

MICHELINE BICA GUTERRES

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE METALOPROTEINASE DE
MATRIZ-9 (MMP-9) E DE INIBIDOR TECIDUAL DE
METALOPROTEINASE-1 (TIMP-1) EM NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS
SALIVARES**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Prof^ª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho
Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Eduardo Blumer Rosa

São José dos Campos

2012

BANCA EXAMINADORA

Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof^a. Dr^a. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
Universidade Estadual Paulista - UNESP

Prof. Dr. Carlos Eduardo Dias Colombo

Departamento de Odontologia Universidade de Taubaté - UNITAU
Disciplina de Patologia Bucal

São José dos Campos, 20 de julho de 2012.

DEDICATÓRIA

*Ao meu marido **Juliano**, por estes doze meses que passamos longe, agradeço por toda a compreensão, paciência e cumplicidade por todo esse tempo, principalmente por querer passar sua vida ao meu lado sempre no incentivo a seguir em frente a cada dia.*

*Aos meus pais, **Arleo** (in memoriam) e **Nelma**, pelo amor, pela confiança e por me ensinarem a não desistir. É difícil lhes agradecer com palavras, pois não foi somente com elas que vocês me ensinaram a viver.*

*Aos meus queridos irmãos, **Róbson** e **Tiago**, apesar da distância vocês, sempre torceram por mim.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profª Tit. Yasmin Rodarte Carvalho**, pela orientação, capacidade, amizade, e principalmente pela confiança depositada em meu trabalho. Pelos ensinamentos transmitidos, sem dúvida, fundamentais para a realização do meu mestrado.

Ao **Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa**, pelas sugestões sempre pertinentes a esse trabalho, pelo apoio e motivação constante. Sou muito grata à sua amizade.

À **Profª Drª Adriana Aigotti Haberbeck Brandão** pelos momentos de vivência acadêmica e ensinamentos dispensados com tanta serenidade.

À amiga, **Adriana Delgado**, cuja contribuição foi indispensável em todas as etapas laboratoriais deste trabalho. Sempre com uma palavra amiga de incentivo, obrigada por tudo amiga!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho, na pessoa do Diretor da FOSJC, pelo incentivo ao ensino e pesquisa.

Aos docentes do Programa de Pós Graduação em Biopatologia Bucal por todos os ensinamentos transmitidos.

Ao Prof. Ivan Balducci, responsável pela análise estatística desse trabalho.

A todos os colegas da pós-graduação, pela colaboração e convívio durante este período.

Às amigas e técnicas Ana Lourdes da Silva Machado e Maria Salete Faria, pela amizade e apoio em várias etapas laboratoriais.

Às funcionárias da Pós-graduação Rose e Erena e ao funcionário Bruno, pela paciência e atenção.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	8
RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	10
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 Neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares.....	13
2.2 Metaloproteinases x invasão tumoral.....	19
2.3 Metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs).....	21
3 PROPOSIÇÃO.....	27
4 MATERIAL E MÉTODO.....	28
4.1 Amostra e seleção dos casos.....	28
4.2 Reação imuno-histoquímica.....	28
4.3 Método de análise dos resultados.....	31
4.3.1 Avaliação da marcação para MMP-9 e TIMP-1.....	31
4.3.2 Análise estatística.....	32
5 RESULTADOS.....	33
5.1 Análise dos dados clínicos.....	33
5.2 Análise descritiva da marcação para MMP-9 e TIMP-1.....	34
5.2.1 Adenoma pleomórfico.....	34
5.2.2 Mioepitelioma.....	35
5.2.3 Carcinoma mucoepidermóide.....	36
5.2.4 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	37
5.2.5 Carcinoma adenóide cístico.....	38
5.3 Análise estatística comparativa dos marcadores MMP-9 e TIMP-1	

cada lesão.....	42
5.3.1 Adenoma pleomorfo.....	44
5.3.2 Mioepitelioma.....	45
5.3.3 Carcinoma mucoepidermóide.....	46
5.3.4 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	47
5.3.5 Carcinoma adenóide cístico.....	48
5.4 Comparação da marcação para MMP-9 e TIMP-1 entre lesões benignas e malignas.....	49
6 DISCUSSÃO.....	52
7 CONCLUSÕES.....	60
8 REFERÊNCIAS	61
APÊNDICES.....	67
Apêndice A Escores individuais de marcação para cada estrutura do adenoma pleomórfico	67
Apêndice B Escores individuais de marcação para cada estrutura do mioepitelioma.....	68
Apêndice C Escores individuais de marcação para cada estrutura do carcinoma mucoepidermóide.....	69
Apêndice D Escores individuais de marcação para cada estrutura do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.....	70
Apêndice E Escores individuais de marcação para cada estrutura do carcinoma adenóide cístico.....	71
ANEXO.....	72

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP= Adenoma Pleomórfico

APBG= Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau de Malignidade

BM= Banho Maria

BSA= Soroalbumina Bovina

CAC= Carcinoma Adenóide Cístico

CME= Carcinoma Mucoepidermóide

DAB= Tetrahydrocloroto de Diaminobenzidina

HE= Hematoxilina e Eosina

IMQ= Imuno-Histoquímica

MB= Membrana Basal

MEC= Matriz Extracelular

MIO= Mioepitelioma

MMPs= Metaloproteinases de Matriz

MMP-9= Metaloproteinase de Matriz 9

TIMPs= Inibidores teciduais de metaloproteinases

TIMP-1= Inibidor Tecidual de Metaloproteinase 1

µm = Micrômetro

Guterres, MB. Expressão imuno-histoquímica de metaloproteinase de matriz-9 (MMP-9) e de inibidor tecidual de metaloproteinase-1 (TIMP-1) em neoplasias de glândulas salivares [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP-Univ Estadual Paulista; 2012.

RESUMO

Os tumores de glândulas salivares apresentam uma grande diversidade celular, morfológica e de comportamento, tornando muitas vezes difícil seu diagnóstico, tratamento e prognóstico. Um componente importante desses tumores é a matriz extracelular, cuja remodelação é regulada por enzimas como as metaloproteinases da matriz (MMPs) e seus inibidores teciduais (TIMPs). O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e expressão de MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias de glândulas salivares. Foram estudados 20 casos de adenoma pleomórfico (AP), 05 de mioepitelioma (MIO), 17 de carcinoma mucoepidermóide (CME), 10 de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (APBG) e 08 de carcinoma adenóide cístico (CAC), que foram selecionados dos arquivos do laboratório de Patologia Cirúrgica da FOSJC/UNESP. O material foi submetido à reação imuno-histoquímica para detecção de MMP-9 e TIMP-1, pelo método da estreptavidina-biotina peroxidase. Foi feita avaliação semiquantitativa da marcação e os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial utilizando o programa Minitab (versão 16.0). Foram aplicados os testes Mann-Whitney e de sinais de postos de Wilcoxon, com nível de significância de 5%. Verificou-se que existe variação da expressão dos marcadores entre as diversas estruturas de cada lesão, com predomínio de TIMP-1 sobre MMP-9. Entre as neoplasias, observou-se maior expressão de TIMP-1 no AP, no CME e no CAC e de MMP-9 no MIO e no APBG, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Na comparação da marcação para cada anticorpo, entre lesões benignas e malignas, não se observou diferença estatisticamente significativa. Concluiu-se que a maioria das neoplasias de glândula salivar apresenta MMP-9 e TIMP-1 e que o grau de expressão dessas proteínas é variável entre as estruturas de uma mesma lesão e entre as diferentes neoplasias, independente da natureza benigna ou maligna das mesmas. A capacidade invasiva e disseminativa das neoplasias de glândula salivar depende do grau de expressão imuno-histoquímica de MMP-9 e TIMP-1.

Palavras Chaves: Neoplasias. Glândulas salivares. Metaloproteinases da matriz (MMPs). Imuno-histoquímica. Mioepitelioma. Carcinoma mucoepidermóide. Carcinoma adenóide cístico.

Guterres, MB. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in salivary gland neoplasms [dissertation]. Sao Jose dos Campos, School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP- Univ Estadual Paulista; 2012.

ABSTRACT

The salivary gland tumors present very diverse cellular morphology and behavior, often making their diagnosis, treatment and prognosis difficult. An important component of tumors is the extracellular matrix, which is regulated by remodeling enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). The objective of this study was to evaluate the role of MMP-9 and TIMP-1 in salivary gland neoplasms. We studied 20 pleomorphic adenomas (PA), 05 myoepitheliomas (MIO), 17 mucoepidermoid carcinomas (MEC), 10 polymorphous low-grade adenocarcinomas (PLGA) and 08 adenoid cystic carcinomas (ACC), which were selected from the files of the Laboratory of Surgical Pathology from FOSJC / UNESP. The material was subjected to immunohistochemical staining for detection of MMP-9 and TIMP-1 by the method of the streptavidin-biotin peroxidase. A staining semiquantitative assessment was made and the data were submitted to descriptive and inferential statistical analysis using Minitab (version 16.0). We applied the Mann-Whitney and Wilcoxon signs of posts tests, with a significance level of 5%. It was found that there is variation in the expression of markers among the various structures of each lesion, with a predominance of TIMP-1 over MMP-9. Among the tumors, we observed greater expression of TIMP-1 in PA, MEC and ACC and of MMP-9 in MIO and PLGA, however, any statistically significant difference has not been observed. Comparing the labeling for each antibody among benign and malignant lesions, there was no statistically significant difference. It was concluded that most of the salivary gland neoplasms express MMP-9 and TIMP-1 and that the degree of expression of these proteins is variable among the structures of the same lesion and among the various salivary neoplasms, regardless of their benign or malignant nature. The invasive properties and dissemination capacity of salivary gland tumors is independent of the degree of immunohistochemical expression of MMP-9 and TIMP-1.

Keywords: Neoplasms. Gland salivary. Matrix metalloproteinases (MMPs). Immunohistochemistry. Myoepithelioma. Mucoepidermoid carcinoma. Adenoid cystic carcinoma.

1 INTRODUÇÃO

As neoplasias de glândulas salivares perfazem cerca de 6% dos tumores da região de cabeça e pescoço e 0,3% de todas as malignidades. A origem e o desenvolvimento das neoplasias de glândulas salivares ainda são pouco esclarecidos devido à grande variedade de comportamento e de padrões histológicos que estas lesões apresentam, tornando assim seu diagnóstico e tratamento difíceis, como observado na recente classificação de tumores de glândulas salivares da Organização Mundial da Saúde, em que mais de trinta tipos diferentes de tumores estão incluídos (Barnes et al., 2005).

O microambiente onde se encontra uma célula neoplásica (cancerosa) pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer. O componente principal deste ambiente é a matriz extracelular (MEC), que consiste de uma rede complexa de macromoléculas que apresenta propriedades físicas, bioquímicas e biomecânicas bem organizadas. A remodelação da matriz extracelular é regulada por uma série de enzimas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), que podem estar desreguladas com a idade ou em condições patológicas (Lu et al., 2012).

Nos tumores, as MMPs são consideradas moléculas fundamentais em várias etapas da progressão, como crescimento, invasão e metástase, sendo o aumento de sua expressão geralmente associado a um pior prognóstico (Nakopoulou et al., 2002). Em especial, MMP-2 e MMP-9 desempenham papel crítico na invasão da membrana basal por meio da degradação do colágeno tipo IV, levando aos processos de vascularização e progressão de diversos tumores (Rao et al., 2007).

Por outro lado, a expressão dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC. Alterações na homeostasia entre as MMPs e os TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas à renovação não controlada da MEC, como artrite, câncer, doenças cardiovasculares (DCVs), nefrites, desordens neurológicas e fibroses (Woessner, Nagase, 2000).

A fim de analisar a expressão de MMP-9 e de TIMP-1 em neoplasias de glândulas salivares, a proposição deste estudo foi avaliar a presença de ambos em neoplasias benignas e malignas, comparando sua expressão em cada lesão e entre as lesões benignas e malignas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares

As glândulas salivares consistem de três pares de glândulas maiores denominadas parótida, submandibular e sublingual, e de numerosas glândulas menores que se distribuem pela mucosa da cavidade bucal, sendo a porção posterior do palato duro e o palato mole as áreas mais ricas em glândulas salivares menores (Neville et al., 2009).

A grande maioria das neoplasias de glândulas salivares é de origem epitelial e a classificação histológica destas lesões pode apresentar dificuldades devido à grande variabilidade morfológica (Barnes et al., 2005).

As neoplasias de glândulas salivares apresentam três tipos de células epiteliais, que variam em presença, proporção e organização arquitetural conforme o tipo de tumor. São elas as células acinares, ductais e mioepiteliais (Leivo, 2006).

As alterações neoplásicas de glândulas salivares constituem um grupo controverso e polêmico quanto ao diagnóstico, principalmente para os patologistas. É considerado que nenhum outro tecido do corpo seja capaz de produzir tamanha diversidade de expressões histopatológicas como o tecido das glândulas salivares (Chinellato et al., 1994).

Recentes avanços na classificação histopatológica deste complexo grupo de neoplasias de glândulas salivares têm sido combinados com novas ferramentas para seu diagnóstico e prognóstico.

A imuno-histoquímica, com utilização de marcadores para proliferação celular, células mioepiteliais, metaloproteinases de matriz, fatores de crescimento e seus receptores, tem aumentado as possibilidades de escolhas mais específicas no tratamento do câncer de glândulas salivares (Leivo, 2006).

As neoplasias de glândulas salivares são mais comuns em parótida, enquanto as glândulas menores são o segundo sítio mais comum para essas neoplasias, com 9% a 23% dos casos. A proporção de neoplasias malignas em glândulas menores é de aproximadamente 50%. Excluindo os raros tumores da glândula sublingual, pode-se dizer que quanto menor a glândula, maior a probabilidade de malignidade para um tumor de glândula salivar (Neville et al., 2009).

Estudo realizado em um grupo da população brasileira comparando neoplasias de glândulas salivares maiores e menores demonstrou que os tumores malignos foram significativamente mais freqüentes nas menores, sendo o carcinoma mucoepidermóide (CME) e o carcinoma adenóide cístico (CAC) os de maior prevalência. Entre os benignos, o adenoma pleomórfico foi o mais comum (Oliveira et al., 2009).

Em um estudo retrospectivo realizado no leste da China, em que 6982 casos de neoplasias de glândulas salivares foram analisados, o adenoma pleomórfico (AP) foi o tumor benigno mais comum e 20% estavam localizados nas glândulas salivares menores. Os tumores malignos mais comuns foram CAC e o CME e 28% desses tumores originados em glândulas salivares menores (Tian et al., 2010).

Luksic et al. (2011) através de uma análise retrospectiva de 779 pacientes tratados entre 1985 e 2009 com tumores de glândulas salivares, observaram que 500 casos representavam tumores benignos e 279 eram malignos. Os autores observaram que a maioria dos tumores ocorreu na glândula parótida, seguida pelas glândulas salivares menores e submandibulares. O AP e o CAC foram os tumores benigno e maligno mais frequentes, respectivamente. Quanto à localização, os tumores

malignos foram mais freqüentes nas glândulas salivares menores e na submandibular.

O AP é um tumor benigno caracterizado por crescimento lento e indolor. É constituído por células mioepiteliais e epiteliais glandulares, permeadas por quantidades variáveis de um componente estromal de aparência mixóide, ou condróide. Pode-se observar a formação de ductos, estruturas císticas, ilhas ou cordões celulares. As células mioepiteliais geralmente compõem uma grande porcentagem das células tumorais e exibem uma morfologia variável, podendo apresentar-se como células anguladas ou fusiformes. Algumas células mioepiteliais são arredondadas e possuem núcleo excêntrico e citoplasma eosinofílico hialinizado, lembrando plasmócito. Estas células mioepiteliais plasmocitóides são mais proeminentes nos tumores oriundos de glândulas salivares menores. Acredita-se que as alterações características observadas no parênquima sejam produzidas pelas células mioepiteliais. Geralmente o AP é encapsulado e bem circunscrito, entretanto, a cápsula pode ser incompleta nos tumores de glândulas salivares menores (Barnes et al., 2005; Neville et al., 2009).

Apesar das células mioepiteliais comporem uma grande variedade de neoplasias de glândulas salivares, os tumores que exibem quase inteiramente células de fenótipo mioepitelial são chamados de mioepitelioma. As células podem exibir os seguintes aspectos: plasmocitóides, poligonais, basalóides, claras e fusiformes com diferentes arranjos e combinações (Gnepp, 2009). O mioepitelioma é um tumor benigno, composto quase exclusivamente por folhetos, ilhotas ou cordões de células com diferenciação mioepitelial (Barnes et al., 2005).

O estroma envolvente pode ser mucóide ou colagenoso. Alguns mioepiteliomas estão compostos, predominantemente, por células claras poligonais, com citoplasma abundante e opticamente claro, contendo grandes quantidades de glicogênio, porém sem mucina ou gordura (Barnes et al., 2005).

O critério para distinguir AP com predomínio de células mioepiteliais do mioepitelioma é subjetivo. Quando de 1% a 2% dos tumores é composto por estruturas ductiformes, é diagnosticado como mioepitelioma (Gnepp, 2009).

O CME é um tumor maligno de origem epitelial composto por variada proporção de células mucosas, epidermóides, intermediárias, colunares e claras. Pode também demonstrar um proeminente crescimento cístico, particularmente nos tumores de baixo grau de malignidade (Barnes et al., 2005; Neville et al., 2009). As glândulas salivares menores constituem a segunda localização preferencial desta neoplasia, sendo sede de 15% a 23% dos tumores, especialmente localizados no palato. O CME é composto principalmente de uma mistura de células produtoras de muco, células escamosas (epidermóides) e células intermediárias. As células mucosas apresentam formato variado, mas contêm abundante citoplasma espumoso. As células epidermóides assemelham-se às escamosas, demonstrando formato poligonal e pontes intercelulares. Acredita-se que as células intermediárias sejam progenitoras tanto das células mucosas quanto das epidermóides (Neville et al., 2009).

Os carcinomas mucoepidermóides podem eventualmente apresentar calcificações (Prado et al., 2007). Em um estudo clínico-patológico, realizado por Arriagada et al. (2011), os autores concluíram que a presença de calcificações em CME pode ser um achado frequente, e que esta presença foi independente do grau histológico de malignidade dos tumores, da variante histopatológica, não estando associado a prognósticos ruins, visto que essas calcificações foram encontradas em CME de baixo-grau (em sua maioria), grau-intermediário e de alto-grau.

Células claras modificadas podem ser encontradas entre as células epidermóides e intermediárias, podendo então o CME tomar a forma de um carcinoma de células claras. Metaplasia oncocítica é também frequente. Queratinização é extremamente rara. O CME pode ser

cístico e tende então a apresentar numerosas células mucosas. Assim, o CME tem muitas possibilidades de padrões histopatológicos, enfatizando a necessidade de marcadores imuno-histoquímicos para sua identificação microscópica (Leivo, 2006).

Prado et al. (2011) analisaram neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares e encontraram uma predominância de Ki-67 nas malignas. Este marcador de proliferação celular frequentemente é utilizado para estimar a fração de crescimento de tumores. Entre as lesões analisadas, o CME apresentou a maior taxa de proliferação.

CAC é um tumor maligno de origem epitelial, consiste de células epiteliais e mioepiteliais, em configuração morfológica variável, incluindo padrão tubular, cribriforme e sólido (Barnes et al., 2005). O pior prognóstico é encontrado no subtipo sólido independente da localização do tumor (Sequeiros et al., 2009). É responsável por cerca de 1% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço. Apresenta tendência para uma evolução clínica prolongada, com recorrências locais e metástases a distancia que ocorrem anos após a apresentação inicial (Dodd, Slevin, 2006).

Compreende aproximadamente 10% de todas as neoplasias epiteliais de glândulas salivares, e 35% das neoplasias malignas de glândulas salivares menores. O padrão cribriforme é o mais freqüente e o sólido o mais raro, no entanto, pode ocorrer uma mistura de padrões em uma mesma lesão. O padrão cribriforme apresenta-se semelhante a queijo suíço, com células neoplásicas formando ilhotas contendo estruturas pseudocísticas pequenas e circulares de tamanhos variados. Geralmente os pseudocistos contêm material amorfo, basofílico ou eosinofílico. As células tumorais são pequenas e cuboidais, exibindo núcleos basofílicos com forma variada e citoplasma escasso (Ellis, Auclair, 1996; Barnes et al., 2005) .

O tipo sólido é formado por folhetos de células basalóides uniformes, não se formando túbulos nem microcistos. Nas variantes

cribriforme e sólida, pequenos ductos verdadeiros estão presentes (Barnes et al., 2005).

O CAC apresenta tendência de invasão perineural, o que pode levar à sintomatologia dolorosa. A propriedade de se infiltrar no nervo além das margens tumorais também pode explicar as altas taxas de recorrência (Ellis, Auclair, 1996; Barnes et al., 2005).

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (APBG) é uma neoplasia maligna quase exclusiva das glândulas salivares menores que ocorre particularmente no palato (Leivo, 2006). Sessenta e cinco por cento dos casos ocorrem no palato duro e/ou no palato mole, sendo o lábio superior e a mucosa jugal as outras localizações mais frequentes. A ocorrência de metástase é rara neste tumor e quando ocorre é encontrada em linfonodos regionais (Gnepp, 2009).

A primeira descrição do APBG é relativamente recente, porém a frequência com que esta lesão tem se mostrado torna claro que as recidivas e metástases tardias, apesar de pouco frequentes, podem não ser tão raras como se pensava anteriormente. Apesar de o APBG ser certamente muito menos agressivo do que, por exemplo, o CAC, não deixa de ser um tumor maligno com o potencial de se tornar fatal em alguns pacientes (Simpson et., al 2002).

Histologicamente, as células apresentam um formato que varia de arredondado a poligonal, citoplasma pálido ou eosinofílico e núcleo arredondado, ovóide ou fusiforme. As células podem exibir diferentes padrões de crescimento, de onde vem o termo “polimorfo”. As células podem crescer em um padrão sólido ou formar cordões, ductos ou ainda grandes espaços císticos. Figuras de mitoses são incomuns. As células periféricas usualmente infiltram e invade o tecido conjuntivo adjacente em um padrão de fileira única, podendo ser observada a extensão para o osso subjacente ou para o músculo estriado esquelético.

O estroma é de natureza mucoide e a invasão perineural é um achado comum (Neville et al., 2009).

2.2 Metaloproteínases x Invasão tumoral

A MEC consiste de uma rede complexa de macromoléculas que preenchem os espaços intercelulares. As macromoléculas são constituídas por proteínas fibrosas e não fibrosas imersas em uma substância fundamental formada por glicosaminoglicanas e proteoglicanas. As proteínas fibrosas da MEC, como o colágeno e a elastina, têm função principalmente estrutural, enquanto as proteínas não fibrosas, como laminina, fibronectina, tenascina, entactina, entre outras, são importantes na adesividade celular (Brasileiro Filho, 2004).

A regulação célula-célula e célula-matriz é rigorosamente controlada em tecidos normais, no entanto defeitos nos processos de adesão celular são comuns na maioria dos cânceres humanos. As células tumorais adquirem a capacidade de mudar de forma, separar-se e mover-se, facilmente desorganizando a arquitetura do tecido normal. Esta propriedade deve-se a alterações nos níveis de expressão de moléculas de adesão e também à elevação dos níveis de enzimas proteolíticas secretadas, incluindo MMPs (Bourboulia, Stetler-Stevenson, 2010).

Embora a MEC apresente-se com uma composição mantida e regulada durante o desenvolvimento embrionário, a MEC pode tornar-se frequentemente desorganizada em doenças como o câncer. Alterações na MEC, isoladas ou em conjunto, podem levar à progressão do câncer através de transformações celulares e metástase. É importante

também observar que anomalias presentes na MEC podem influenciar o comportamento das células estromais facilitando a angiogênese e inflamação, criando assim um microambiente favorável ao desenvolvimento de neoplasias (Lu et al., 2012).

As células tumorais devem interagir com a MEC em vários estágios da cascata metastática. Um carcinoma deve, inicialmente, romper a membrana basal subjacente, em seguida atravessar o tecido conjuntivo intersticial e, por fim, conseguir acesso à circulação por penetração da membrana basal vascular. Portanto, para metastatizar, as células tumorais devem atravessar várias membranas basais diferentes, bem como transpor diretamente, pelo menos, duas matrizes intersticiais. A invasão da MEC é um processo ativo, que passa por várias etapas. Dentre as etapas de invasão está a degradação local da membrana basal e do tecido conjuntivo intersticial. As próprias células tumorais podem secretar enzimas proteolíticas ou induzir as células estromais (por exemplo, fibroblastos e células inflamatórias) a elaborar proteases. Entre estas proteases estão as MMPs, as quais regulam a invasão tumoral não somente por remodelar componentes insolúveis da membrana basal e matriz intersticial, mas também por liberar fatores de crescimento sequestrados MEC (Robbins, Cotran, 2010).

As MMPs são importantes na invasão neoplásica e de um modo geral há uma relação direta entre o grau histopatológico, o comportamento clínico metastático e a produção de MMPs (Hong et al., 2000).

2.3 Metaloproteinases de matriz (MMPs) e inibidores teciduais de metaloproteinases (TIMPs)

As MMPs constituem uma família de enzimas com atividade proteolítica e cuja atividade é dependente de zinco. Elas degradam as macromoléculas da matriz, incluindo colágeno intersticial, fibronectina, e proteoglicanas, entre outras (Birkedal-Hansen et al., 1993; Souza, Line, 2002). Coletivamente, as MMPs são capazes de degradar todas as proteínas componentes da MEC e das membranas basais (Souza, Line 2002).

As principais células que produzem MMPs são leucócitos polimorfonucleares, queratinócitos, monócitos, macrófagos, fibroblastos e células mesenquimais. Estas células são capazes de responder a fatores de crescimento e citocinas, incluindo Interleucina 1 (IL-1), TNF- α e TGF- α . Na presença destes fatores de crescimento e citocinas, essas células liberam as MMPs de grânulos específicos de armazenamento para o meio extracelular (Birkedal-Hansen et al., 1993).

As MMPs são classificadas em cinco grupos principais: collagenases (MMP-1, 8 e 13); gelatinases (MMP-2 e 9), também conhecidas como collagenases do tipo IV; estromelisinases (MMP-3, 7, 10, 11 e 12), enamelinase (MMP-20), MMPs ligadas à membrana plasmática (MT-MMPs) e outras ainda não tão bem classificadas (Polette et al., 2004; Vicente et al., 2005).

A MMP-1 é expressa por vários tipos de células. Por outro lado, a MMP-8 é produzida por neutrófilos e condrócitos e tem maior afinidade para o substrato colágeno tipo I (Woessner & Nagase, 2000). A MMP-13 tem a habilidade de degradar uma grande variedade de componentes extracelulares e é mais específica para o colágeno tipo II (Kahari, Saarialho-Kere, 1999).

A produção da gelatinase MMP-9 é mais restrita quando comparada à MMP-2. Essa enzima é produzida geralmente por células epiteliais e eosinófilos, sendo armazenada em grânulos de neutrófilos e eosinófilos (Salo et al., 1991). Dessa forma, elevadas concentrações de MMP-9 podem ser encontradas em processos de inflamação, artrite reumatóide, periodontite, pulpite, feridas crônicas e cicatrização de feridas. A MMP-2 e a MMP-9 apresentam papel importante no final da degradação do colágeno fibrilar depois de terem sido clivados por collagenases e desnaturados. A MMP-9 degrada os colágenos tipo I, II e V e a MMP-2 pode também clivar colágeno tipo-I. Assim, é possível que a MMP-2 e a MMP-9 também participem dos processos de remodelação do colágeno da MEC (Kahari, Saarialho-Kere, 1999).

As gelatinases MMP-2 e MMP-9 degradam também o colágeno IV que compõe a lâmina basal, sendo por isso provavelmente relevante na aquisição do fenótipo invasivo das neoplasias malignas (Kerkela, Saarialho-Kere, 2003).

A atividade proteolítica de degradação da MEC resulta do balanço entre a concentração local das enzimas ativas e de seus inibidores endógenos (Steller-Stevenson et al., 1993). Os maiores inibidores fisiológicos das MMPs são a $\alpha 2$ macroglobulina e a família dos TIMPs. Estas se ligam não covalentemente às MMPs ativas, inibindo sua atividade enzimática (Pardo, Selman, 1996). Os TIMPs dos tipos 1 (TIMP-1) e 2 (TIMP-2) apresentam atividade contra as formas ativas da família de MMPs (Howard et al., 1991; Folgueras, 2004).

As TIMPs possuem 12 resíduos pareados de cisteína que se ligam através de seis pontes dissulfídicas, resultando numa estrutura terciária altamente compacta. Há quatro tipos de TIMPs: a TIMP-1, a TIMP-2, a TIMP-3, e a TIMP-4 (Steller-Stevenson et al., 1993).

As TIMPs são produzidas por uma variedade de tipos celulares tais como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e osteoblastos. A expressão de TIMP-1 é regulada por vários fatores de

crescimento, hormônios e citocinas, a TIMP-2 é largamente expressa constitutivamente (Kahari, Saarialho-Kere, 1999).

Todas as TIMPs são capazes de inibir todas as MMPs. Seu domínio N-terminal é o responsável pela atividade inibitória e o domínio C-terminal parece ser importante para a localização e/ou associação às proenzimas no caso das gelatinases. Entretanto, a interação depende tanto das MMPs quanto das TIMPs (Woessner, 1999).

Além de controlar a atividade das MMPs, TIMP-1 e TIMP-2 são capazes de se ligar diretamente ao domínio hemopexina de MMP-9 e MMP-2, respectivamente, exercendo um controle adicional sobre o processo de ativação (Woessner, Nagase 2000).

Os TIMPs desempenham um importante papel na homeostase da MEC através da regulação da atividade das MMPs e, portanto, minimizam a degradação da matriz. Desta forma, MMPs e TIMPs estão envolvidos nos processos de remodelação dos tecidos (Bourboulia, Stetler-Stevenson, 2010). A degradação da MEC, em decorrência do desequilíbrio entre MMPs e seus TIMPs, no microambiente das neoplasias malignas, tem sido implicado no seu potencial de invasibilidade e agressividade (Stamenkovic, 2000).

As MMPs estão envolvidas em processos fisiológicos do organismo. No trabalho realizado por Wigner et al. (2011), os autores sugerem que níveis urinários de MMP-9 e MMP-13, em camundongos que foram submetidos a um processo de fratura óssea, podem ser usados como marcadores metabólicos para monitorar a progressão e consolidação das fraturas. Eles também observaram que a MMP-9 estava associada tanto com o processo de formação vascular quanto com a remodelação do estroma tecidual nos calos ósseos dessas lesões.

As MMPs parecem estar relacionadas também com vários processos patológicos, como o crescimento dos cistos odontogênicos. No estudo de Silveira et al. (2007), foi observada uma expressão mais exuberante das MMPs na cápsula dos queratocistos quando comparados

com outras lesões císticas, o que confirma sua participação ativa no crescimento da lesão, uma possível justificativa para sua maior agressividade em relação às outras lesões císticas.

Patel et al. (2005) analisaram formas latentes e ativas de MMP-2 e MMP-9 no carcinoma de células escamosas oral, por meio de zimografia. Os resultados mostraram que ambas as formas de MMP-2 e MMP-9 foram significativamente maiores no tumor do que nos tecidos normais adjacentes. Ainda com relação à forma ativa de MMP-2, a mesma apresentou-se mais elevada em pacientes com metástase do que em pacientes sem metástase.

Kondratiev et al. (2008) observaram marcação imuno-histoquímica para MMP-2, MMP-9, MMP-13 e MMP-14 nas células neoplásicas de melanomas sinonasais e orais e relacionaram a expressão destes marcadores à agressividade dos tumores. Segundo os autores, a marcação de MMP-2, MMP-9, MMP-14 e o máximo diâmetro nucleolar, obtido pela coloração pelo nitrato de prata coloidal para regiões organizadoras nucleolares (AgNOR), poderiam ser usados como fatores prognósticos em pacientes com esse tipo de lesão.

Barros et al. (2011) avaliaram a expressão imuno-histoquímica das MMPs-1, 2, 7, 9 e 26 em carcinomas epidermóides, em relação à localização da lesão e seu grau histológico. Todos os casos expressaram pelo menos duas das metaloproteinases analisadas, que foram mais evidentes no citoplasma das células tumorais localizadas no *front* de invasão. O estudo concluiu que a maior expressão das MMPs pelas células tumorais, especialmente MMP-9, pode estar relacionada com o maior potencial invasivo dos carcinomas de língua quando comparados aos de lábio. As altas taxas de positividade encontradas para as MMPs nos espécimes avaliados demonstraram a marcante participação destas enzimas no desenvolvimento dos carcinomas epidermóides de lábio inferior e língua.

Luukkaa et al. (2008) ao realizar um estudo imuno-histoquímico correlacionando as MMPs-1, 9 e 13 como fator de prognóstico em câncer de glândulas salivares, comprovou que estas MMPs contribuem para a progressão e invasão desses tumores malignos por meio da clivagem de membrana basal. A alta intensidade de marcação para MMP-13 em todo o material estudado foi relacionada com o pior prognóstico, sendo também associados com pior sobrevida em pacientes com carcinoma de células acinares (CCA). Elevados índices de positividade para MMP-9 em CAC e carcinoma do ducto salivar também estava associado com uma taxa de sobrevida pobre. No entanto, a alta intensidade e porcentagem de coloração para MMP-1 foi relacionada com melhor taxa de sobrevida em todo o material estudado.

Meneses et al. (2009), após uma revisão de literatura, concluíram que a destruição dos tecidos periodontais e perimplantares, de etiologia multifatorial, tem como um dos fatores o desequilíbrio das MMPs e seus TIMPs.

Baker et al. (2006) ao compararem as concentrações dos componentes do sistema de MMPs, entre tecido tumoral e normal em pacientes com carcinoma de células escamosas orais concluíram que as concentrações totais de MMP-2 e MMP-9 foram significativamente maiores no tecido tumoral do que no tecido oral normal. Os autores concluíram que é o equilíbrio entre proteinases e seus inibidores que controla a degradação em cada estágio de invasão e metástase do carcinoma de células escamosas. Segundo os autores houve correlação entre as concentrações nos tecidos das TIMPs -1 e -2 e a histologia do tumor. Eles encontraram níveis de TIMP-1 mais elevados em tumores que não apresentaram metástases linfonodais em comparação com aqueles que tinham. Os mesmos autores sugerem de acordo com a literatura, que altas concentrações de TIMP são protetoras contra agressão dos tumores. É provável que tumores com altas concentrações de MMPs e baixas de TIMPs tenham um maior potencial para metástases.

Zhang et al. (2009) verificaram, em AP de glândulas salivares, que a expressão do RNAm de MMP-2 e MMP-9 e de TIMP-1 e TIMP-2 foi significativamente maior nas células mioepiteliais envoltas por estroma do que no epitélio, na maioria dos casos. Estes resultados forneceram evidências preliminares de que o estroma mioepitelial pode ser a fonte primária de MMPs e que o mesmo apresenta um papel mais importante que o epitélio ductal no comportamento biológico dos adenomas pleomórficos. Por outro lado, observaram que a marcação imuno-histoquímica de MMP-2, MMP-9, TIMP-1 e TIMP-2 teve um padrão de distribuição similar no epitélio e no estroma. A expressão citoplasmática destes marcadores foi especialmente proeminente em estruturas ductiformes, lençóis sólidos, pequenos ninhos e áreas de metaplasia escamosa. Nas estruturas ductiformes, a MMP-9 foi fracamente expressa na membrana das células lumbais e fortemente expressa na membrana basal. A imunopositividade das células mioepiteliais localizadas em meio ao estroma foi menor do que nas estruturas citadas anteriormente.

A expressão de MMP-2 e MMP-9 e de seus inibidores teciduais TIMP-1, -2 e -3 em tumores benignos e malignos de glândulas salivares mostrou que a relação MMP/TIMP foi significativamente maior nos carcinomas que em adenomas, devido ao aumento da expressão de MMPs. Os escores imuno-histoquímicos da expressão de MMP-2 foram significativamente maiores em carcinomas do que em adenomas. Nos CME a expressão de MMP-2 e MMP-9 foi preferencialmente observada em células intermediárias e epidermóides. Em células produtoras de muco a expressão de MMPs e TIMPs mostrou-se fraca ou negativa. Nos CCA, foi observada a expressão de MMP-2 e MMP-9 nas células acinares, em contraste com as células acinares normais, que não expressam essas MMPs. Em particular, a expressão de MMP-2 parece estar relacionada com as propriedades invasivas e o potencial maligno em tumores de glândulas salivares (Nagel et al., 2004).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo foi analisar, pela imuno-histoquímica, a presença de MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, comparando sua expressão em cada lesão e entre lesões benignas e malignas.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob protocolo nº058/2011-PH/CEP.

4.1 Amostra e Seleção dos Casos

Para este estudo foram utilizados 60 casos de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares pertencentes aos arquivos da Disciplina de Patologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC. Os casos foram selecionados tendo como critério de inclusão no estudo a presença de quantidade suficiente de tecido tumoral no bloco de parafina. Uma vez selecionados os blocos, foram obtidas novas lâminas que foram coradas por hematoxilina e eosina (H/E) para avaliação histopatológica e confirmação do diagnóstico.

Os dados clínicos como idade, raça, gênero e localização anatômica, foram coletados a partir das fichas de requisição de exames, e a seguir foram tabulados e submetidos à análise estatística descritiva.

4.2 Reação Imuno-histoquímica

A reação imuno-histoquímica foi utilizada com a finalidade de visualizar diretamente na amostra a distribuição das proteínas MMP-9

e TIMP-1. A expressão imuno-histoquímica dos respectivos antígenos pelas estruturas tumorais foi avaliada por método semiquantitativo de escores. Este se baseou na soma dos escores correspondentes à proporção de células tumorais com marcação positiva e à intensidade da marcação.

Para a reação imuno-histoquímica, os blocos de parafina foram cortados de forma seriada, com cerca de 3 μ m de espessura, e estendidos em lâminas de vidro previamente limpas, desengorduradas e tratadas com organosilano. Os cortes histológicos, após desparafinização em xilol e desidratação em série decrescente de etanol, foram submetidos à recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação com o anticorpo primário. Foram utilizados os métodos de visualização da estreptavidina-biotina (LSAB, Dako) e sistema de polímero (NovocastTM NovolinkTM Polymer Detection System), revelando com o cromógeno DAB.

Os anticorpos primários, bem como suas diluições, sistema de visualização, tampão de lavagem e detalhes da recuperação antigênica estão listados no quadro 1.

Quadro 1 - Detalhe dos anticorpos primários utilizados

anticorpos	MMP-9	TIMP-1
clone	Policlonal*	6F6a**
diluição / tempo de incubação	1:75 – 1h	1:75 – 1h
sistema de visualização	LSAB***	Novolink ****
tampão lavagem	Tris	Tris
recuperação antigênica (temperatura, tempo)	BM (95°C) 30min Ác. Cítrico	BM (95°C) 30min Ác. Cítrico

* Diagnostic BioSystems.

**NovocastTM Lyophilized, Leica Microsystems

***DAKO CORPORATION, Glostrup, DENMARK,

**** NovocastTM NovolinkTM Polymer Detection System

BM= banho maria

Posteriormente, foi realizada a contra-coloração dos cortes pela Hematoxilina de Mayer, reidratação em etanol crescente, clareamento em xilol e montagem com Permount®.

Controles positivos indicados pelo fabricante foram utilizados para cada anticorpo empregado. Para a MMP-9 foi utilizado fígado, para a TIMP-1 foi utilizado intestino grosso. Para o controle negativo das reações imuno-histoquímicas, os cortes histológicos foram incubados com solução tampão (BSA 1% em Tris pH 7,4) no lugar do anticorpo primário.

4.3 Método de análise dos resultados

4.3.1 Avaliação da Marcação para MMP-9 e TIMP-1

Os cortes submetidos à reação imuno-histoquímica foram analisados em microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiophot-2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), inicialmente em aumento de 200x, para identificar as diversas estruturas do tumor e posteriormente de 400x, para fazer a avaliação semi-quantitativa da marcação. As lâminas das reações para MMP-9 e TIMP-1 foram analisadas por um único observador, com a atribuição de escores de 0 a 6, baseados na soma dos escores da porcentagem de células tumorais positivas (0-3) e da intensidade de marcação (0-3), segundo o método proposto por Nagel et al. (2004) (Tabela 1). Somente as células coradas em marrom foram consideradas positivas.

Tabela 1 – Escore da marcação pela técnica imuno-histoquímica da MMP-9 e da TIMP-1

Escore	% Células positivas	Intensidade de coloração
0	0	negativo
1	< 10%	fraco
2	10-50%	moderado
3	> 50%	forte

Para cada neoplasia, foi construído um quadro com as estruturas características daquela lesão, baseado no trabalho de Prado et al. (2011), a fim de facilitar a análise da marcação por estrutura. O escore final de cada tumor consistiu na média dos escores das estruturas individuais presentes em uma determinada lesão.

4.3.2 Análise Estatística

Todos os registros das informações dos dados clínicos, microscópicos e referentes às reações imuno-histoquímicas foram armazenados em um banco de dados elaborado em planilha eletrônica do Microsoft Excel.

Os resultados obtidos dos escores foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial utilizando o programa estatístico *Minitab* 2010 versão 16.0 e *Graph Pad Prism* 2009 versão 5.0. Foi aplicado o teste *Mann-Whitney* para comparar a marcação imuno-histoquímica de cada anticorpo (MMP-9 e TIMP-1) entre as amostras de neoplasias benignas e malignas, considerando as variáveis duas a duas. O teste de *Mann-Whitney* também foi utilizado para comparar as lesões malignas com as benignas. Para a comparação entre os dois marcadores em uma mesma neoplasia, foi usado o teste de sinais de postos de Wilcoxon. Adotou-se o nível de significância de 5% para todos os testes.

5 RESULTADOS

5.1 Análises dos dados clínicos

Foram selecionados os 20 casos de adenoma pleomórfico que apresentavam maior volume de tecido no bloco de parafina e, dos demais tumores, foram selecionados todos os casos de cada. Os casos estudados foram compostos por 20 adenomas pleomórficos, 05 mioepiteliomas, 17 carcinomas mucoepidermóides, 10 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade e 08 carcinomas adenóides císticos. A análise dos 20 casos de adenoma pleomórfico, revelou um predomínio do gênero feminino, correspondente a 55% dos casos. Foi notada também uma predominância da raça leucoderma, correspondente a 70% dos casos. A média de idade foi de 45 anos. A maioria dos pacientes não apresentava sintomatologia dolorosa e a localização mais comum foi o palato duro (47,62%). Nos 05 casos de mioepitelioma predominou o gênero feminino com 60% dos casos. Houve predominância da raça leucoderma (70%), e a média de idade foi de 40,6 anos. A maioria dos pacientes não apresentava sintomatologia dolorosa e a localização mais comum foi no palato duro e palato (não especificado).

A análise dos 35 casos de neoplasias malignas revelou um predomínio do gênero feminino, correspondente a 58,14% dos pacientes. Foi notada também uma predominância da raça leucoderma, correspondente a 68,57% dos casos, a localização mais comum foi o palato duro (17,14%) e a média geral de idade foi de 52 anos. Do total de casos de neoplasias malignas analisadas, foi relatada sintomatologia

dolorosa em 37,14%, enquanto 22,85% eram assintomáticos. Não havia informação referente à sintomatologia em 40,01% dos casos.

5.2 Análise descritiva da Marcação para MMP-9 e TIMP-1

A marcação imuno-histoquímica de MMP-9 e TIMP-1 foi observada no citoplasma das células neoplásicas, caracterizada por uma coloração acastanhada, geralmente homogênea, eventualmente com presença de grânulos.

5.2.1 Adenoma Pleomórfico

A imuno-expressão dos marcadores utilizados foi especialmente proeminente nas células luminais das estruturas ductais. A marcação de TIMP-1 foi maior nestas células do que a de MMP-9. Nas estruturas não luminais, a maioria dos casos apresentou marcação para ambos os anticorpos, sendo que a marcação de MMP-9 foi maior do que a de TIMP-1. A maioria dos casos não apresentou marcação para ambos os anticorpos nas células mioepiteliais em lençol e a expressão de TIMP-1 apresentou-se maior quando comparada à MMP-9. Nas células mioepiteliais plasmocitoides a maioria dos casos apresentou marcação, e a expressão de TIMP-1 foi maior. No estroma, com áreas mixóides, condróides e hialinas, a maioria dos casos não apresentou marcação para MMP-9, no entanto, para TIMP-1 apenas um caso não teve marcação. A expressão de TIMP-1 foi maior nesta estrutura do que a de MMP-9 (Figura 1A – D).

Os escores individuais de marcação para cada estrutura do AP encontram-se no apêndice A e a média dos escores na tabela 2.

Tabela 2 – Média dos escores de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em cada estrutura do AP

Estrutura	MMP-9	TIMP-1
Células luminais	2,10	3,20
Células não luminais	2,00	1,80
Células mioepiteliais lençol (fusiformes/poligonais)	1,00	2,00
Células mioepiteliais plasmocitóides	1,80	2,30
Estroma (mixóide/condróide/hialino)	0,90	2,40

5.2.2 Mioepitelioma

As células mioepiteliais poligonais, fusiformes e plasmocitóides apresentaram marcação para MMP-9 na grande maioria dos casos e esta expressão foi maior quando comparada com TIMP-1. No caso do estroma, tanto MMP-9 quanto TIMP-1 tiveram a mesma proporção de casos marcados (Figura 1E – H).

Os escores individuais de marcação para cada estrutura do MIO encontram-se no apêndice B e a média dos escores na tabela 3.

Tabela 3 – Média dos escores de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em cada estrutura do MIO

Estrutura	MMP-9	TIMP-1
Células mioepiteliais (poligonais, fusiformes e plasmocitóides)	4,00	1,75
Estroma	1,00	1,00

5.2.3 Carcinoma mucoepidermóide

Nos casos de CME, observou-se células mucosas em lençol com pouca expressão de MMP-9 e de TIMP-1. Na grande maioria das lesões não foram observadas células intermediárias em lençol e nos poucos casos visualizados, houve pouca expressão para MMP-9 e não houve marcação para TIMP-1. Dos casos com células epidermóides em lençol, mais da metade apresentou marcação tanto para MMP-9 quanto para TIMP-1, porém, a expressão de TIMP-1 foi maior. No revestimento dos espaços císticos, observou-se marcação semelhante nas células mucosas e epidermóides para MMP-9 e para TIMP-1, na maioria dos casos. Nas células intermediárias do revestimento dos cistos, poucos casos apresentaram marcação para MMP-9 e TIMP-1 e em algumas lesões essas células não foram visualizadas (Figura 2 A – D).

Os escores individuais de marcação para cada estrutura do carcinoma mucoepidermóide encontram-se no apêndice C e na tabela 4.

Tabela 4 – Média dos escores de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em cada estrutura do CME

	Estrutura	MMP-9	TIMP-1
Lençóis	Células mucosas	1,10	1,80
	Células intermediárias	0,50	0
	Células epidermóides	1,66	2,30
Revestimento dos espaços císticos	Células mucosas	2,14	2,33
	Células intermediárias	1,00	0,50
	Células epidermóides	2,38	2,07

5.2.4 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

A maioria dos casos do APBG mostrou células luminais e não luminais das estruturas tubulares com marcação tanto para MMP-9 quanto para TIMP-1, sendo a imuno-expressão maior para TIMP-1 do que para MMP-9. Nas células luminais das estruturas cribriformes foram observados poucos casos com marcação tanto de MMP-9 quanto de TIMP-1, no entanto esta marcação foi um pouco maior para TIMP-1. Na maioria dos casos não foram visualizadas células não luminais nas estruturas cribriformes, estas células, quando presentes, não marcaram para MMP-9 e foram positivas para TIMP-1 em apenas dois casos. Nas estruturas sólidas, a maioria dos casos apresentou marcação semelhante para MMP-9 e TIMP-1 (Figura 2E – H).

Os escores individuais de marcação para cada estrutura do APBG encontram-se no apêndice D e na tabela 5.

Tabela 5 – Média dos escores de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em cada estrutura do APBG

	Estrutura	MMP-9	TIMP-1
Estrutura Tubular	Células luminais	1,50	2,60
	Células não luminais	1,10	2,50
Estrutura Cribriforme	Células luminais	1,50	2,00
	Células não luminais	0	1,30
Área Sólida		2,70	2,60

5.2.5 Carcinoma adenóide cístico

Nas estruturas tubulares do CAC, observou-se células luminais com marcação para TIMP-1 na maioria dos casos e com marcação para MMP-9 na metade. Nas células não luminais, observou-se que a metade das lesões apresentou marcação tanto para MMP-9 quanto para TIMP-1. Nas estruturas cribriformes, observou-se marcação para MMP-9 nas células luminais em apenas um caso e marcação para TIMP-1 em todos os casos. Nas células não luminais, a maioria dos casos não apresentou marcação para MMP-9 e marcou para TIMP-1. Nas estruturas sólidas, a maioria das lesões apresentou marcação para TIMP-1 e não marcou para MMP-9 (Figura 2 I – L).

Os escores individuais de marcação para cada estrutura do CAC encontram-se no apêndice E na tabela 6.

Tabela 6 – Média dos escores de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em cada estrutura do CAC

Estrutura		MMP-9	TIMP-1
Estrutura Tubular	Células luminais	1,00	2,00
	Células não luminais	1,00	1,00
Estrutura Cribriforme	Células luminais	0,60	2,30
	Células não luminais	0,60	2,00
Área Sólida		0,50	1,75

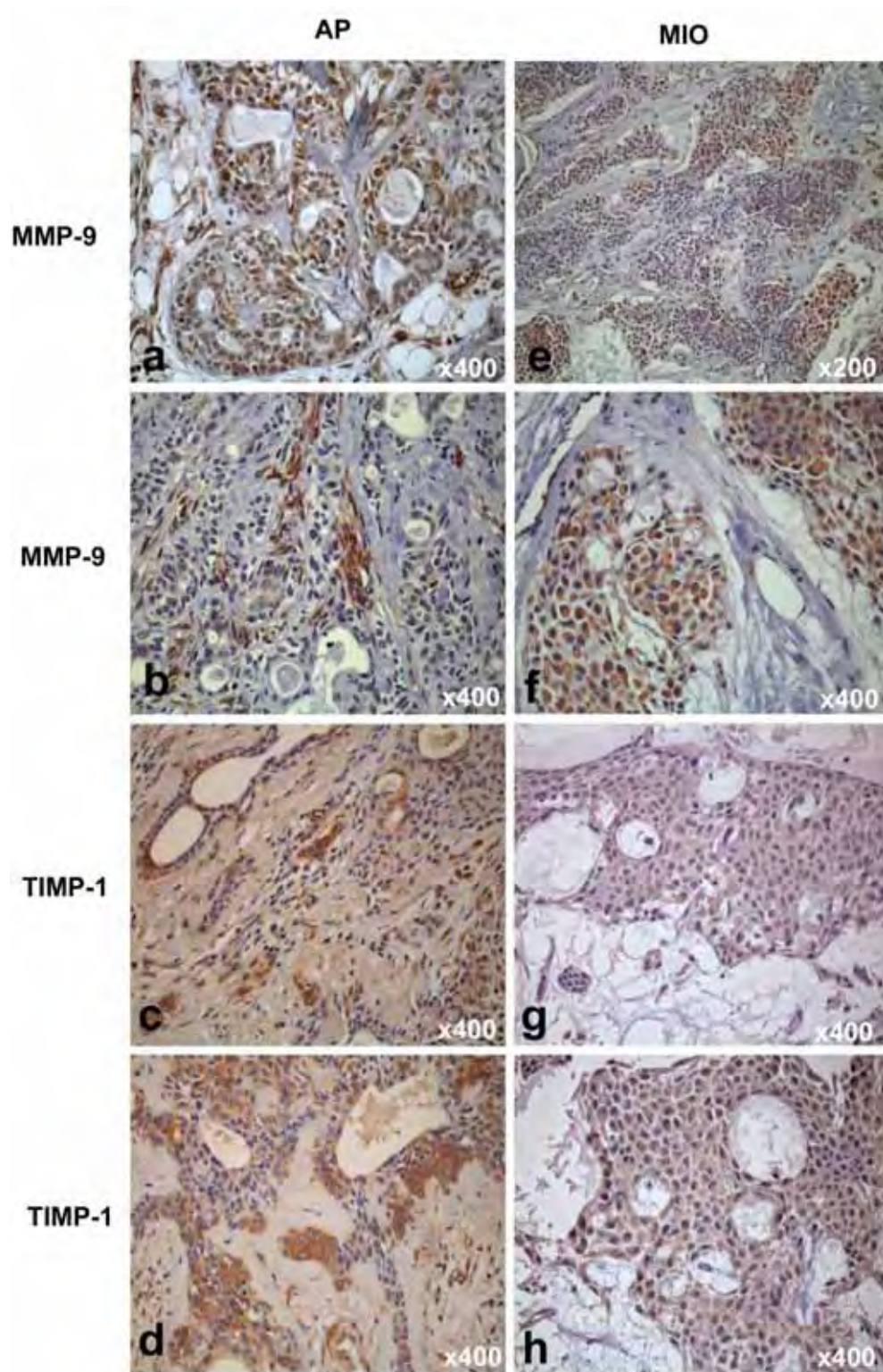


Figura 1 – Marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em casos de adenoma pleomórfico (a, b, c e d) e mioepitelioma (e, f, g e h).

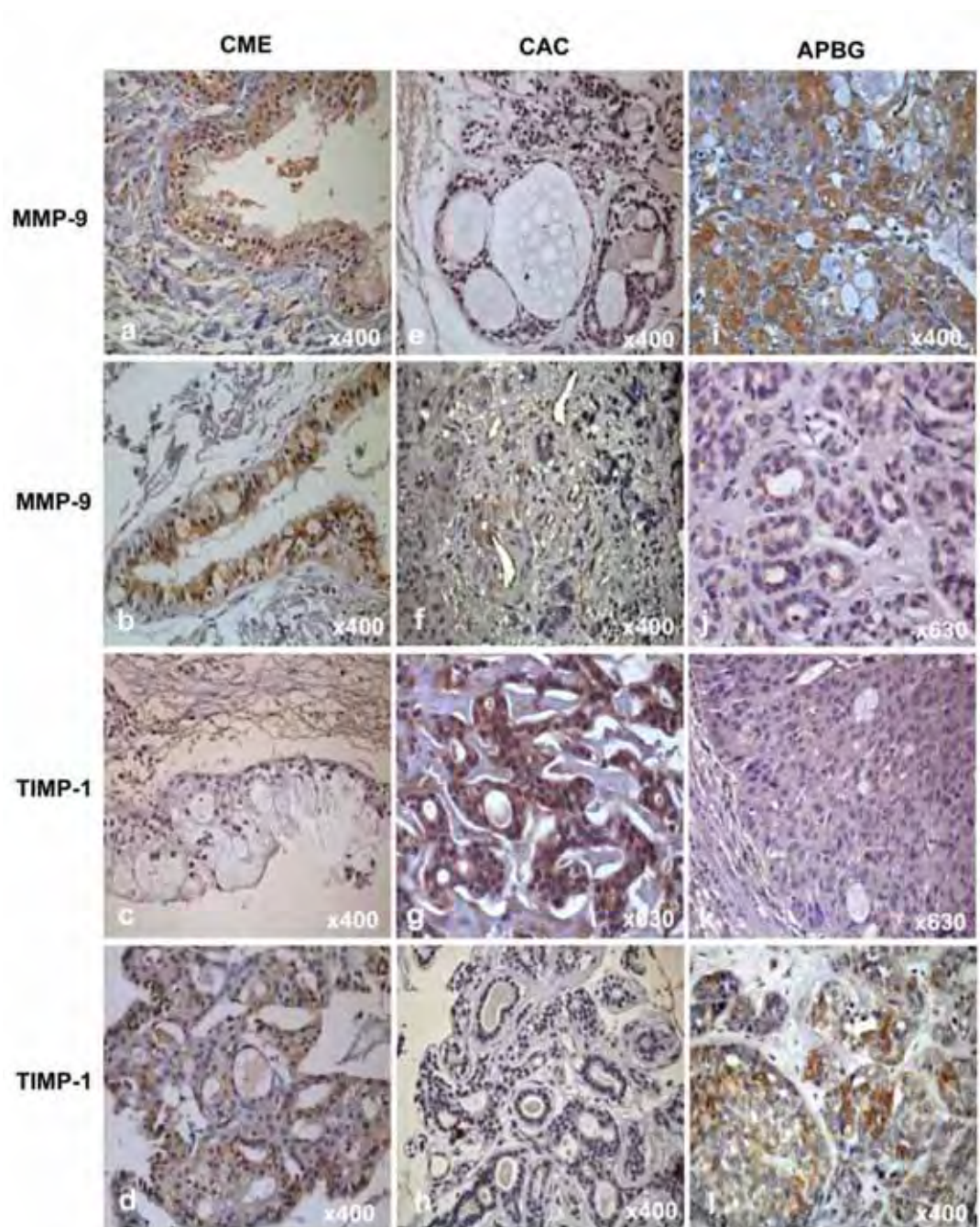


Figura 2 - Marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em casos de carcinoma mucoepidermóide (a, b, c e d), carcinoma adenóide cístico (e, f, g e h) e adenocarcinoma polimorfo (i, j, k e l).

5.3 Análise estatística comparativa dos marcadores MMP-9 e TIMP-1 em cada lesão

Os escores globais de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares encontram-se nos quadros 2 e 3, respectivamente.

Quadro 2 - Escore global de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas de glândulas salivares.

	CASO	MMP-9	TIMP-1
1	4105	2,40	4,60
1	5738	2,00	-
1	5244	0,00	0,00
1	7361	0,00	0,60
1	7472	0,00	-
1	7613	0,00	0,66
1	7846	1,00	0,66
1	8077	1,50	-
1	8084	4,40	3,00
1	8166	2,50	2,20
1	9336	3,75	1,75
1	9973	0,40	1,75
1	9803	4,00	6,00
1	8454	1,50	2,00
1	8437	0,00	2,25
1	10167	1,00	3,50
1	10137	2,40	4,25
1	10818	3,50	2,25
1	10679	0,00	2,00
1	11152	4,00	2,80
2	1089	3,00	1,50
2	5688	2,50	0,00
2	8939	0,00	2,00
2	8266	2,50	-
2	11573	4,50	2,00

1:Adenoma pleomórfico (n=20)

2 : Mioepitelioma (n=05)

– indica que a reação não estava disponível para análise

Quadro 3 - Escore global de marcação imuno-histoquímica para MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias malignas de glândulas salivares

	CASO	MMP-9	TIMP-1
1	10087	-	0,00
1	9128	1,10	1,50
1	7973	1,40	1,40
1	7970	0,00	4,30
1	7749	1,00	-
1	7622	0,00	1,80
1	7617	2,30	2,40
1	7036	0,80	3,00
1	6067	1,10	-
1	5334	0,00	0,50
1	4046	-	1,30
1	3608	-	1,80
1	3635	0,00	0,50
1	3176	2,00	1,30
1	2807	3,00	-
1	1582	4,60	3,20
1	534	2,00	-
2	11466	-	3,00
2	11276	-	3,80
2	9628	0,40	2,00
2	8056	3,20	1,60
2	7281	0,00	0,00
2	7237	0,60	-
2	6397	2,50	0,00
2	6210	1,50	-
2	3782	-	3,00
2	67	3,60	6,00
3	10704	0,00	1,20
3	9787	-	0,60
3	9260	1,30	2,00
3	7235	-	2,00
3	6689	0,00	1,60
3	5627	-	2,00
3	4320	-	2,00
3	3537	2,00	2,20

1: Carcinoma Mucoepidermóide (n=17)

2: Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (n=10)

3: Carcinoma adenóide cístico (n=8)

- indica que a reação não estava disponível para análise

A análise de cada tipo de lesão encontra-se descrita a seguir. Os escores foram comparados pelo teste de sinais de postos de Wilcoxon.

5.3.1 Adenoma pleomórfico

Na tabela 7 a seguir observa-se a estatística descritiva dos valores de mediana, mínimo e máximo encontrados para cada anticorpo no adenoma pleomórfico e na figura 3 a distribuição dos escores atribuídos para cada anticorpo.

Tabela 7 - Estatística descritiva da mediana, valor mínimo e valor máximo dos escores atribuídos para MMP-9 e TIMP-1 nos casos de adenoma pleomórfico

Lesão	Anticorpos	N	Mínimo	Mediana	Máximo
AP	MMP9	17	0,0	1,8	4,2
	TIMP1	17	0,0	2,0	6,0

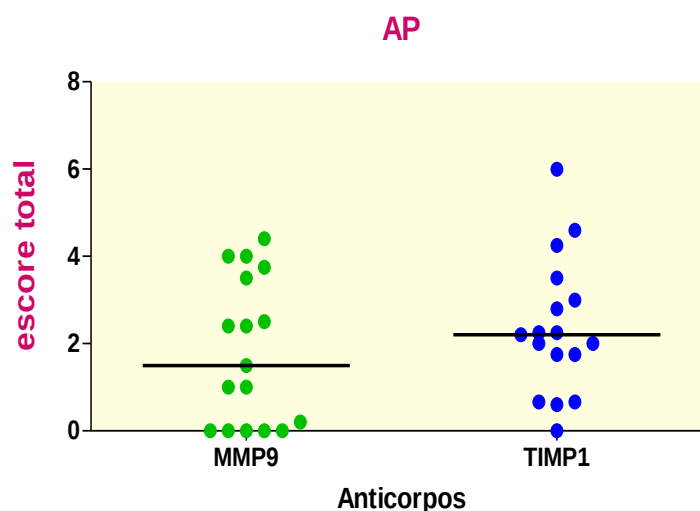


Figura 3 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) representativo da dispersão dos escores ao redor do valor mediano de cada anticorpo para os casos de adenoma pleomórfico.

A distribuição dos valores é a mesma em cada anticorpo, segundo o teste de sinais de postos de Wilcoxon ($p\text{-valor} = 0,102 > 0,05$).

5.3.2 Mioepitelioma

Na tabela 8 a seguir observa-se a estatística descritiva dos valores de mediana, mínimo e máximo encontrados para cada anticorpo no mioepitelioma e na figura 4 a distribuição dos escores atribuídos para cada anticorpo

Tabela 8 - Estatística descritiva da mediana, valor mínimo e valor máximo dos escores atribuídos para MMP-9 e TIMP-1 nos casos de mioepitelioma

Lesão	Anticorpos	N	Mínimo	Mediana	Máximo
MIO	MMP9	4	0,0	2,8	4,5
	TIMP1	4	0,0	1,8	2,0

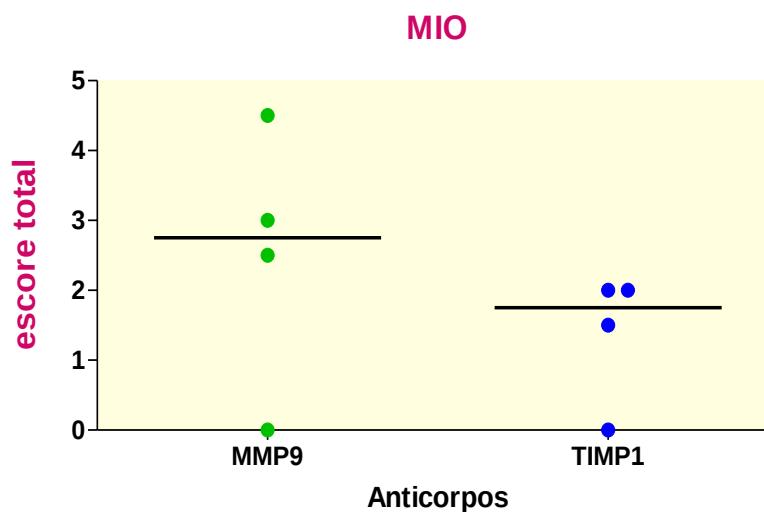


Figura 4 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) representativo da dispersão dos escores ao redor do valor mediano de cada anticorpo para os casos de mioepitelioma.

A distribuição dos valores é a mesma em cada anticorpo, segundo o teste de sinais de postos de Wilcoxon ($p\text{-valor} = 0,357 > 0,05$).

5.3.3 Carcinoma mucoepidermóide

Na tabela 9 a seguir observa-se a estatística descritiva dos valores de mediana, mínimo e máximo encontrados para cada anticorpo no carcinoma mucoepidermóide e na figura 5 a distribuição dos escores atribuídos para cada anticorpo.

Tabela 9 - Estatística descritiva da mediana, valor mínimo e valor máximo dos escores atribuídos para MMP-9 e TIMP-1 nos casos de carcinoma mucoepidermóide

Lesão	Anticorpos	N	Mínimo	Mediana	Máximo
CME	MMP9	10	0,0	1,2	4,6
	TIMP1	10	0,0	2,1	4,3

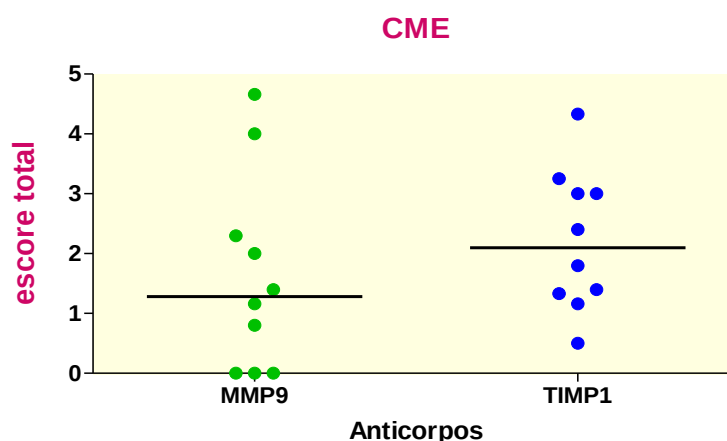


Figura 5 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) representativo da dispersão dos escores ao redor do valor mediano de cada anticorpo para os casos de carcinoma mucoepidermóide.

A distribuição dos valores é a mesma em cada anticorpo, segundo o teste sinais de postos de Wilcoxon ($p\text{-valor} = 0,461 > 0,05$).

5.3.4 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade:

Na tabela 10 a seguir observa-se a estatística descritiva dos valores de mediana, mínimo e máximo encontrados para cada anticorpo no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade e na figura 6 a distribuição dos escores atribuídos para cada anticorpo.

Tabela 10 - Estatística descritiva da mediana, valor mínimo e valor máximo dos escores atribuídos para MMP-9 e TIMP-1 nos casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

Lesão	Anticorpos	N	Mínimo	Mediana	Máximo
APBG	MMP9	5	0,0	2,2	3,8
	TIMP1	5	0,0	1,8	6,2

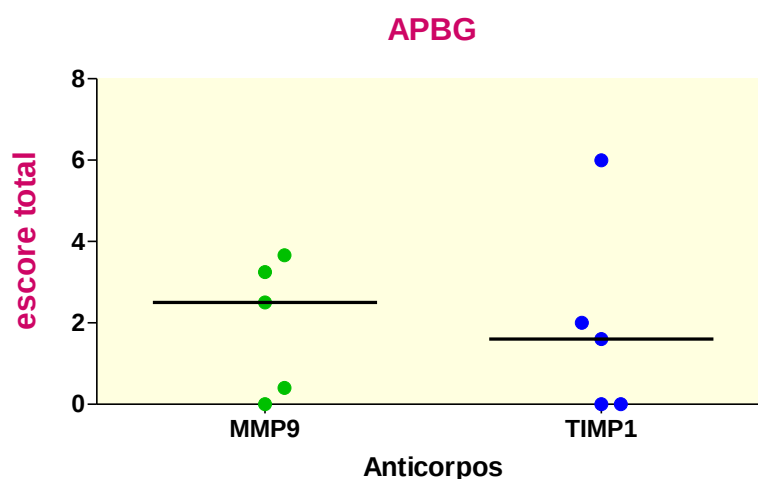


Figura 6 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) representativo da dispersão dos escores ao redor do valor mediano de cada anticorpo para os casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade.

A distribuição dos valores é a mesma em cada anticorpo, segundo o teste sinais de postos de Wilcoxon ($p\text{-valor} = 0,875 > 0,05$).

5.3.5 Carcinoma adenóide cístico:

Na tabela 11 a seguir observa-se a estatística descritiva dos valores de mediana, mínimo e máximo encontrados para cada anticorpo no carcinoma adenóide cístico e na figura 7 a distribuição dos escores atribuídos para cada anticorpo.

Tabela 11 - Estatística descritiva da mediana, valor mínimo e valor máximo dos escores atribuídos para MMP-9 e TIMP-1 nos casos de carcinoma adenóide cístico

Lesão	Anticorpos	N	Mínimo	Mediana	Máximo
CAC	MMP9	4	0,0	0,6	2,0
	TIMP1	4	1,2	1,7	2,3

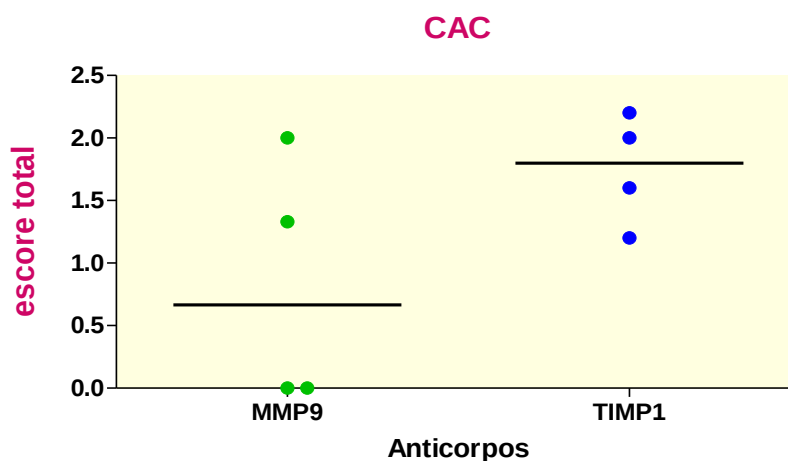


Figura 7 - Gráfico de pontos (*dot-plot*) representativo da dispersão dos escores ao redor do valor mediano de cada anticorpo para os casos de carcinoma adenóide cístico.

A distribuição dos valores é a mesma em cada anticorpo, segundo o teste de sinais de postos de Wilcoxon ($p\text{-valor} = 0,125 > 0,05$).

5.4 Comparação da marcação para MMP-9 e TIMP-1 entre lesões benignas e malignas

A estatística descritiva dos dados obtidos para as lesões benignas e malignas encontra-se nas tabelas 12 e 13.

Tabela 12 - Lesões **Benignas**. Estatística descritiva dos escores obtidos para marcação de TIMP-1 e MMP-9

Anticorpo	Estatística	AP	MIO
TIMP1	N	17	4
	Mínimo	0	0
	Mediana	2,20	1,75
	Máximo	6,00	2,00
MMP9	N	20	5
	Mínimo	0	0
	Mediana	1,50	2,50
	Máximo	4,40	4,50

Tabela 13 - Lesões **Malignas**. Estatística descritiva dos escores obtidos para marcação de TIMP-1 e MMP-9

Anticorpo	Estatística	CME	APBG	CAC
TIMP1	N	12	8	8
	Mínimo	0	0	0,66
	Mediana	1,81	2,50	2,00
	Máximo	4,33	6,00	2,20
MMP9	N	14	7	4
	Mínimo	0	0	0
	Mediana	1,28	1,50	0,66
	Máximo	4,66	3,66	2,00

Foi realizada análise estatística para comparação da marcação para cada anticorpo entre as lesões benignas e malignas, consideradas individualmente, pelo teste de Mann-Witney (tabela 14).

Tabela 14 - Comparação entre as lesões benignas e malignas individualmente. Resultado do teste de Mann-Whitney (p-valor)

		Lesões Benignas	Lesões Malignas		
			CME	APBG	CAC
TIMP1	AP	0,594	1,000	0,278	
	MIO	0,626	0,342	0,427	
MMP9	AP	0,986	0,911	0,304	
	MIO	0,244	0,566	0,104	

O teste estatístico demonstrou que não houve diferença estatisticamente significativa na imuno-expressão dos marcadores quando se comparou individualmente cada lesão benigna com cada lesão maligna.

A comparação da marcação para cada anticorpo entre o conjunto de lesões benignas e o conjunto de lesões malignas foi realizada pelo teste de Mann-Whitney. Notou-se que as lesões benignas não diferem estatisticamente das malignas, com relação à expressão de MMP-9 (MW; p-valor = 0,4868; $P > 0,05$) e de TIMP-1 (MW; p-valor = 0,7457; $P > 0,05$) (Figura 8).

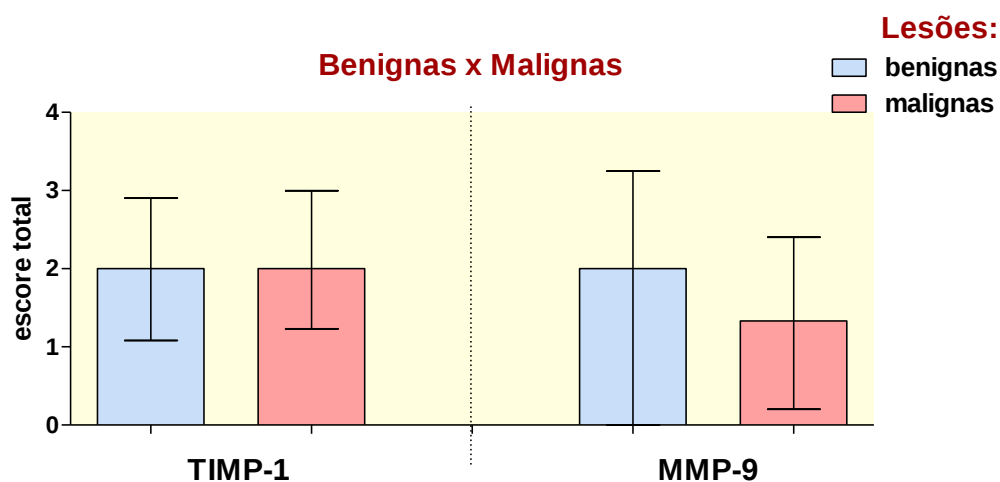


Figura 8 - Gráfico de colunas (mediana $\pm$ faixa inter-quartil) dos valores de escore obtidos entre as lesões benignas e malignas.

6 DISCUSSÃO

Os tumores das glândulas salivares mostram uma diversidade morfológica entre os diferentes tipos e, por vezes, até mesmo dentro de uma única massa tumoral. Além disso, a propensão para alguns tumores benignos progredirem para a malignidade pode confundir a interpretação histopatológica (Barnes et al., 2005).

O comportamento clínico do câncer de glândula salivar e as respostas ao tratamento variam em função dos diferentes tipos histológicos de tumor, bem como dentro de uma mesma entidade histológica, o que é muitas vezes associado com a heterogeneidade biológica destas neoplasias. Estas características, portanto, complicam o uso de ferramentas para o diagnóstico e prognóstico quando da determinação da agressividade de uma neoplasia maligna (Luukkaa et al., 2008).

Os tumores de glândulas salivares são incomuns e constituem 2 - 6,5% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço (Ellis, Auclair, 1996). A incidência média dos vários tumores de glândulas salivares é baixa e estudos epidemiológicos muitas vezes baseiam-se em números limitados de casos. Estudos de várias partes do mundo têm mostrado diferenças na incidência de tumores de glândulas salivares e variações na frequência de cada tipo histológico (Luksic et al. 2011). Na maioria dos estudos a neoplasia benigna mais comum é o adenoma pleomórfico e o maligno, o carcinoma mucoepidermóide (Williams et al 2001; Nagel et al.,2004; Oliveira et al., 2009; Luksic et al., 2011). A casuística analisada neste trabalho apresentou características semelhantes.

Na análise dos 25 casos de neoplasias benignas de glândulas salivares menores, observamos o predomínio do gênero feminino, correspondente a 56%. Entre os 35 casos de neoplasias malignas 58,14% dos pacientes eram do gênero feminino. Estes resultados de ligeira predominância do gênero feminino estão de acordo com os de Williams et al. (2001), que encontraram 59,4% dos tumores de glândulas salivares acometendo o gênero feminino. Por outro lado, Luksic et al. (2011), em seu estudo com 779 pacientes com tumores de glândulas salivares, observaram que 392 casos (50,3%) eram do gênero masculino e 387 (49,7%) pertenciam ao gênero feminino.

A média de idade dos pacientes com neoplasias benignas foi de 42,6 anos. Nos casos de neoplasias malignas, a média geral de idade foi de 52 anos. A maioria dos trabalhos mostra que a média de idade dos pacientes com neoplasia maligna é superior à dos pacientes com neoplasia benigna. Luksic et al. (2011) encontraram uma média de idade para pacientes com tumores benignos de 50 anos e para pacientes com tumores malignos a média de idade foi de 56 anos.

Neste estudo, a localização mais comum tanto para as lesões benignas quanto para as malignas foi o palato. Tal localização também foi mais comum nos estudos de Luksic et al. (2011). Segundo Neville et al. (2009) a porção posterior do palato duro e palato mole são as regiões mais ricas em glândulas salivares menores o que justificaria tais achados.

Como as neoplasias glandulares apresentam grande variação morfológica, tanto em diferentes casos quanto na mesma lesão, optou-se por analisar as principais estruturas componentes de cada neoplasia, atribuindo a elas escores parciais. O escore global consistiu na média dos escores parciais de cada lesão, de acordo com o trabalho de Prado et al. (2011).

Neste estudo, a marcação imuno-histoquímica de MMP-9 e TIMP-1 foi avaliada por meio de escores semiquantitativos de 0 a 6

baseados na soma dos escores da porcentagem de células tumorais positivas (0-3 pontos) e na intensidade de marcação (0-3 pontos). Este tipo de avaliação foi realizado devido à impossibilidade de se efetuar uma análise quantitativa objetiva da marcação imuno-histoquímica para as duas proteínas estudadas. O mesmo tipo de análise semi-quantitativa foi utilizado nos estudos realizados por Nagel et al. (2004).

As MMPs são uma família de enzimas secretadas por vários tipos de células e desempenham um importante papel nos processos de remodelação fisiológica da matriz extracelular (MEC). Além do mais, são responsáveis por uma série de eventos proteolíticos, controlados por seus inibidores endógenos, os TIMPs (Nagel et al., 2004).

O equilíbrio entre MMPs e TIMPs é um importante fator para a manutenção da homeostase da MEC (Can et al., 2008). Alterações neste equilíbrio podem levar a degradação da MEC e, portanto, preparar o caminho para que as células tumorais possam migrar, invadir e se espalhar para áreas distantes, onde formam metástases (Bourboullia et al., 2010).

Particularmente, entre os vários grupos de metaloproteinases, neste estudo, analisamos a participação da gelatinase B (MMP-9) em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares. A MMP-9 é capaz de degradar o colágeno IV, um importante componente da MEC e da membrana basal, entre outros substratos, o que parece ser muito importante para os processos de invasão e metástase de células tumorais (Nagase, Woessner, 1999).

Também analisamos a participação do inibidor tecidual de metaloproteinase, TIMP-1. Este parece ser o mais importante inibidor endógeno, entre suas funções está a de se ligar não covalentemente à collagenase intersticial ativada e gelatinases (Can et al., 2008).

A imuno-histoquímica compreende o processo de identificação de antígenos em secções de tecidos com auxílio de anticorpos específicos, e tem sido utilizada como uma ferramenta auxiliar

no diagnóstico e prognóstico de várias lesões. Luukkaa et al. (2008) utilizaram tal técnica em seu trabalho para analisar a participação das metaloproteinases de matriz como fator de prognóstico no câncer de glândulas salivares. Barros et al. (2011) elegeram a imuno-histoquímica como método de investigação, principalmente porque permite que se faça uma correlação direta com a morfologia do espécime e por ser um método que pode ser utilizado em tecidos incluídos em parafina, o que facilita a obtenção da amostra. Em nosso estudo investigamos a presença de MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, comparando sua expressão em cada lesão e entre lesões benignas e malignas, utilizando para isso a reação imuno-histoquímica.

A análise estatística comparativa dos marcadores MMP-9 e TIMP-1 em cada lesão mostrou que a distribuição dos valores é semelhante para cada anticorpo, porém, em alguns casos observamos uma maior participação de MMP-9 ou de TIMP-1.

Nos casos de adenoma pleomórfico, verificamos que a marcação imuno-histoquímica para TIMP-1 foi maior que para MMP-9 nas células luminais ductais, células mioepiteliais poligonais e fusiformes em lençol, células mioepiteliais plasmocitóides e estroma, sendo a marcação para MMP-9 maior que para TIMP-1 apenas nas células ductais não luminais. Obteve-se assim uma maior marcação para TIMP-1 na maioria dos componentes do AP, quando comparada com MMP-9. Este achado é coerente com a natureza benigna do tumor. No entanto, Nagel et al.(2004), sem entrar em detalhes sobre as estruturas do adenoma pleomórfico analisadas, observaram que a marcação para MMP-9 foi maior que a observada para TIMP.

Zhang et al. (2009) também observaram que nas estruturas ductiformes do AP, a MMP-9 foi fracamente expressa na membrana das células luminais e fortemente expressa na membrana basal, quando comparada com outros marcadores como TIMP-1. Os autores não detectaram a expressão de RNAm de MMP-9 em dois dos

seis casos de AP, sugerindo que a expressão desta metaloproteinase, por vezes, é instável e mantida a níveis quase imperceptíveis nos AP. Os autores também notaram que os dois casos que não tiveram nenhuma expressão do RNAm de MMP-9 eram tumores visivelmente maiores com maior tempo de evolução. Entretanto, devido ao pequeno tamanho da amostra e seguimento limitado, não concluíram se havia relação entre MMP-9 e tamanho do AP e se a quantidade de RNAm de MMP-9 está relacionada com o potencial de progressão do tumor.

Nos casos de mioepitelioma, as células mioepiteliais poligonais, fusiformes e plasmocitóides apresentaram marcação para MMP-9 na grande maioria dos casos e, esta expressão foi maior quando comparada com TIMP-1. No estroma, tanto MMP-9 quanto TIMP-1 tiveram a mesma proporção de casos marcados. Resultados semelhantes foram observados por Nagel et al.(2004) que encontraram escores de marcação maior para MMP-9 que para TIMP-1 em casos de mioepitelioma. A maior marcação para MMP-9 nas células mioepiteliais em lençol e plasmocitóides do mioepitelioma diferiu da observada em áreas correlatas do adenoma pleomórfico. A maior expressão imuno-histoquímica de MMP-9 no mioepitelioma poderia indicar uma diferença no potencial de agressividade desta lesão em relação ao adenoma pleomórfico. Entretanto, seria necessário um estudo com maior número de casos e seguimento clínico a fim de verificar se existe essa relação.

Nos casos de carcinoma mucoepidermóide, comparando as células mucosas, intermediárias e epidermóides organizadas em lençol, observamos que a marcação para MMP-9 e TIMP-1 apresentou-se um pouco maior nas células epidermóides. Observamos também maior marcação para MMP-9 e TIMP-1 nas células mucosas e epidermóides dos revestimentos dos espaços císticos, quando comparadas com as células intermediárias. Nagel et al.(2004) também encontraram um padrão de expressão de MMPs e TIMPs em carcinoma mucoepidermóides que variou entre os diferentes tipos de células tumorais. Estes autores

observaram maior expressão imuno-histoquímica de MMP-2 e MMP-9 em células intermediárias e epidermóides, o que foi confirmado por análise zimográfica. Em células mucosas a expressão imuno-histoquímica mostrou-se fraca ou negativa.

Foi verificado, nos casos de APBG, que células luminais e não luminais das estruturas tubulares mostraram marcação tanto para MMP-9 quanto para TIMP-1, porém, maior para TIMP-1. Observação semelhante foi encontrada para as células luminais das estruturas cribriformes. Entretanto, nas células não luminais destas estruturas não foi visualizada marcação para MMP-9 e poucos casos marcaram para TIMP-1. As áreas sólidas apresentaram marcação expressiva na maioria dos casos para ambos os marcadores.

Do total de casos de APBG analisados neste trabalho, em apenas cinco foi possível realizar as reações imuno-histoquímicas para os dois marcadores. Comparando estes cinco casos, verifica-se que a expressão de MMP-9 foi maior que a de TIMP-1. A maior expressão de MMP-9 pode estar relacionada ao padrão de crescimento infiltrativo do APBG (Barnes et al. 2005). Por outro lado, o APBG apresenta baixo potencial metastático (Barnes et al. 2005) e Azuma et al.(1993) relacionam a capacidade metastática de neoplasias de glândula salivar com diminuição da expressão de TIMP-1, além do aumento de várias metaloproteinases. Talvez a MMP-9 não seja tão importante para determinar a capacidade metastática de neoplasias de glândulas salivares.

No presente estudo, verificou-se nos casos de carcinoma adenóide cístico que as células luminais e não luminais das estruturas tubulares e cribriformes tiveram um padrão semelhante de marcação para MMP-9. A marcação de TIMP-1 variou entre as estruturas e foi maior que a de MMP-9, exceto nas células não luminais ductais. Apesar do possível papel supressor tumoral de TIMPs, Nagel et al. (2004) também

encontraram escores de marcação aumentados para TIMPs em carcinomas, quando comparados com adenomas.

Na amostra estudada, realizou-se também a comparação da marcação para MMP-9 e TIMP-1 entre lesões benignas e malignas. O teste estatístico demonstrou que não houve diferença significativa na imuno-expressão dos marcadores. No estudo de Nagel et al.(2004) a expressão de MMPs e TIMPs foi comparada em diferentes tumores benignos e malignos de glândulas salivares. Os escores imuno-histoquímicos de MMP-2 detectados em células tumorais foram significativamente aumentados em tumores malignos quando comparados com benignos, enquanto que os escores imuno-histoquímicos de MMP-9 não tiveram diferença significativa entre benignos e malignos.

No presente trabalho, observou-se que a marcação para TIMP-1 foi ligeiramente maior nos casos de neoplasias malignas, indicando que as TIMPs não teriam papel importante na função supressora tumoral em carcinomas de glândulas salivares, conforme sugerido por Nagel et al.(2004).

Zhang et al. (2009) compararam, em adenomas pleomórficos, a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP1 e TIMP2 em epitélio ductal e células mioepiteliais envoltas por estroma. Notaram que o aumento da expressão de MMPs foi seguido pelo aumento da expressão de TIMPs, sugerindo uma correlação positiva entre MMPs e seus inibidores teciduais. Segundo os autores, o aumento de TIMPs representa uma tentativa fisiológica para controlar a atividade aumentada de MMPs e manter uma relação equilibrada entre as duas proteínas.

Em tumores malignos de glândula salivar, Nagel et al.(2004) sugerem um desequilíbrio no balanço entre MMPs e TIMPs.

Barros et al. (2011) observaram menor expressão imuno-histoquímica de gelatinases em carcinomas epidermóides do que de MMP-1, com relação a outras metaloproteinases. Segundo os autores, em uma fase mais precoce haveria maior expressão de gelatinases, que

atuam na clivagem de proteínas como o colágeno IV, importante para a ruptura da membrana basal. Com a evolução da neoplasia, haveria uma variação, com maior expressão de outras metaloproteinases. É possível que nas neoplasias glandulares malignas haja também uma variação na expressão imuno-histoquímica das metaloproteinases e de seus inibidores, conforme a fase de evolução da lesão.

Uma das hipóteses para a discrepância entre resultados de diferentes trabalhos seria o uso de metodologias diferentes, especialmente no que diz respeito aos critérios utilizados para avaliar o grau de positividade (Barros et al., 2011). Segundo estes autores, o processamento dos espécimes teciduais e os anticorpos utilizados são outros fatores com potencial de gerar divergências de resultados, o que poderia ter ocorrido em nosso trabalho.

Outro fator que poderia interferir nos resultados seria a forma de realização das reações imuno-histoquímicas, manual ou automática. Luukkaa et al. (2008) observaram, em estudos sobre a expressão de MMPs em câncer de glândula salivar, que o uso de um dispositivo de imuno-marcação totalmente automático permitiu uma melhor análise, aumentando a confiabilidade da amostra.

A expressão de MMPs e TIMPs em tumores de glândulas salivares não está bem estabelecida na literatura. Os trabalhos existentes mostram que diversas metaloproteinases e seus inibidores estão presentes nessas lesões, porém, não há consenso sobre a importância de cada tipo específico dessas proteínas para os diferentes grupos de neoplasias glandulares. Estudos adicionais são necessários para se entender melhor a relação desses marcadores com o desenvolvimento, a evolução e o prognóstico de neoplasias salivares.

7 CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesse estudo permitiu concluir que:

- a) as proteínas MMP-9 e TIMP-1 estão presentes na maioria das neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares;
- b) o grau de expressão imuno-histoquímico de MMP-9 e TIMP-1 variou entre as diferentes estruturas componentes de uma mesma neoplasia, com predomínio de TIMP-1, independente da natureza, benigna ou maligna da lesão;
- c) entre as lesões benignas, houve predomínio da expressão de TIMP-1 no adenoma pleomórfico e de MMP-9 no mioepitelioma. Entre as malignas, houve predomínio de TIMP-1 no carcinoma mucoepidermóide e carcinoma adenóide cístico e de MMP-9 no adenocarcinoma polimorfo de baixo grau. Dessa forma, conclui-se que a expressão dos dois marcadores é variável em neoplasias de glândula salivar e independe da natureza benigna ou maligna das mesmas.
- d) a capacidade invasiva e disseminativa das neoplasias de glândula salivar independe do grau de expressão imuno-histoquímica de MMP-9 e TIMP-1, portanto, estes marcadores não são importantes para a avaliação prognóstica dessas neoplasias.

8 REFERÊNCIAS*

Abbas AK; Fausto N; Kumar V. Robbins, Cotran. Patologia. Bases Patológicas das doenças 8 Ed. 2010.

Arriagada WAG, Silva ARS, Ito FA, Vargas PA, Lopes MA. Calcifications may be a frequent finding in mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands:a clinicopathologic study. Oral and maxillofacial pathology. 2011; 111(4):482-5.

Azuma M, Tamatani T, Fukui K et al. Role of plasminogen activators, metalloproteinases and the tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the metastatic process of human salivary-gland adenocarcinoma cells. Int. J. Cancer 1993; 54(669–76).

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World health organization's histological classification of tumours, Volume 9. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Berlin: Springer Verlag; 2005.

Barros SSLV, Henriques ACG, Pereira KMA, Medeiros AMC, Galvão HC, Freitas RA. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases insquamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. Archive of Oral Biology. 2011; N(1010-16)

Baker EA, Leaper DJ, Hayter JP, Dickenson AJ. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. Brit J of Oral and Maxillofac Surg, 2006; 44: 482-6.

Birkedal-Hansen H, Moore WGI, Bodden Mk, Windsor LJ, Birkedal-Hansen B, De Carlo A, Engler JA. Matrix metalloproteinases: a review. Crit Rev Oral Biol Med.1993;4(2):197-250.

*Baseado em:International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bourboulia D, Stetler-Stevenson WG .Matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): Positive and negative regulators in tumor cell adhesion. *Seminars in Cancer Biology*.2010; 20: 161–68.

Brasileiro-Filho, G. Bogliolo *Patologia Geral*. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

Can IH, Ceylan K, Caydere M, Samim EE, Ustun H, Karasoy DS.The expression of MMP-2, MMP-7, MMP-9, and TIMP-1 in chronic rhinosinusitis and nasal polyposis. *Head and Neck Surgery*. 2008; 139, 211-5.

Chinellato L.E.M, et al. Estudos da prevalência dos tumores de origem epitelial de glândulas salivares em services de anatomia patológica das cidades de Bauru e Jaú (Estado de São Paulo, Brasil). *Ver. FOB*, v.2, n.1, p. 45-51, 1994.

Curran S, Murray GI: Matrix metalloproteinases in tumour invasion and metastasis. *J Pathol*. 1999; (189): 300–8.

Dodd RL, Slevin NJ. Salivary gland adenoid cystic carcinoma: A review of chemotherapy and molecular therapies. *Oral Oncology*. 2006;(42): 759-69.

Ellis GL, Auclair PL. *Atlas of tumor pathology: tumors of the salivary glands*. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1996. 468p.

Folgueras AR. Matrix metalloproteinases in cancer: from new functions to improved inhibition strategies. *Int J Dev Biol*.2004; (48):411-24.

Gnepp DR. *Diagnostic surgical pathology on the head and neck*. 2nd Ed. Saunders: Elsevier; 2009.1205p.

Hong SD, Hong SP, Lee JI, Lim CY. Expression of metalloproteinase-2 and-9 in oral squamous cell carcinomas with regard to the metastatic potential. *Oral Oncol*.2000;(36): 207-13.

Howard EW, Bullen EC, Banda MJ. Preferential inhibition of 72- and 92-kDa gelatinases by tissue inhibitor of metalloproteinases-2. *J Biol Chem.*1991; 266(20): 13070-5.

Kahari VM, Saarialho-Kere U. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med.*1999; (31): 34-45.

Kerkela E, Saarialho-kere U. Matrix metalloproteinases in tumor progression: focus on basal and squamous cell skin cancer. *Exp Dermatol.*2003; 12(2): 109-25.

Kessenbrock K, Plaks V, Werb Z. Matrix metalloproteinases: regulators of the tumor microenvironment. *Cell.* 2010 141(1): 52-67.

Kondratiev S, Gnepp DR, Yakirevich E, Sabo E, Annino DJ, Rebeiz E, Laver NV. Expression and prognostic role of MMP2, MMP9, MMP13, and MMP14 matrix metalloproteinases in sinonasal and oral malignant melanomas. *Human Pathol.*2008; (39):337-43.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins & Cotran. Patologia. Bases patológicas das doenças .8. Ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2008 cap.7, p. 259-330.

Kusukawa J, Sasaguri Y, Morimatsu M, Kmeyama T. Expression of matrix metalloproteinase-3 in stage I and II squamous cell carcinoma of the oral cavity. *J.oral Maxillofac Surg.*1995; 53(5): 530-4.

Leivo I. Insights into a complex group of neoplastic disease: Advances in histopathologic classification and molecular pathology of salivary gland cancer. *Acta Oncologica.*2006; (45):662-8.

Lu P, Weaver VM, Werb Z. The extracellular matrix: A dynamic niche in cancer progression. *J Cell Biol.* 2012 Feb;196 (4):395-406.

Luksic I, Virag M, Manojlovic S, Macan D, Salivary gland : 25 years of experience from a single institution in Croatia. *Journal of Cranio-maxillo-Facial Surgery.* 2011; 5(2):1010-16.

Luukkaa H, Klemi P, Hirsimäki P, Vahlberg T, Kivisaari A, Kahari V-M, Grenman R. Matrix metalloproteinase (MMP)-1, -9 and -13 as prognostic factors in salivary gland cancer. *Acta Oto-Laryngologia*.2008;(128) 482-90.

Maidment SL, Rucklidge GJ, Rooprai HK, Pilkington GJ. A inverse correlation expression of NCAM-A and human glioma cells in vitro. *Cancer Lett*.1997;(116): 71-7.

Menezes DJB, Carvalho VG, Gromatzky A, Jahn RS, Sendyk. The influence of the Matrix Metalloproteinases (MMPs) in periodontal and Peri-Implantar Disease. *Odontologia*. 2009; 8(2):99-103.

Nagel H, Laskawi R, Wahlers A, Hemmerlein B. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1, -2, and -3 in benign and malignant tumours of the salivary gland. *Histopathol*.2004; (44):222-31.

Nakopoulou L, Giannopoulou I, Stefanaki K, Panayotopoulou E, Tsirmpa I, Alexandrou P, et al. Enhanced mRNA expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in breast carcinomas is correlated with adverse prognosis. *J Pathol*.2002;197 (3): 307-13.

Neville BW, Damm DD, Allen CM. Bouquout JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Saunders-Elsevier; 2009. 972 p.

Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira AT, Máximo AA, Aquino EC, Alencar RC. Salivary Gland Tumor. A Review of 599 Cases in Brazilian Population. *Head and neck Pathol*.2009; (3): 271-5.

Pardo A, Selman M. Matrix metaloproteinases and lung injury. *Braz J Med Biol Res*.1996; (29): 1109-15 .

Patel BP, Shan PM, Rawal UM, Desai AA, Shah SV, Rawal RM, Patel PP. Activation of MMP-2 and MMP-9 in Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. *Journal of Surgical Oncology*. 2005;(90):81–88.

Polette M, Nawrocki-Raby B, Gilles C, Clavel C, Birembout P. Tumour invasion and matrix metalloproteinases. *Crit rev Oncol Hematol*.2004; (3):179-86.

Prado RF, Lima CF, Pontes HAR, Almeida JD, Cabral LAG, Carvalho YR. Calcifications in a clear cell mucoepidermoid carcinoma: a case report with histological and immunohistochemical findings. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007; (104): 40-4.

Prado RF, Machado AL da S, Colombo CED, Carvalho YR. Immunohistochemical study of the expression of fatty acid synthase and Ki-67 in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*. 2011; (40): 467–75.

Rao JS, Bhoopathi P, Chetty C, Gujrati M, Lakka SS. MMP-9 SiRNA induced senescence resulting in inhibition of medulloblastoma growth via p16INK4A and MAPK pathway. *Cancer Res*.2007; (10): 4956-64.

Salo T, Lyons JG, Rahemtulla F, Birkedal-Hansen H, Larjava H. Transforming growth factor beta-I up-regulates type IV collagenase expression in cultured human Keratinocytes. *J Biol Chem*.1991; 266(18):1436-41.

Sequeiros SG, Garcia CD, Fresno MF, Suarez C, Rodrigo J, Gonzalez MV. Oncogene amplification patterns in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. *Oncol. Rep*. 2009; (21): 1215–22.

Silveira EJD, Piva MR, Galvão HC, Souza LB, Freitas RA. Role of matrix metalloproteinases in the etiopathogeny of odontogenic cysts. *J Bras Patol Med Lab*. 2007; (3.): 203-09.

Simpson RHW, Reis-Filho JS, Pereira EM, Ribeiro AC, Abdulkadir A. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of the salivary glands with transformation to high-grade carcinoma. *Histopathology*.2002; (41): 250–59.

Sorsa T, TJaderhane L, Salo T. Matrix metalloproteinases (MMPs) in oral diseases. *Oral Diseases*. 2004; (10): 311-18.

Souza AP, Line SRP. The biology of matrix metalloproteinases. *Rev Fac Odontol Bauru*. 2002; 10(1): 1-6.

Stamenkovic I. Matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *Semin Cancer Biol*. 2000; (6): 415-33.

Stetler-Stevenson WG, Liotta LA, Kleiner DE. Extracellular matrix 6: role of matrix metalloproteinases in tumor invasion and metastasis. *FASEB J*. 1993; (15): 1434-4.

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.

Vicente JC, Fresno MF, Villalain L, Vega JA, Vallejo GH. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2005; 41(3): 283-93.

Wigner NA, Kulkarni N, Yakavonis M, Young M, Tinsley B, Meeks B, et al. Urine matrix metalloproteinases (MMPs) as biomarkers for the progression of fracture healing. *Injury*. 2011; 5-38.

Williams NP, Boyd DL, Choy L, Hanchard B. Salivary gland lesions: A Jamaican Perspective. *West Indian Med J*. 2001; 50(1):62-5.

Woessner JF, Nagase H. *Matriz Metalloproteinases and TIMPs*. New York: Oxford University Press; 2000.

Woessner JF. Matrix metalloproteinase inhibition. From the Jurassic to the third millennium. *Ann N Y Acad Sci*. 1999; (878):388-403.

Zhang X, Wang Y, Yamamoto G , Tachikawa T. Expression of matrix metalloproteinases MMP-2, MMP-9 and their tissue inhibitors TIMP-1 and TIMP-2 in the epithelium and stroma of salivary gland pleomorphic adenomas. *Histopathol*. 2009; (55): 250–60.

APÊNDICE A Escores individuais de marcação para cada estrutura do Adenoma Pleomórfico

					não		Mioep		Moep		Estroma		Total
			luminal		luminal		len.fus/pol		plasmo		mix/cond/hial		
			%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	
1	9973	MMP9	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0,4
		TIMP1	2	2	0	0	0	0	-	-	2	1	1,75
2	9803	MMP9	3	3	3	3	-	-	-	-	0	0	4
		TIMP1	3	3	3	3	-	-	3	3	3	3	6
3	8454	MMP9	1	1	1	1	-	-	1	1	0	0	1,5
		TIMP1	1	1	1	1	-	-	1	1	1	1	2
4	8437	MMP9	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0
		TIMP1	2	1	0	0	-	-	2	1	2	1	2,25
5	5244	MMP9	0	0	0	0	-	-	0	0	0	0	0
		TIMP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	10167	MMP9	1	1	1	1	-	-	0	0	0	0	1
		TIMP1	3	2	1	1	-	-	1	1	3	2	3,5
7	10137	MMP9	1	1	1	2	0	0	2	2	1	2	2,4
		TIMP1	3	3	3	3	-	-	2	1	1	1	4,25
8	10818	MMP9	2	3	2	3	-	-	2	2	0	0	3,5
		TIMP1	2	1	1	1	-	-	1	1	1	1	2,25
9	8084	MMP9	2	1	3	3	3	3	2	3	1	1	4,4
		TIMP1	2	2	1	1	1	1	2	2	2	1	3
10	10679	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		TIMP1	3	1	0	0	1	1	1	1	1	1	2
11	7846	MMP9	1	2	-	-	-	-	0	0	0	0	1
		TIMP1	0	0	-	-	-	-	0	0	1	1	0,66
12	5738	MMP9	1	2	1	2	-	-	1	1	0	0	2
		TIMP1											-
13	8077	MMP9	1	1	0	0	-	-	1	1	1	1	1,5
		TIMP1											
14	8166	MMP9	1	1	1	1	-	-	2	2	1	1	2,5
		TIMP1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	2,2
15	9336	MMP9	0	0	1	3	-	-	3	3	2	3	3,75
		TIMP1	3	2	0	0	-	-	1	1	0	0	1,75
16	7472	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		TIMP1									-		-
17	7613	MMP9	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
		TIMP1	0	0	0	0	-	-	-	-	1	1	0,66
18	7361	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		TIMP1	0	0	0	0	0	0	0	0	2	1	0,6
19	11152	MMP9	3	3	1	1	-	-	-	-	3	1	4
		TIMP1	2	2	1	1	2	2	1	1	1	1	2,8
20	4105	MMP9	2	3	1	2	1	1	1	1	0	0	2,4
		TIMP1	2	3	2	3	2	3	2	3	1	2	4,6

Sinal (-) indica que a estrutura não foi visualizada

Sinal (...) indica que a reação não estava disponível para análise.

Células mioepiteliais em lençol (fusiformes, poligonais)*

Mioepiteliais plasmocitóides**

Estroma mixóide,condróide, hialino***

APÊNDICE B Escores individuais de marcação para cada estrutura do mioepitelioma

		Cél. Pol	.fus. Mio	Estroma		Total
		%	INT	%	INT	
5688	MMP9	2	3	0	0	2,5
	TIMP1	0	0	0		0
8939	MMP9	0	0	0	0	0
	TIMP1	1	1	1	1	2
8266	MMP9	1	2	1	1	2,5
	TIMP1					
11573	MMP9	3	3	1	2	4,5
	TIMP1	1	1	1	1	2
1089	MMP9	3	3	0	0	3
	TIMP1	2	1	0	0	1,5

Sinal (...) indica que a reação não estava disponível para análise.

Células poligonais, fusiformes, mioepiteliais plamocitóides*

APÊNDICE C Escores individuais de marcação para cada estrutura do carcinoma mucoepidermóide

				lençóis				células revestir espaço císticos						Total
		células muco		células inter		células epid		células muco		células inter		células epid		
		%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	
7617	MMP9	-	-	-	-	0	0	3	2	1	1	-	-	2,3
	TIMP1	1	1	-	-	1	1	2	2	1	1	1	1	2,4
5334	MMP9	0	0	-	-	-	-	0	0	0	0	0	0	0
	TIMP1	0	0	-	-	0	0	1	1	-	-	0	0	0,5
3635	MMP9	-	-	-	-	2	2	2	2	2	2	2	2	4
	TIMP1	-	-	-	-	2	1	2	1	-	-	2	1	3
3176	MMP9	-	-	-	-	1	1	2	1	0	0	2	1	2
	TIMP1	-	-	-	-	1	1	0	0	-	-	1	1	1,33
2807	MMP9	1	1	-	-	1	1	2	2	-	-	2	2	3
1586	TIMP1													-
534	MMP9	-	-	-	-	-	-	1	1	-	-	1	1	2
	TIMP1													
7036	MMP9	0	0	-	-	0	0	1	1	0	0	1	1	0,8
	TIMP1	1	1	-	-	1	1	2	2	-	-	2	2	3
7749	MMP9	0	0	-	-	0	0	0	0	-	-	2	2	1
	TIMP1													
1582	MMP9	2	3	1	1	2	3	3	3	2	2	3	3	4,66
	TIMP1	-	-	-	-	3	2	2	1	1	1	2	1	3,25
7970	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
	TIMP1	3	2	-	-	3	3	-	-	-	-	1	1	4,33
7622	MMP9	0	0	-	-	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TIMP1	1	1	-	-	1	1	2	1	0	0	1	1	1,8
6067	MMP9	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	1	2	1,16
	TIMP1													
9128	MMP9	1	1	0	0	2	1	1	1	0	0	0	0	1,16
	TIMP1	1	2	0	0	1	1	1	1	0	0	0	0	1,16
10087	MMP9													
	TIMP1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4046I	MMP9													
4046II	TIMP1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	1,33
3608	MMP9													
	TIMP1	1	1	0	0	1	1	1	2	0	0	2	2	1,83
7973	MMP9	0	0	-	-	1	1	1	1	0	0	2	1	1,4
	TIMP1	0	0	-	-	1	1	1	1	0	0	2	1	1,4

Sinal (-) indica que a estrutura não foi visualizada

Sinal (...) indica que a reação não estava disponível para análise

Células mucosas*, Células intermediárias**, Células epidermóides***

Células de revestimento dos espaços císticos****

APÊNDICE D Escores individuais de marcação para cada estrutura do Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade

		Tubular				Cribriforme				Sólido		total
		Cél. Luminal		Cél. Não luminal		Cél. Luminal		Cél. Não luminal				
		%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	
6397	MMP9	1	1	1	1	1	1	-	-	2	2	2,5
	TIMP1	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0
6210	MMP9	1	1	0	0	1	1	-	-	1	1	1,5
	TIMP1											-
7281	MMP9	0	0	0	0	-	-	-	-	0	0	0
	TIMP1	0	0	0	0	0	0	-	-	0	0	0
7237	MMP9	0	0	0	0	-	-	-	-	1	1	0,66
	TIMP1											
8056	MMP9	3	1	2	1	1	1	-	-	3	1	3,25
	TIMP1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1,6
9628	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0,4
	TIMP1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
3782	MMP9											-
	TIMP1	2	1	2	1	1	1	-	-	2	2	3
67	MMP9	2	1	2	1	-	-	-	-	3	2	3,66
	TIMP1	3	3	3	3	-	-	-	-	3	3	6
11466	MMP9											-
	TIMP1	2	1	2	1	-	-	-	-	2	1	3
11276	MMP9											-
11246	TIMP1	3	2	2	2	2	2	1	1	2	2	3,8

Sinal (-) indica que a estrutura não foi visualizada

Sinal (...) indica que a reação não estava disponível para análise

APÊNDICE E Escores individuais de marcação para cada estrutura do carcinoma adenoide cístico

		Tubular				Cribriforme				Sólido		TOTAL
		Cél. Luminal		Cél. Não luminal		Cél. Luminal		Cél. Não luminal				
		%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	%	INT	total %
10704	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TIMP	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1,2
4320	MMP9											-
	TIMP	2	1	0	0	2	2	1	1	1	1	2,2
7235	MMP9											-
	TIMP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
6689	MMP9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	TIMP	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1,6
3537	MMP9	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
	TIMP	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2,2
5627	MMP9											-
	TIMP	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2
9260	MMP9	1	1	1	1	-	-	-	-	0	0	1,33
	TIMP	1	1	1	1	-	-	-	-	1	1	2
9787	MMP9											-
	TIMP	0	0	0	0	-	-	-	-	1	1	0,66

Sinal (-) indica que a estrutura não foi visualizada

Sinal (...) indica que a reação não estava disponível para análise

Tubular**

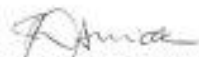
ANEXO Parecer do comitê de ética em pesquisa

  UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Elzeir
CEP: 13201-970 – F: (12) 5945-8034
Fax: (12) 5945-9010 / janete@fodqa.unesp.br

CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº 058/2011-PH/CEP, referente ao Projeto intitulado “Análises Imunoistoquímica das metaloproteinases (MMP -2; -3; -7; -8; -9; e -13) e das TIMPs (-1; -2) em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares”, sob a responsabilidade de LUIZ EDUARDO BLUMER ROSA, tendo como orientada MICHELINE BICA GUTTERES, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme, Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 05 de setembro de 2011.


Profa. Adjunta JANETE DIAS ALMEIDA
Coordenadora