na frente de invasão em 38% dos casos e 50% dos casos houve marcação para as células mitóticas. Ocasionalmente fibroblastos, células endoteliais e células de mama benignas, mostraram também marcação nuclear. Desta maneira os autores concluíram que os resultados mostraram que ativado, o c-jun é predominantemente expresso na frente de invasão em câncer de mama e que está relacionado com proliferação e angiogênese.

Vasilevskaya & O'Dwyer (2003) acreditam que as vias de sinalização da c-jun e JNK são importantes determinantes para o crescimento tumoral, como para as respostas a terapias, e também no estudo do potencial de valor prognóstico de marcadores apoptóticos. Os autores estudaram os efeitos transcricionais de JNK e as interações com outras proteínas na mediação de morte celular de algumas drogas. Em certos tipos celulares, segundo os autores, a superexpressão da c-jun era claramente a base da resistência do DNA aos danos provocados pelas drogas. Finalmente os autores concluíram que mais estudos são necessários para avaliar o potencial da via JNK como o alvo.

Baseados na revista da literatura, foi evidente dos autores a busca de marcadores biológicos que aliados aos parâmetros clínicos e histológicos auxiliem o estabelecimento do diagnóstico, prognóstico e tratamento dos tumores de glândula salivar. Com base nestes aspectos surgiu a idéia de estudar nos tumores de glândula salivar a expressão de alguns marcadores imunoistoquímicos relatados na literatura.

3 PROPOSIÇÃO

A proposta deste trabalho é avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas c-jun e junB em neoplasias malignas de glândulas salivares, especificamente, no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade e estabelecer diferenças através da imuno-marcação nos diversos padrões histológicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo foi aprovado, em 07/08/2007, pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo com o número do protocolo do parecer 86/07 (Anexo A).

4.1 Seleção dos casos e análise morfológica

Para o estudo, foram selecionados 13 casos de carcinoma adenóide cístico e 12 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade do Laboratório de Patologia Cirúrgica da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da FOUSP. As lâminas referentes aos casos e coradas pela técnica da hematoxilina e eosina foram submetidas novamente a um estudo morfológico em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico e classificação em subtipos histológicos.

4.1.1 Dados epidemiológicos dos pacientes estudados

Foram analisados 25 pacientes, sendo 13 casos de carcinoma adenóide cístico e 12 de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade. No

carcinoma adenóide cístico 7 eram do sexo masculino e 5 do sexo feminino, e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade 9 eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino. A idade variou de 32 a 70 anos, com média de 44,6 anos (CAC); e de 11 a 75 anos, com média de 43.8 anos (APB). Em relação à cor da pele, 10 eram leucodermas, 2 melanodermas, um não tinha essa característica relatada na ficha (CAC); e 5 eram leucodermas, 5 melanodermas, dois não tinham essa característica relatada na ficha (Tabela 4.1).

Tabela 4.1 – Dados epidemiológicos dos pacientes estudados

Nº	Número de Exame	Sexo	Idade	Cor da pele	Localização
1.	44169-APB	F	45	Melanoderma	Palato duro
2	46666-APB	F	/	/	Palato mole
3	43920-APB	F	36	Melanoderma	Mucosa labial sup
4	52446-APB	F	72	Melanoderma	Mucosa jugal
5	42533-APB	M	11	Melanoderma	Mucosa jugal
6	44049-APB	F	47	Leucoderma	Palato mole
7	48056-APB	F	52	Leucoderma	Palato mole
8	33473-APB	F	72	/	Mucosa jugal
9	48960-APB	M	49	Melanoderma	Trígono R.Sup.
10	41858-APB	F	/	Leucoderma	Palato duro
11	49279-APB	M	75	Leucoderma	Mucosa jugal
12	41007-APB	F	67	Leucoderma	L.I.P
13	38194-CAC	F	32	Leucoderma	Tuber+Trígono
14	52002-CAC	F	36	Leucoderma	Mucosa jugal continua

conclusão

15	9109-CAC	M	57	Leucoderma	Palato
16	44192-CAC	M	34	Leucoderma	Tuber+Trígono
17	30053-CAC	/	/	/	Palato
18	49977-CAC	F	70	Leucoderma	Mucosa labial sup.
19	46609-CAC	F	35	Melanoderma	Palato duro
20	51033-CAC	F	45	Leucoderma	Mento
21	38700-CAC	M	45	Melanoderma	R. retromolar
22	43381-CAC	M	45	Leucoderma	Mucosa jugal
23	20435-CAC	M	69	Leucoderma	Maxila
24	58981-CAC	F	47	Leucoderma	Assoalho bucal
25	39961-CAC	F	65	Leucoderma	Palato

4.2 Técnica de imunoistoquímica

A técnica de imunoistoquímica foi a mesma utilizada no Laboratório de Imunoistoquímica da disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. Foram utilizados cortes de 3 micra de espessura no material embocado em parafina e estendidos em lâminas de vidro previamente lavadas em álcool absoluto, secas e mergulhadas

durante 1 minuto em solução de 3-aminopropytriethoxy-silane (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO/USA) a 10% em álcool absoluto. Os primeiros passos foram iguais para os dois anticorpos. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, um a 60° C durante 30 minutos e outro à temperatura ambiente por 20 minutos. Em seguida, foram reidratados em série descendente de etanol, com três passagens em etanol absoluto, seguidas por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada uma. Com a finalidade de remover o pigmento formólico, os cortes foram imersos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica a 95% durante 10 minutos. Posteriormente, foram lavados em água corrente por 10 minutos e submetidos a dois banhos em água destilada de 5 minutos cada uma.

4.2.1 Imunoistoquímica da proteína c-jun

Os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica com tampão citrato a 10mM, pH 6.0 por 30 minutos em banho-maria. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com dois banhos de 15 minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1 v/v). Os cortes foram encubados “overnight” por 18 horas com o anticorpo primário anti-c-jun (clone AP-1 Santa Cruz, CA) em cuba úmida à temperatura de 4° C, na diluição de 1:200. As secções foram encubadas em um ciclo de kit EnVision Rabbit (Dako Corporation) por 30 minutos para bloqueio da biotina endógena e lavadas com TBST pH 6.0. A reação de revelação foi o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3- diaminobenzidina, Sigms Chemical Co., St. Louis, MO/USA). Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com a hematoxilina de Mayer.

4.2.2 Imunoistoquímica da proteína junB

Os cortes receberam tratamento para recuperação antigênica com tampão citrato a 10mM, pH 6.0 por 30 minutos em banho-maria. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com dois banhos de 15 minutos cada um em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1 v/v). Os cortes foram encubados “overnight” por 18 horas com o anticorpo primário anti-junB (clone C-11 Santa Cruz, CA) em cuba úmida à temperatura de 4°C, na diluição de 1:50. As secções foram encubadas em um ciclo de kit EnVision Mouse (Dako Corporation) por 30 minutos para bloqueio da biotina endógena e lavadas com TBST pH 6.0. A reação de revelação foi realizada com o cromógeno diaminobenzidina 0,025% (DAB, 3,3-diaminobenzidina, Sigms Chemical Co., St. Louis, MO/USA). Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com a hematoxilina de Mayer previamente filtrada. Os passos seguintes foram desidratação em uma cadeia ascendente de etanol seguindo a sequenciade 70%, 90% e 100% durante 3 minutos cada banho e diafanização em xilol (2 banhos de 5 minutos cada). As lâminas de vidro foram então montadas com laminulas de vidro e com Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Como controle negativo não foi realizada a incubação com o anticorpo primário, e como controle positivo foi utilizado um bloco parafinado de carcinoma epidermóide e mucosa normal de boca testados e positivo para c-jun e junB. Controles positivos internos, como epitélio estratificado da mucosa de revestimento

estavam presentes na maioria dos casos. Tecidos de glândula salivar normal estavam presentes na maioria dos casos estudados e também foram avaliados.

4.3 Análise quantitativa da expressão das proteínas c-jun e junB

A análise quantitativa das células positivas para as proteínas estudadas foi realizada por apenas um observador. As células consideradas positivas foram as que exibiram marcação nuclear de coloração acastanhada. A intensidade da marcação não foi avaliada. As imagens de cada campo foram obtidas por um microscópio de luz, com aumento final de 400 vezes, sob um foco fixo com clareza de campo. Em seguida, as imagens foram transferidas para um monitor de TV conectado a um sistema computadorizado, no qual foi realizada a contagem manual dos núcleos que expressavam as proteínas. Cada proteína foi contada separadamente pelo software Imagelab-Softium.

O sistema computadorizado consiste em um computador Pentium 200MHz com placa de aquisição de imagem captivator. As imagens do campo obtidas em um microscópio Laborlux-Leitz, acoplado a um sistema de câmeras JVC modelo TK 870 U, foram transferidas para um monitor de TV Multisystem M700. O software Imagelab-Softium foi desenvolvido no Laboratório de Informática Dedicado a Odontologia (Lido), da disciplina de Patologia Bucal do Departamento de Estomatologia da FOUSP.

A contagem manual das proteínas estudadas foi realizada de acordo com os núcleos positivos em 500 células. Os campos eleitos para a contagem foram selecionados aleatoriamente.

5 RESULTADOS

5.1 Aspectos histológicos do carcinoma adenóide cístico e do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Os casos de carcinoma adenóide cístico estudados incluíram casos do tipo tubular, cribriforme e sólido.

O subtipo tubular apresentou células cuboidais de citoplasma eosinofílico e escasso, arranjadas em estruturas ductiformes de duas camadas de células.

No subtipo histológico cribriforme as células arranjam-se em ilhas contendo múltiplos espaços pseudocísticos caracterizando o aspecto cribriforme. Individualmente as células eram cuboidais, com citoplasma claro e escasso e núcleos ovalados (Figura 5.1).

A variante sólida do carcinoma adenóide cístico apresentava arranjos celulares em ninhos sólidos de tamanhos e formas variadas, formando às vezes espaços semelhantes a ductos de variados tamanhos. As células neoplásicas apresentavam morfologia cuboidal com núcleos ovais e hipercromáticos. O citoplasma apresenta-se claro e escasso (Figura 5.1).

Os espécimes de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade estudados eram compostos por uma variada combinação de padrões: células neoplásicas formando lóbulos, arranjadas em ilhas sólidas, estruturas tubulares ductiformes com uma camada única de células; ilhas de células com múltiplos espaços pseudocísticos (aspecto cribriforme). Apesar da mistura, as células

neoplásicas eram caracterizadas por um aspecto monótono e ausência de atipia celular. Individualmente as células apresentavam morfologia cuboidal ou colunar, com contorno oval ou vesicular, cromatina dispersa e nucleolo pequeno. Em algumas áreas podiam-se observar células neoplásicas com núcleos pequenos, fusiformes e mais basofílicos com pouco ou quase nenhum citoplasma (Figura 5.2).

As amostras que apresentavam tecido glândular normal, compreendiam em sua maioria glândulas salivares menores. As lâminas coradas coradas pela técnica de hematoxilina e eosina e observadas sob microscópio de luz, revelaram parênquima glandular composto de unidades secretoras de tamanhos variados, separados por septos fibrosos, constituídas por células mucosas e/ou serosas circundadas por membrana basal e envolvidas por células mioepiteliais, nem sempre detectáveis pela microscopia de luz.

As células serosas eram triangulares e trapezoideais, com ápice voltado para a superfície luminal, citoplasma abundante, granuloso e eosinofílico, e núcleo arredondado localizado no polo basal.

As células mucosas apresentavam citoplasma abundante, claro e núcleo arredondado voltado para a basal.

Foi vista a presença de ductos excretores revestidos por células colunares com núcleo central e citoplasma eosinofílico.

5.2 Expressão imunoistoquímica das proteínas c-jun e junB

Dois marcadores foram testados neste trabalho numa tentativa de estabelecer uma correlação entre eles e o comportamento biológico dos tumores estudados.

Foram consideradas positivas para o c-jun e junB, as células que apresentavam reação estritamente nuclear de coloração acastanhada ou amarronzada. Marcação citoplasmática não foi considerada em nosso estudo, embora tenha sido observado expressão citoplasmática das proteínas c-jun e junB.

A marcação imunoistoquímica do c-jun no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade foi de maneira aleatória no citoplasma e no núcleo das células neoplásicas, independente do padrão morfológico, variando de 0% a 45% no carcinoma adenóide cístico e de 1.2 a 63.4% no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (Tabela 5.2).

No padrão tubular por vezes as células luminais das estruturas ductais eram positivas. As células que revestiam os espaços pseudocísticos, no padrão cribriforme, as estruturas ductais e as células não luminais exibiram positividade, porém era possível observar em varias ocasiões que as células não exibiam positividade nuclear para a proteína c-jun. O padrão sólido exibiu células c-jun positivas tanto na periferia como na região central dos ninhos ou lençóis (Figura 5.3)

Submetemos, também, nossa amostra à técnica da imunoistoquímica com a proteína junB, em nenhum dos casos estudados a marcação nuclear esteve presente, ao passo que, a imunomarcação citoplasmática foi vista em alguns casos de carcinoma adenóide cístico e do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (Figura 5.4).

Tabela 5.1 Percentual da expressão imunoistoquímica das proteínas c-jun e junB em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Nº	Caso-Subtipo	c-jun (%)	Expressão	junB (%)
1	APB	63.2	Forte	0
2	APB	1.4	Fraca	0
3	APB	4.4	Fraca	0
4	APB	63.4	Forte	0
5	APB	55.2	Forte	0
6	APB	3.6	Fraca	0
7	APB	1.6	Fraca	0
8	APB	41.4	Moderada	0
9	APB	1.4	Fraca	0
10	APB	46.8	Moderada	0
11	APB	1.2	Fraca	0
12	APB	40	Moderada	0
13	CAC-Cribriforme	9	Fraca	0
14	CAC-Sólido	36	Moderada	0
15	CAC- Cribriforme	9.2	Fraca	0
16	CAC- Sólido	16	Moderada	0
17	CAC- Sólido	45.4	Moderada	0
18	CAC- Sólido	3	Fraca	0
19	CAC- Cribriforme	28	Moderada	0
20	CAC- Cribriforme	0	-----	0
21	CAC-Sólido	0	-----	0
22	CAC- Cribriforme	12.8	Fraca	0
23	CAC-Sólido	0	-----	0
24	CAC- Cribriforme	16.4	Moderada	0
25	CAC- Cribriforme	0	-----	0

*Expressão fraca de 0-15% de marcação nuclear.

*Expressão moderada de 16-49% de marcação nuclear.

*Expressão forte de 50-100% de marcação nuclear.

Nos casos de glândula salivar normal a marcação foi positiva nas células lumbais dos ductos, marcando núcleo e citoplasma, predominantemente citoplasma. As células acinares e mucosas apresentavam-se sem marcação.

Figura 5.1 - Carcinoma Adenóide Cístico
A: Padrão cribriforme. Aspectos histopatológicos em hematoxilina e eosina (100x)
B: Padrão sólido. Aspectos histopatológicos em hematoxilina e eosina (100x)

Figura 5.2 - Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade aspectos histopatológicos em hematoxilina-eosina.

A: Área lobular (aumento original 100x)

B: Área tubular (aumento original 100x)

Figura 5.3 - Carcinoma adenóide cístico - Subtipo Cribriforme
A-B: Marcação da c-jun nuclear e citoplasmática
Imunoistoquímica (aumento original 400x).

Figura 5.4 - Carcinoma adenóide cístico - Subtipo sólido
A-B: Marcação nuclear da c-jun em áreas centrais e periféricas
Imunoistoquímica (aumento original 400x).

Figura 5.5 - Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade
A: Expressão nuclear e citoplasmática da c-jun nas estruturas ductais.
Imunoistoquímica (aumento original 400x).
B: Expressão nuclear da c-jun nas estruturas tubulares.
Imunoistoquímica (aumento original 400x).

Figura 5.6 - Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade
A: Expressão da c-jun no lençol de células neoplásicas, nuclear e citoplasmática. Imunoistoquímica (aumento original 400x).
B: Expressão da c-jun nos ductos de glândula salivar. Imunoistoquímica (aumento original 100x).

Figura 5.7 - Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade - Controle interno
A: Ausência de expressão da junB nas células tumorais.
Imunoistoquímica (aumento original 100x).
B: Expressão nuclear e citoplasmática da c-jun nas células tumorais
Imunoistoquímica (aumento original 100x).

6 DISCUSSÃO

O interesse pelo estudo das bases moleculares que participam dos processos de diferenciação, proliferação e morte celular, processos que envolvem também a carcinogênese e desenvolvimento de várias neoplasias, sempre foi amplamente demonstrado pelas pesquisas a nível mundial, tornando a pesquisa muito mais intensa sobre estes assuntos importantes. O emprego de marcadores na avaliação do comportamento biológico no carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade de glândulas salivares é notório, mas ainda não há resultados elucidativos. Portanto, nosso trabalho teve como objetivo estudar a expressão das proteínas c-jun e junB, através da técnica de imunoistoquímica em carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.

Neste estudo, os casos estudados eram provenientes exclusivamente de glândulas salivares menores. Em ambos os tumores houve uma predileção pelo sexo feminino. A idade dos pacientes apresentou uma média de 44.6 anos de idade no carcinoma adenóide cístico e 43.8 anos de idade no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade. Esses dados epidemiológicos acima citados foram muito similares aos descritos na literatura que relata as lesões com picos de prevalência entre a quinta e sétima décadas de vida, com predileção pelo sexo feminino e ocorrendo na maioria dos casos em glândulas salivares menores (GNEEP; CHEN; WARREN, 1988; GARDEN et al., 1995; HADDAD et al. 1995; KHAN et al., 2001; CHUMMUN et al., 2001; KOLUDE, LAWYOIN, AKANG, 2001; QURESHI et al., 2005).

Apesar de essas duas lesões apresentarem aspectos histológicos similares como os padrões de distribuição celular, além do neurotropismo, a distinção histológica entre o carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade se faz baseada principalmente nos aspectos citológicos. Essa diferenciação é de extrema importância visto que as duas neoplasias apresentam comportamentos biológicos bastante distintos, merecendo condutas clínicas diferentes. Enquanto o carcinoma adenóide cístico apresenta localmente um alto índice de recorrência, além de produzir metástases à distância, o adenocarcinoma polimorfo de baixa malignidade raramente metastatiza (SPIERS et al., 1996; YASUMATSU et al., 2004; BARNES et al., 2005; RAPIDIS et al., 2005).

6.1 Expressão imunoistoquímica do c-jun

Apesar dos muitos estudos disponíveis sobre a expressão da proteína c-jun em neoplasias malignas, não existe nenhum relato sobre a expressão dessa proteína em neoplasias de glândulas salivares o que torna o presente trabalho inédito.

Nos casos de carcinoma adenóide cístico e no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade, o padrão de marcação para a proteína c-jun foi de maneira aleatoria, no núcleo das células neoplásicas, independente do padrão morfológico, variando de 0% a 45% no carcinoma adenóide cístico e de 1.2 a 63.4% no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (Tabela 5.2).

Dos 13 casos de carcinoma adenóide cístico estudados 9 casos exibiram expressão fraca e nos outros 4 a expressão foi moderada. No adenocarcinoma polimorfo de baixo de malignidade dos 12 casos estudados 6 casos mostraram expressão fraca, 3 casos expressão moderada e nos outros 3 a expressão foi forte. Eventualmente pudemos perceber, também, que 4 dos 6 casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade com expressividade moderada a forte eram localizados em mucosa jugal.

Comparando-se a quantidade de marcação entre os subtipos histológicos do carcinoma adenóide cístico foi observado que não houve um padrão específico, variando a quantidade de marcação entre os mesmos subtipos (cribriforme-cribriforme) e entre subtipos diferentes (cribriforme-sólido). Uma associação entre o padrão de marcação e o comportamento clínico de cada subtipo histológico não pode ser determinada; onde se acredita que o subtipo histológico sólido é o mais agressivo e esta relacionado a um pior diagnóstico, seguidos dos padrões cribriforme e tubular (YAMAMOTO et al., 1998).

No adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade também não houve um padrão específico, a expressão foi variável nos diferentes padrões encontrados: lobular ou sólido, cribriforme e tubular.

Agora, comparando-se a quantidade de marcação entre o carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade observou-se uma maior expressão no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade com uma média de 26.8% em relação ao carcinoma adenóide cístico que teve uma média de 14.1%.

Essa positividade foi demonstrada pela marcação nuclear das células contadas. Porém, em alguns casos considerados negativos pudemos observar uma

marcação citoplasmática da proteína, o que foi relatado por alguns autores. No trabalho realizado por Sousa et al. (2002) foi estudada a expressão das proteínas c-jun e c-fos em mucosas normais e em carcinomas epidermóides bucais, e constataram que a c-jun foi expresso no citoplasma da mucosa normal em todas as camadas do epitélio, exceto na camada basal. Nos carcinomas, a c-jun foi expressa mais fortemente no núcleo nos bem diferenciados. Nos moderadamente diferenciados a expressão foi menor e ausente nas lesões indiferenciadas.

Ainda Karamouzis et al. (2004) estudaram, na laringe, lesões com variados graus de atipia e carcinoma epidermóide. Os 100 pacientes com câncer analisados por eles foram divididos em: 45 tumores bem diferenciados, 43 moderadamente diferenciados e 12 indiferenciados, como. Os autores consideraram positivos os tumores com mais de 5% das células marcadas e também avaliaram a intensidade da marcação da proteína nos carcinomas considerados positivos. Os autores não encontraram diferenças estatísticas na expressão da proteína entre os grupos de carcinomas estudados. Porém, de maneira geral, das 100 lesões analisadas, 12 foram avaliadas como negativas, 4 classificadas como lesões bem diferenciadas, 6 moderadamente diferenciadas e duas indiferenciadas. Esse percentual de lesões negativas foi de 12%. Contudo, foram consideradas negativas neste estudo as lesões com menos de 1% das células marcadas. Avaliando-se separadamente os grupos, o percentual de lesões negativas, em relação a cada grupo, aumenta de acordo com a indiferenciação – no grupo de lesões bem diferenciadas é de 9%; no grupo de lesões moderadamente diferenciadas é de 14%; e no grupo de lesões indiferenciadas é de 17%.

No estudo realizado por Aburad (2006) em carcinomas epidermóides bucais foi evidenciado que o número de células que expressaram a proteína c - jun foi

maior nos casos de baixo grau de malignidade, considerando que esses tumores são mais diferenciados.

Sabemos através da literatura que diferentes formações de heterodímeros envolvendo variados constituintes da família JUN e outras famílias podem resultar muitas vezes em diversos processos celulares. Acredita-se que também pode haver uma ativação direta ou indireta das proteínas no ciclo celular com os complexos protéicos da família do fator de transcrição AP-1, e que fatores estimuladores ou inibidores do ciclo celular podem depender da abundância de tipos específicos de proteínas pertencentes à família do fator de transcrição AP-1 (SASSONE-CORSI et al., 1988; RYSECK; BRAVO, 1991; SCHUTTE et al., 1989; LANGOSH et al., 2000).

Mas não só o tipo dos seus dímeros é decisivo, como também o meio celular em que se encontram interagindo, fazendo com que a célula entre em proliferação, diferenciação ou finalmente sofra um processo de apoptose (HILBERG; WAGNER, 1992; LOHMAN et al., 1997).

Volm et al. (1993) analisaram a expressão imunoistoquímica de algumas proteínas, entre elas c - jun, e a relacionaram com o prognóstico de 121 pacientes com carcinoma de pulmão. Os autores constataram que os pacientes que exibiram a superexpressão da proteína c - jun tiveram uma sobrevida significativamente menor de aqueles que não apresentaram superexpressão dessa proteína. Revelaram que a expressão da proteína c - jun é um importante fator prognóstico dessa doença. Esses autores constataram, em outro trabalho --no qual foram estudados 217 pacientes com câncer de pulmão de grandes células -, que tumores com superexpressão da proteína c - jun apresentaram um número significativamente maior de metástase.

Vleugel et al. (2006) analisaram 103 casos de câncer de mama invasivo com o anticorpo c - jun fosforilado em serina 73. C-jun ativado foi observado predominantemente expresso no núcleo, na frente de invasão em 38% dos casos e 50% dos casos houve marcação para as células mitóticas. Desta maneira os autores concluíram que os resultados mostraram que ativado, o c - jun é predominantemente expresso na frente de invasão em câncer de mama e que está relacionado com proliferação e angiogênese.

Há uma tendência grande na literatura de se relacionar a maior expressão da proteína c - jun primeramente à proliferação celular, diferenciação e até como fator prognóstico e metástase.

Neste estudo, consideramos que como o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade apresentou um maior número de células que expressaram a proteína c-jun nuclear, e sendo ele comparado ao carcinoma adenóide cístico de mais baixo grau de malignidade, a expressão de c-jun parece estar mais relacionada à diferenciação celular do que à proliferação.

Relacionando a expressão do c-jun com as variáveis idade, sexo, raça, não observamos uma correlação com significância estatística, fato este também observado nos trabalhos descritos na literatura (GEE et al., 2000; NEPHEW et al., 2000; MEYERS et al., 2001)

6.1 Expressão imunoistoquímica do junB

Ao contrario da proteína c-jun, são escassos os relatos na literatura sobre a expressão da junB em neoplasias malignas em geral, porém diversos trabalhos revelaram a ação antagonista entre as proteínas junB e c-jun sobre funções específicas como o controle de transformação celular, diferenciação e expressão do factor de transcrição AP-1 (CHIU; ANGEL; KARIN, 1989; SCHUTTE et al., 1989; DENG; KARIN, 1993; BAKIRI et al., 2000; SZABOWSKI et al., 2000; WINTER et al., 2002).

A proteína junB no presente trabalho foi expressa no citoplasma das células neoplásicas. O carcinoma adenóide cístico e o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade foram negativos para a expressão nuclear.

Utilizamos como controle para verificar a eficiência da reação imunoistoquímica da proteína junB cortes de mucosas normais. Todos os tecidos controles apresentaram marcação nuclear em todas as camadas do epitélio.

Embora no nosso estudo só tenhamos avaliado a marcação destes dois componentes, podemos supor os casos que apresentaram expressão da proteína c-jun provavelmente tiveram da proteína junB por ela inibida.

Em mucosas normais a proteína c-jun é expressa no citoplasma celular ao contrario da proteína junB que é expressa no núcleo (SOUSA et al., 2002).

Vasilevskaya & O'Dwyer (2003) acreditam que as vias de sinalização da c-jun e JNK são importantes determinantes para o crescimento tumoral, como para as respostas a terapias, e também no estudo do potencial de valor prognóstico de marcadores apoptóticos. Os autores estudaram os efeitos transcricionais de JNK e as interações com outras proteínas na mediação de morte celular de algumas drogas. Em certos tipos celulares, segundo os autores, a superexpressão da c-jun era claramente a base da resistência do DNA aos danos provocados pelas drogas.

Finalmente os autores concluíram que mais estudos são necessários para avaliar o potencial da via JNK como alvo.

Gurzov et al. (2008) investigaram o potencial terapêutico do inibidor SP600125 e do shRNA (short hairpin RNA) reduzindo a expressão da junB em células transformadas usando RNA interference (RNAi). A redução da junb (junB-knockdown) levou a um incremento do número de células e da tumorigênese em fibroblastos selvagens; por outro lado quando a c-jun se encontrava inativa (c-jun-knockout) nas células, os autores observaram apoptose e diminuição da proliferação. Esses resultados indicaram que na ausência de c-jun, junB pode atuar como promotor tumoral. Os autores concluíram que a inativação de ambas as proteínas, c-jun e junB, e uma combinação destes dois tratamentos pode proporcionar uma estratégia valiosa para a terapia antitumoral.

Diante dos nossos resultados serão necessários mais estudos para que possamos entender como essas proteínas, através de sua via de sinalização, realizam o processo de transcrição dos diversos mecanismos celulares.

7 CONCLUSÕES

Baseados nos resultados dos estudos imunoistoquímicos da proteína c-jun e junB, no carcinoma adenóide cístico e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de intensidade, concluímos que:

7.1 A expressão da proteína c-jun é independente da arquitetura histológica apresentado nas neoplasias estudadas.

7.2 O padrão de marcação da proteína c-jun parece estar mais associado à diferenciação celular do que a proliferação.

REFERÊNCIAS ¹

Aburad ATT. Expressão das proteína ciclina D1, c-jun, retinoblastoma e pesquisa do HPV em carcinoma epidermóide bucal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

Araujo V, Sousa S, Jaeger M, Jaeger R, et al. Characterization of the cellular component of polymorphous low-grade adenocarcinoma by immunohistochemistry and electron microscopy. *Oral Oncol* 1999;35(2):164-72.

Araujo VC, de Sousa SO, Carvalho YR, de Araujo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. *Immunohistochem Mol Morphol* 2000;8(3):195-02.

Araújo VC, Loduca SVL, Sousa SOM, Williams DM, Araújo NS. The Cribiform Features of Adenoid Cystic Carcinoma and Polymorphous Low-Grade Adenocarcinoma: Cytokeratin and Integrin Expression. *Annals Diagnostic Pathol* 2001;5:330-4.

Bakiri L, Lallemand D, Bossy-Wetzel E, and Yaniv M. (2000). Cell cycle-dependent variations in c-Jun and JunB phosphorylation: a role in the control of cyclin D1 expression. *EMBO J* 2000;19:2056–68.

Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. 1ed. Lyon: IARC press; 2005. cap.5, p221-4.

Batsakis JG. Pathology consultation. Nomenclature of developmental tumors. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 1984;93(1 Pt 1):98-9.

Beltran DMD, William C. Faquin MD, PhD, George Gallagher DMD, DMSc and Meredith August DMD, MD. Selective immunohistochemical comparison of polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2006;64(3):415-23.

Bilroth T. Beobachtungen über Geschwülste der Speicheldrüsen. *Archives of Pathology and Anatomy* 1856;17:357.

Chiu, R., Angel, P., and Karin, M. Jun-B differs in its biological properties from, and is a negative regulator of c-Jun. *Cell* 1989;22:979–86.

Chummun S, Mclean NR, Kelly CG, Dawes PG, Meikle D, Fellows S, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. *Br J Plast Surg* 2001;54: 476-80.

Darling MR, Schneider JW, Phillips VM. Polymorphous low-grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma: a review and comparison of immunohistochemical markers. *Oral Oncol* 2002;38(7):641-5.

Deng T, Karin M. JunB differs from c-Jun in its DNA binding and dimerization domains, and represses c-Jun by formation of inactive heterodimers. *Genes Dev* 1993;7:479–90.

Ellis GL, Auclair PL. Tumors of the salivary glands. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996.

Epivatianos A, Athanasios P, Ioannis D, Demetrios A, Alexandros N, Stamatia V, Georgios P and Calypso B. Application of alpha-smooth muscle actin and c-kit in the differential diagnosis of adenoid cystic carcinoma from polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Oral Oncol* 2007;43(1):67-76.

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.

Figueiredo RLVF. Estudo Imunoistoquímico do carcinoma adenóide cístico de glândula salivar menor [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1997.

Freedman PD, Lumerman H. Lobular carcinoma of intraoral minor salivary gland origin. Report of twelve cases. *Oral Surg Oral Pathol* 1983;56:157-65.

Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhaes MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. *Int J Surg Pathol* 2005;13(1):57-65.

Garden AS, Weber RS, Morrison WH, Ang KK, Peters LJ. The influence of positive margins and nerve invasion in adenoid cystic carcinoma of the head and neck treated with surgery and radiation. *Int J Radiat Oncol Bio Phys* 1995; 32(3):619-26.

Gee JM, Barroso AF, Ellis IO, Robertson JFR, Nicholson RC. Biological and Clinical associations of c-jun activation in human breast cancer. *Int J Cancer* 2000;89(2):177:86.

Gnepp DR, Chen J.C, Warren, C. Polymorphous low grade adenocarcinoma of minor salivary gland. An immunohistochemical and clinicopathologic study. *Am J Surg Pathol* 1988; v.12, n.6, p.461-68.

Gurzov EN, Bakiri L, Alfaro JM, Wagner EF, Izquierdo M. Targeting c-Jun and JunB proteins as potential anticancer cell therapy. *Oncogene* 2008;27(5):641-52.
Haddad A, Enepekides D, Manolidis S, Black M. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a clinicopathologic study of 37 cases. *J Otolaryngol* 1995;24(3):201-5.

Hashimoto S, Takahashi H, Okamoto M, Yao K, Nakayama M, Makoshi T, Iwabuchi K. Prognostic factors of head and neck adenoid cystic carcinoma: quantitative morphological analysis of 19 cases. *Acta Otolaryngol Suppl* 2002; (547):93-6.

Hilberg F, Wagner EF. Embryonic stem (ES) cells lacking functional c-jun: consequences for growth and differentiation, AP-1 activity and tumorigenicity. *Oncogene* 1992;(7):2371-80.

Hill CS, Treisman R. Differential activation of c-fos promoter elements by serum, lysophosphatidic acid, G proteins and polypeptide growth factors. *EMBO J* 1995;14(20):5037-47.

IP YT, Davis RJ. Signal transduction by the c-jun N Terminal Kinase (JNK) –from inflammation to development. *Curr Opin Cell Biol* 1998;10:205-19.

Kallunki T, Deng T, Hibi M, Karin M. c-jun can recruit JNK to phosphorylate dimerization partners via specific docking interactions. *Cell* 1996;87, 929-39.

Khan AJ, Digiovanna MP, Ross DA, Sasaki CT, Carter K, Son YH, et al. Adenoid cystic carcinoma: a retrospective clinical review. *Int J Cancer* 2001;96:149-58.

Kolude B, Lawoyin JO, Akang EE. Salivary gland neoplasms: a 21year review of cases seen at University College Hospital, Ibadan. *Afr J Med Sci* 2001;30:95-98.

Karamouzis MV, Sotiropoulou-Bonikou G, Vondoros G, Varakis I, Papavassiliou AG. Differential expression of retinoic acid receptor beta (RARbeta) and the AP-1 transcription factor in normal, premalignant and malignant human laryngeal tissues. *Eur J Cancer* 2004;40(5):761-73.

Langosch KM, Bamberger AM, Methner C, Riek G, Loning T. Expression of cell cycle-regulatory proteins Rb, p16/MTS1, p27/KIP1, p21/WAF1, cyclin D1 and cyclin E in breast cancer : correlations with of activating protein -1 family members. *Int J Cancer* 2000;(87):468-72.

Loducca SV, Mantesso A, Kapas S, Williams DM, Araujo NS, Araujo VC. Salivary gland tumours: immunoexpression of integrins beta 1, beta 3 and beta 4. *J Oral Pathol Med* 2003;32(5):305-9.

Lohman FP, Gibbs S, Fischer DF, Borgstein AMB, Van de Putte P, Backendorf C. Involvement of c-jun in the regulation of terminal differentiation genes in normal and malignant keratinocytes. *Oncogene* 1997;(14):16203-7.

Meyers JHL, Liu Y, Medellin DM, Hilsenbeck SG, Brown PH. AP-1 blockade inhibits the growth of normal and malignant breast cells. *Oncogene* 2000; (20):2771-2780.

Nephew KP, Choi CM, Polek TC, McBride R, Bigsby RM, Khan AS, et al. Expression of fos and jun proto-oncogenes in benign versus malignant human uterine tissue. *Gynecologic Oncology* 2000; (76):388-396.

Pulverer BJ, Kiriakis JM, Auruch J, Nikolakaki E, Woodgett JR. Phosphorylation of c-jun mediated by MAPKinases. *Nature* 1991; 353:670-4.

Qureshi SS, Nadkarni MS, Shrikhande SV, Desai S, Deodhar K, Ramadwar M, Shukla PJ. Hepatic resection for metastasis from adenoid cystic carcinoma of parotid gland. *Indian J Gastroenterol* 2005; 24:29-30.

Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Faratzis G, Stravrianos SD, Vilos GA, et al. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck. Clinicopathological analysis of 23 patients and review of the literature. *Oral Oncology* 2005; 41:328-35.

Raux-Rakotomalala F, Houliat T, Martel J, Stoll D, Bedear JP, Darrouzet V. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck: a review of 30 cases. *Rev Laryngol Otol Rhinol* 2003; 124:235-41.

Ryseck RP, Bravo R. c-jun, JunB, and JunD differ in their binding affinities to the Ap-1 and CRE consensus sequences: effect of Fos proteins. *Oncogenes* 1991;6:533-42.

Sassone-corsi P, Ransone LJ, Lamph WW, Verma IM. Direct interaction between fos and jun nuclear oncoproteins: role of the 'leucine zipper' domain. *Nature* 1988; 336 (6200):692-5.

Seaver PR Jr, Kuehn PG. Adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. A study of ninety-three cases. *Am J Surg* 1979;137(4):449-55.

Schutte 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.

Sousa SOM, Mesquita RA, Pinto DS Jr, 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.

Spiers ASD, Esseltine DLW, Ruckdeschel JC, Davies JNP, Horton J. Metastatic adenoid cystic carcinoma of salivary glands: case reports and review of the literature. *Cancer Control* 1996; 3(4):336-42.

Spiro RH, Huvos AG . Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg* 1992;164(6):623-8

Stepniak E, Romeo Ricci, Robert Eferl, Gregorz Sumara, Izabela Sumara, Martina Rath, Lijian Hui and Erwin F. Wagner. c-Jun/AP-1 controls liver regeneration by repressing p53/p21 and p38 MAPK activity. *Genes Dev* 2006;15;20(16):2306-14.

Szabowski A, Maas-Szabowski N, Andrecht S, Kolbus A, Schorpp-Kistner M, Fusenig NE, Angel P. c-Jun and JunB antagonistically control cytokine regulated mesenchymal-epidermal interaction in skin. *CELL* 2000 22;103 (5):745-55

Vasilevskaya I, O'Dwyer PJ. Role of Jun and Jun kinase in resistance of cancer cells to therapy. *Drug Resist Updat* 2003;6(3):147-56.

Volm M, Drings P, Wodrich W, Van Kaick G. Prognostic significance of the expression of c-fos, c-jun and c-erbB-1 oncogene products in human squamous cell lung carcinomas. *J Cancer Res Oncol* 1993;119 (9):507-10.

Vleugel PhD, Astrid E, Greijer PhD, Reinhard Bos MD, PhD, Elsken van der Wall MD, PhD and Paul J. van Diest MD, PhD c-Jun activation is associated with proliferation and angiogenesis in invasive breast cancer. *Human Pathol* 2006; 37(6):668-74

Waldrom CA, El Mofty SK, Gnepp DR. Tumours of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1988;66(3):323-3.

Winter C, Weiss C, Martin-Villalba A, Zimmermann M, Schenkel J. JunB and Bcl-2 overexpression results in protection against cell death of nigral neurons following axotomy. *Brain Res Mol Brain Res* 2002;104(2):194-02.

Whear NM, Addy JM. Adenoid cystic carcinoma of the sublingual gland an unusual presentation. *Br J Oral Maxillofac Surg* 1993;31(2):113-6.

Wiseman SM, Popat SR, Rigual NR, Hicks WL Jr, Orner JB, Wein RO, McGary CT, Loree TR. Ear. Adenoid cystic carcinoma of the paranasal sinuses or nasal cavity: a 40-year review of 35 cases. *Nose Throat J* 2002;81(8):510-7.

Yasumatsu R, Kuratomi Y, Nakashima T, Masuda M, Yamamoto T. Cyclin D1 expression does not effect cell proliferation in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2004;261:526-30.

Yamamoto Y, Wistuba IL, Kishimoto Y, Virmani AK, Vuitch F, Albores-Saavedra J, et al. DNA analysis at p53 locus in adenoid cystic carcinoma: comparison of molecular study and p59 immunostaining. *Pathol Int* 1998;(4):273:80.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**PARECER DE APROVAÇÃO**
Protocolo 86/07

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa **"ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-JUN EM CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO E ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE DE GLÂNDULAS SALIVARES "**, de responsabilidade da **ROBERTO A. GARCIA REJAS**, sob orientação da Professora Doutora **SUZANA C. ORSINI MACHADO DE SOUSA**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 07 de agosto de 2007

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

**DECLARAÇÃO
PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 86/07**

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a mudança do título de **"ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA C-JUN EM CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO E ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE DE GLÂNDULAS SALIVARES"** para **"ESTUDO DA IMUNOEXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS C-JUN E JUNB EM CARCINOMA ADENÓIDE CÍSTICO E ADENOCARCINOMA POLIMORFO DE BAIXO GRAU DE MALIGNIDADE DE GLÂNDULAS SALIVARES"** de responsabilidade do Pesquisador ROBERTO ANAXIMANDRO GARCIA REJAS, sob orientação da Professora Doutora Suzana Orsini Machado de Sousa

São Paulo, 03 de junho de 2008

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP