



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



Wilfredo Alejandro González Arriagada

Cirurgião-Dentista

ESTUDO DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PROTEÍNAS DA FAMÍLIA PLUNC EM CARCINOMAS MUCOEPIDERMÓIDES DE GLÂNDULAS SALIVARES

STUDY OF THE IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF PLUNC FAMILY
PROTEINS IN MUCOEPIDERMOID CARCINOMAS OF THE SALIVARY GLANDS

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual
de Campinas, para obtenção do Título de Mestre em
Estomatopatologia na área de Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes
Co-orientador: Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva

PIRACICABA
2011

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**
Bibliotecária: Elis Regina Alves dos Santos – CRB-8ª / 8099

G589e	González-Arriagada, Wilfredo Alejandro. Estudo da expressão imunoistoquímica de proteínas da família Plunc em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares / Wilfredo Alejandro González Arriagada. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2011. Orientadores: Márcio Ajudarte Lopes, Alan Roger dos Santos Silva. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba. 1. Neoplasias. 2. Tumores. 3. Boca. 4. Diagnóstico. 5. Anticorpos. I. Lopes, Márcio Ajudarte. II. Silva, Alan Roger dos Santos. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título. (eras/fop)
-------	--

Título em Inglês: Study of the immunohistochemical expression of Plunc family proteins in mucoepidermoid carcinomas of the salivary glands

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Neoplasms. 2. Tumors. 3. Mouth. 4. Diagnosis. 5. Antibodies

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Márcio Ajudarte Lopes, Albina Messias de Almeida Milani Altemani, Pablo Agustin Vargas

Data da Defesa: 23-02-2011

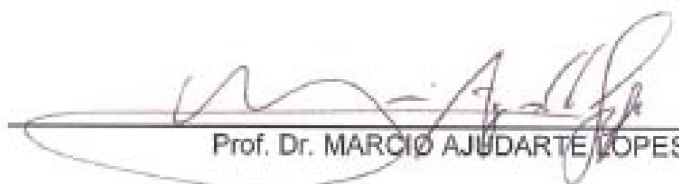
Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 23 de Fevereiro de 2011, considerou o candidato WILFREDO ALEJANDRO GONZALEZ ARRIAGADA aprovado.



Prof. Dr. MARCIO AJUDARTE LOPES



Profa. Dra. ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI



Prof. Dr. PABLO AGUSTIN VARGAS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, **Wilfredo** e **Julia** que sempre tem confiado em mim e que me entregam esse amor maravilhoso que não tem fronteiras.

Meu pai, meu porto e minha mãe, meu refúgio.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A **Deus**, por me manter em pé e me acompanhar frente às bifurcações da vida.

Aos meus irmãos **César** e **Fernando**, por me fazer acreditar que sou capaz de ir até onde meus sonhos me levem.

À minha namorada **Marisol**, que com amor, paciência e alegria me ajudou a crescer e caminhar.

À minha família:

Minha avó **Elsa** que me acompanhou nos primeiros anos de estudante e profissional.

Meus tios **Lincho** e **Angélica** e minhas primas **Paulina** e **Monse**, pelo amor e compreensão.

Minhas tias **Elsa** e **Eli**, pelas palavras dadas.

Aos meus outros tios e primos, pelo carinho.

Ao **Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes** pela dedicação e amizade durante esses dois anos, pela confiança depositada em mim e por sempre estar disposto a dar um conselho quando precisei. Muito obrigado.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida** pelos conhecimentos compartilhados e amizade. Um grande exemplo para minha vida profissional.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** pela confiança e pela ousadia de me permitir ser parte deste curso.

Ao **Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas** pela confiança e conselhos.

À **Dra Lynne Bingle**, do Departamento de Patologia Oral da Universidade de Sheffield pela colaboração para a concretização deste trabalho.

Ao **Prof. Dr. Alan Roger Santos Silva** pela amizade e orientação que fizeram possível a realização deste trabalho.

<i>Educar es lo mismo</i>	<i>Pero para eso,</i>
<i>que poner un motor a una barca,</i>	<i>uno tiene que llevar en el alma</i>
<i>hay que medir, pensar, equilibrar,</i>	<i>un poco de marino,</i>
<i>y poner todo en marcha.</i>	<i>un poco de pirata,</i>
	<i>un poco de poeta,</i>
	<i>y un kilo y medio de paciencia</i>
	<i>concentrada.</i>

(Gabriel Celaya, espanhol)

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu Diretor **Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior**.

À coordenadora geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas **Profa. Dra. Renata C. Matheus R. Garcia**.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** coordenador do programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas.

Aos **Profs. Drs. Oslei Paes de Almeida, Márcio Ajudarte Lopes, Ricardo Della Coletta, Pablo Agustin Vargas, Edgard Graner, e Jacks Jorge Júnior**, professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, pela contínua dedicação e entrega de conhecimentos.

À **CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior)** pela concessão de bolsa de estudos.

À **Universidad de Valparaíso** na pessoa de seu Reitor **Prof. Aldo Valle Acevedo**.

À **Faculdade de Odontologia da Universidad de Valparaíso** na pessoa de seu Decano **Prof Dr. Gastón Zamora Alvarez** e à **Escola de Odontologia da Universidad de Valparaíso** na pessoa de sua diretora **Profa. Dra. Rosa Moya Calderón** pela ajuda e confiança durante esses dois anos.

A meu grande amigo **Marco Aurélio Carvalho de Andrade** pelo companheirismo, amizade e palavras que me ajudaram a crescer como profissional e como pessoa.

A meus colegas da Universidade de Valparaíso **Rodrigo Fuentes, Ricardo Moreno, Karina Cordero, Marjorie Borgeat, Giordana David e Joaquín Jaramillo** pelo apoio e boas energias nesses anos.

Aos meus amigos do Chile **Vivian, Viviana, Pedro, Ingrid e Moisés** pela força e carinho.

A **Daniel Berretta Alves** pelos conhecimentos, alegria e amizade.

A **Katya Pulido Diaz** pela paciência.

A **Bruno Augusto Benevenuto de Andrade** pelo humor e bondade.

A **Víctor Hugo Toral Rizo** pela ajuda nos primeiros momentos.

A **Adriele Ferreira Gouvêa** pelos momentos no Orocentro.

Aos meus amigos de pós-graduação: **José Sabino Bezerra Jr., Lara Ramos Innocentini, Felipe Paiva Fonseca, Renato Hopp, Andréia Bufalino, Marco Antônio Carvalho, Carolina Bitu, Fernanda Mariano, Ana Carolina Prado Ribeiro, Débora Bastos, Manoela Cavalcante Pereira, Mario Románach Sobrinho, Rogério Gondak, Rose Ortega, Tânia Benetti Soares, Sibele Nascimento de Aquino, Ana Lucia Francisco e Patricia Feio** pelo ensino deportunhol, alegria e companhia.

Aos funcionários do Orocentro e laboratório de Patologia, **Dr. Rogério de Andrade Elías, Maria Aparecida Campion, Geovânia Almeida e Fabiana Casarotti**.

EPÍGRAFE

“Haz lo mejor que puedas y llega hasta el final. Si el resultado es positivo lo que sea dicho en contra de ti no valdrá nada. Si el resultado es negativo, inclusive diez ángeles jurando que tenía razón no harán ninguna diferencia”.

(Abraham Lincoln)

“Nunca andes pelo caminho traçado, pois ele conduz somente aonde outros já foram”

(Alexander Graham Bell)

RESUMO

Tumores de glândulas salivares são raros e geralmente apresentam características histopatológicas complexas que podem dificultar seu diagnóstico. O carcinoma mucoepidermóide (CME) é a neoplasia maligna mais frequente das glândulas salivares e é classificado histologicamente como de baixo grau, grau intermediário ou de alto grau. O uso de técnicas histoquímicas como o PAS (*Periodic Acid-Schiff*) ou o mucicarmin é de grande utilidade para identificar mucina nos tumores e permitir o diagnóstico do CME. Recentemente, descreveu-se que alguns tumores de glândulas salivares como o cistoadenocarcinoma papilar e o CME expressam proteínas da família PLUNC. O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC em 30 casos de CMEs de glândulas salivares maiores e menores e testar a hipótese de que estas proteínas poderiam ser úteis no diagnóstico do CME. Os tumores foram revisados e classificados de acordo com o grau de malignidade e estudados por meio de reações histoquímicas (sendo todos os casos positivos para PAS e mucicarmin) e imunoistoquímicas para as proteínas SPLUNC1, LPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC2. A média de idade dos pacientes diagnosticados com CME foi de 44,07 anos. A maioria dos tumores (19) foi classificada como de baixo grau, 4 tumores foram classificados como grau intermediário e 7 como alto grau. A marcação imunoistoquímica foi classificada de acordo com a quantidade e intensidade de células marcadas no tumor. A maioria dos CMEs estudados foi positiva para SPLUNC1 (90%) e LPLUNC1 (93,33%), sendo identificada principalmente em células mucosas, *plugs* de mucina e células intermediárias. SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC2 foram negativos na maioria dos tumores. LPLUNC2 apresentou positividade em células semelhantes a mastócitos em 83,33% dos tumores, expressão parece não ter sido relatada previamente na literatura. A expressão de SPLUNC1 e LPLUNC1 apresentou um padrão de marcação semelhante ao identificado com PAS e mucicarmin. A

positividade para SPLUNC1 e LPLUNC1 nas células intermediárias, sugere que estas duas proteínas poderiam ser úteis no diagnóstico de casos de CME de alto grau de malignidade.

Palavras Chave: PLUNC, carcinoma mucoepidermóide, glândula salivar, imunoistoquímica, diagnóstico.

ABSTRACT

Salivary gland tumours are uncommon and generally present complex histopathologic features that can difficult the diagnosis. Mucoepidermoid carcinomas (MECs) are the most frequent malignant neoplasia of the salivary glands and are histologically classified as low, intermediate and high-grade. Histochemical stains such as PAS (Periodic Acid-Schiff) or mucicarmine are very useful to indentify mucine in tumors and to make the diagnosis of MEC. Recently, the expression of PLUNC family proteins has been described in salivary glands tumors, such as papillary cystadenocarcinoma and MEC, suggesting that these proteins can be useful for the diagnosis in some difficult cases. The aim of this study was to evaluate the expression of PLUNC family proteins in 30 cases of MEC of the salivary glands and test the hypothesis that these proteins could be useful in the diagnosis of MEC. The tumors were reviewed and classified according to the grade of malignancy. Histochemical stains (PAS and mucicarmine) and immunohistochemical reactions for SPLUNC1, LPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B and LPLUNC2 were performed. Patient's mean age was 44.07 years old. The majority of tumors (19) was histologically classified as low grade, 4 tumors were intermediate grade and 7 were high grade. All cases were positive for PAS and mucicarmine. Immunohistochemical stain was classified according to the quantity and intensity of stained cells in the tumor. Most of the MECs were positive for SPLUNC1 (90%) and LPLUNC1 (93.33%), particularly in mucous cells, mucin *plugs* and intermediary cells. SPLUNC2A, SPLUNC2B and LPLUNC2 did not present significant expression in the tumors. LPLUNC2 presented positivity for cells that remember mast cells in 83.33% of the tumors, expression that seems not to be previously reported in the literature. The expression pattern of SPLUNC1 and LPLUNC1 was similar to PAS and mucicarmine. The expression in intermediary cells for SPLUNC1 and LPLUNC1, suggest that these proteins could be useful in the diagnosis of high grade MECs.

Key words: SPLUNC1, SPLUNC2, LPLUNC1, LPLUNC2, mucoepidermoid carcinoma, salivary gland, immunohistochemistry, diagnosis.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	2
2.1 Carcinoma Mucoepidermóide	2
2.1.1 Definição e Epidemiologia	2
2.1.2 Características Clínicas	2
2.1.3 Características Histopatológicas	3
2.1.4 Histoquímica e Imunoistoquímica	9
2.1.5 Tratamento e Prognóstico	10
2.2 PLUNC	12
2.2.1 Definição e Descrição da família PLUNC	12
2.2.2 Funções das proteínas da família PLUNC	13
2.2.3 Estudos da expressão das proteínas da família PLUNC ...	16
2.2.4 Expressão das proteínas da família PLUNC em tumores .	20
3 OBJETIVOS	22
3.1 Objetivo geral	22
3.2 Objetivos específicos	22
4 MATERIAIS E MÉTODOS	23
4.1 Características da Amostra	23
4.2 Protocolo das técnicas de PAS e mucicarmin	23
4.3 Protocolo das técnicas de imunoistoquímica	24
4.4 Avaliação da marcação imunoistoquímica	26
4.5 Forma de análise dos resultados	27

5 RESULTADOS	28
5.1 Achados demográficos e clínico-patológicos	28
5.2 Coloração histoquímica de PAS e mucicarmin	32
5.3 Expressão imunoistoquímica das proteínas PLUNC	34
5.3.1 Análise de intensidade e quantidade de marcação no tumor (Escala Imunoreativa Semiquantitativa)	34
5.3.2 Expressão imunoistoquímica de SPLUNC1 no tumor ...	44
5.3.3 Expressão imunoistoquímica de LPLUNC1 no tumor ...	45
5.3.4 Expressão imunoistoquímica de LPLUNC2 no tumor ...	46
5.3.5 Expressão imunoistoquímica de PLUNC em CME de baixo grau	48
5.3.6 Expressão imunoistoquímica de PLUNC em CME de grau intermédio	50
5.3.7 Expressão imunoistoquímica de PLUNC em CME de alto grau	52
5.3.8 Expressão imunoistoquímica de PLUNC em tecido de glândula salivar normal	54
6 DISCUSSÃO	59
7 CONCLUSÕES	68
REFERÊNCIAS	69
ANEXO	82

1 INTRODUÇÃO

Os tumores de glândulas salivares são neoplasias pouco frequentes, que geralmente apresentam características histopatológicas complexas, e que podem representar dificuldades diagnósticas (Speight & Barrett, 2002). O CME é um tumor maligno de glândula salivar caracterizado pela presença de células mucosas, células intermediárias e células epidermóides, além da presença de espaços císticos e produção de mucina. Esse tumor é classificado microscopicamente de acordo com seu grau de malignidade em baixo, intermediário e de alto grau, sendo que geralmente o CME de alto grau representa a maior dificuldade diagnóstica. A literatura recente apresenta vários estudos que procuram marcadores imunoistoquímicos que auxiliem no diagnóstico desses tumores, especialmente para os casos de alto grau de malignidade (Vargas *et al.*, 2008; Miyabe *et al.*, 2009; Schapher *et al.*, 2009; Shigeishi *et al.*, 2009; Demasi *et al.*, 2010, Dincer *et al.*, 2010).

PLUNC (*palate lung nasal clone*) é uma proteína descrita no epitélio nasal, traquéia e brônquios de embriões de ratos (Weston *et al.*, 1999) e que posteriormente foi isolada em humanos, sendo localizada no cromossomo 20q11.2 (Bingle & Bingle, 2000). A expressão de PLUNC humano já foi descrita nas vias aéreas superiores, orofaringe, nasofaringe e cavidade oral (Bingle & Craven, 2002; Ghafouri *et al.*, 2003). Recentemente, alguns estudos demonstraram a expressão dessa proteína na saliva, em glândulas salivares e em tumores de glândulas salivares (Ghafouri *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004; Vitorino *et al.*, 2004). O cistoadenocarcinoma papilar e CME foram os tumores de glândula salivar onde a expressão de PLUNC foi detectada (Vargas *et al.*, 2008).

Esta dissertação teve como objetivo analisar a expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC em CMEs de glândulas salivares. A hipótese testada foi a de que as proteínas da família PLUNC poderiam contribuir para o diagnóstico microscópico de CMEs.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Mucoepidermóide

2.1.1 Definição e Epidemiologia

O CME é um tumor de comportamento clínico e características histopatológicas variáveis, caracterizado pela presença de células mucosas, intermediárias e epidermóides, cavidades císticas e produção de mucina (Luna, 2006). Os tumores das glândulas salivares são pouco frequentes e correspondem de 1 a 3 % das neoplasias de cabeça e pescoço (Eveson e Cawson, 1985; Vargas *et al.*, 2002; Védrine *et al.*, 2006; Rapidis *et al.*, 2007). O CME é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares maiores e menores, correspondem de 10 a 15% dos tumores de glândulas salivares, e de 30 a 35% das neoplasias malignas de glândulas salivares (Brandwein *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2002; Speight e Barrett, 2002; Luna, 2006; Védrine *et al.*, 2006).

2.1.2 Características Clínicas

O CME pode afetar uma ampla faixa etária, sendo mais comum entre a terceira e a sexta década de vida, com uma discreta predileção pelo gênero feminino (Brandwein *et al.*, 2001). Aproximadamente 60% dos pacientes afetados têm idade acima dos 40 anos, com média de 45 anos no momento do diagnóstico (Barnes *et al.*, 2005). Embora seja raramente observado na primeira década da vida, é o tumor de glândula salivar mais comum em crianças (Hicks e Flaitz, 2000; Triantafillidou *et al.*, 2003; Védrine *et al.*, 2006).

Aproximadamente 50% dos CMEs afetam as glândulas salivares maiores, principalmente a glândula parótida (45%), sítio mais comum de envolvimento na região de cabeça e pescoço (Barnes *et al.*, 2005; Luna, 2006). A apresentação

clínica pode estar associada ao grau de malignidade do tumor. Usualmente, aparece como um aumento de volume, geralmente com menos de 18 meses de duração (Luna, 2006). Os CMEs podem estar associados a dor ou alterações da sensibilidade, as quais estão associadas principalmente aos tumores de alto grau de malignidade. Quando afeta glândulas salivares menores, ocorre com maior frequência na região posterior do palato duro e no palato mole. No entanto, pode ocorrer em praticamente todos os locais da boca como área retromolar, assoalho bucal, mucosa jugal, lábios e língua (Brandwein *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2002). O CME normalmente é detectado como um nódulo indolor, firme e fixo, às vezes flutuante (baixo grau) e de cor azulada, que pode simular neoplasias benignas (Luna, 2006). Em alguns casos pode erodir o osso subjacente, especialmente quando está localizado no palato duro. Também tem sido descrito o desenvolvimento intra-ósseo de CME em maxila e mandíbula, correspondendo de 2 a 4% dos CMEs de cabeça e pescoço (Raut & Khedkar, 2009).

2.1.3 Características Histopatológicas

Morfologicamente, o CME é um tumor composto por três tipos celulares principais (células mucosas, intermediárias e epidermóides) e formação de cistos contendo mucina. É comum uma associação com um infiltrado linfóide proeminente (Luna, 2006). O comportamento clínico geralmente está correlacionado com o grau histológico de malignidade (Eversole, 1970; Auclair *et al.*, 1992; Brandwein *et al.*, 2001; Guzzo *et al.*, 2002; Kokemueller *et al.*, 2005; Triantafillidou *et al.*, 2006; Rapidis *et al.*, 2007). No entanto, tem sido relatado que a proporção dos tipos celulares é insuficiente para fazer uma correlação com o prognóstico (Auclair *et al.*, 1992; Barnes *et al.*, 2005). Diversos sistemas e critérios de classificação foram descritos na literatura, mas ainda não existe um sistema uniformemente aceito. As gradações em três níveis são mais amplamente aceitas e são baseadas na proporção relativa dos tipos celulares principais, grau de invasão, padrão de invasão, quantidade de mitoses, proporção relativa de espaços

císticos em relação com o grau de formação sólida, e invasão neural e vascular (Luna, 2006).

Stewart *et al.* (1945) classificou o CME como benigno ou maligno, baseado na aparência histológica e curso clínico. Foote e Frazell (1953) usaram as designações de baixo grau de malignidade ou alto grau de malignidade, sugerindo que os subgrupos de baixo grau, grau intermediário ou alto grau de malignidade podem ser usados. Jakobsson *et al.* (1968) baseado no crescimento invasivo e Evans (1984) baseado no grau de crescimento sólido (maior ou menor a 90% da arquitetura sólida) propuseram sistemas de dois níveis, denominados como baixo grau ou alto grau de malignidade. Batsakis e Luna (1990) definiram um modelo de sistema de gradação de três níveis, baseado em um sistema previamente proposto por Healey *et al.* (1970) que leva em consideração os padrões de citodiferenciação e crescimento, enfatizando que a população de células intermédias é um componente histológico e histogenético integral, reconhecendo tipos de carcinoma pobremente diferenciados, classificando os CMEs em grau 1 (baixo grau), grau 2 (grau intermediário) e grau 3 (alto grau).

Auclair *et al.* (1992) e Goode *et al.* (1998), ambos da AFIP (*Armed Forces Institute of Pathology*), demonstraram a ampla variabilidade na gradação histológica dos CMEs entre observadores, estabelecendo critérios histológicos mais uniformes e reproduzíveis, correlacionados com o prognóstico. Segundo estes autores, as características histopatológicas que indicam um comportamento biológico mais agressivo são um componente cístico menor do que 20% da área tumoral, 4 ou mais figuras mitóticas em 10 campos de alto poder, invasão neural, necrose tumoral e a presença de anaplasia (pleomorfismo nuclear e celular, relação núcleo:citoplasma aumentada, nucléolo proeminente ou múltiplo, e hiperchromasia). Estes mesmos autores relataram a dificuldade de aplicar esse sistema nos tumores da glândula submandibular, onde o grau histológico parece não estar relacionado ao comportamento clínico e ao estágio do tumor. Este sistema descrito acima parece ser o mais aceito na atualidade e foi publicado na classificação mais recente dos tumores de cabeça e pescoço, proposta pela OMS

(Organização Mundial da Saúde) (Barnes *et al.*, 2005). Os critérios da gradação histológica do CME descrita na OMS são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Características morfológicas e gradação histopatológica do carcinoma mucoepidermóide (Barnes *et al.*, 2005).

Características Histopatológicas	Pontos
Componente cístico <20%	2
Invasão neural	2
Presença de necrose	3
4 ou mais mitoses / 10 hpf	3
Presença de anaplasia	4
Grau do tumor	Pontos
Baixo	0-4
Intermediário	5-6
Alto	7 ou mais

hpf= do inglês *high power field* (campo de maior aumento).

A aparência microscópica depende do grau histológico do tumor (Luna, 2006). Os tumores de baixo grau apresentam um componente secretor de mucina proeminente, composto por células colunares revestindo espaços císticos, mínima atipia, ninhos celulares bem circunscritos por células escamosas e podem conter numerosas células de citoplasma claro. As áreas sólidas constituem menos de 10% do tumor e microcistos podem se unir formando grandes cistos. Frequentemente tumores de baixo grau apresentam um estroma fibroso proeminente e quando a mucina das áreas císticas rompe e extravasa, pode acontecer uma intensa reação inflamatória no estroma do tumor. Geralmente, não é observada invasão perineural nem linfovascular nos CMEs (Batsakis & Luna, 1990; Brandwein *et al.*, 2001; Luna 2006).

Os CMEs de grau intermediário apresentam características entre os tumores de baixo e alto grau; são menos císticos e apresentam menor quantidade de mucina que os tumores de baixo grau. O componente cístico é menor e menos frequente. Mostram uma maior tendência a formar grupos, ninhos ou ilhas de células, onde a população de células intermediárias e epidermóides predominam em relação às células mucosas. Pode ser identificada invasão de vasos, de tecido neural ou de tecido muscular pelas células malignas.

O CME de alto grau é predominantemente sólido com proliferações de células epidermóides e intermediárias, mostrando altos graus de atipia e mitoses, podendo apresentar áreas de necrose. Áreas de invasão perineural e linfovascular são comuns. Nestes casos as semelhanças com o carcinoma espinocelular podem ser importantes. Os CMEs de alto grau apresentam uma escassa ou nenhuma produção de mucina, fato que requer uma inspeção cuidadosa da lâmina e a utilização de colorações especiais como auxiliares diagnósticos (Batsakis & Luna, 1990; Brandwein *et al.*, 2001; Luna 2006).

Diversas variantes morfológicas do CME foram descritas na literatura, tanto nos tumores de baixo, intermediário ou de alto grau de malignidade. A aparência histopatológica do tumor resulta da inter-relação entre as variações existentes nos tipos celulares, distribuição e padrão de crescimento dessas células. A combinação dessas características histológicas resulta em diferentes aparências microscópicas, como as variantes histológicas de células claras, de células oncocíticas, esclerosante, entre outras menos comuns (Jahan-Parwar *et al.*, 1999; Brannon e Willard, 2003; Ide *et al.*, 2005; Luna, 2006; Corcione *et al.*, 2007; Veras *et al.*, 2007; Weinreb *et al.*, 2009; Kwon *et al.*, 2010). Calcificações podem ser encontradas em qualquer grau ou variante histológica de CME, e aparentemente não apresentam associação com o comportamento clínico dos tumores (Gonzalez-Arriagada *et al.*, 2010).

A literatura pertinente considera que o CME possui 6 tipos celulares fundamentais e sugere um modelo para a sua histogênese (Figura 1). Os tipos celulares descritos são (Luna, 2006):

- a. células “progenitoras”: células redondas, com um tamanho similar aos linfócitos, núcleo pequeno e redondo e citoplasma escasso e basofílico. São negativas para PAS e mucicarmin e encontradas em ductos grandes e medianos. Seriam as progenitoras dos outros tipos celulares do CME.
- b. células intermediárias: células ovóides, levemente maiores que as células “progenitoras”, até 3 vezes maiores que um linfócito, de núcleo pequeno e fortemente corado pela hematoxilina. Citoplasma escasso, eosinofílico e pálido. São negativas para coloração de PAS e mucicarmin.
- c. células epidermóides: também negativas para PAS e mucicarmin, podem formar áreas sólidas e ninhos que lembram um carcinoma espinocelular. As células mais maduras mostram um citoplasma homogêneo e hialino com queratinização de algumas células, em raras ocasiões, formando pérolas de queratina. A presença de pontes intercelulares aumenta a sua semelhança com células epiteliais escamosas.
- d. células claras: de forma e tamanho variável, de contornos nítidos, citoplasma claro. Núcleo usualmente central, pequeno, vesicular e picnótico. Negativas para mucicarmin, mas podem conter glicogênio, quando então podem ser positivas para PAS.
- e. células colunares: lembram células dos ductos secretores principais das glândulas salivares. Podem se transformar em células mucosas e nessa forma transicional adquirir uma suave tendência a se corar com mucicarmin.
- f. células mucosas: semelhantes às que estão nos ductos salivares normais, usualmente grandes e de limites celulares definidos. Núcleo pequeno e usualmente localizado na periferia. Citoplasma amplo, pálido e levemente basofílico, positivo para mucicarmin e PAS. Apresentam-se em pequenos grupos e estão distribuídos regularmente entre outros tipos celulares.

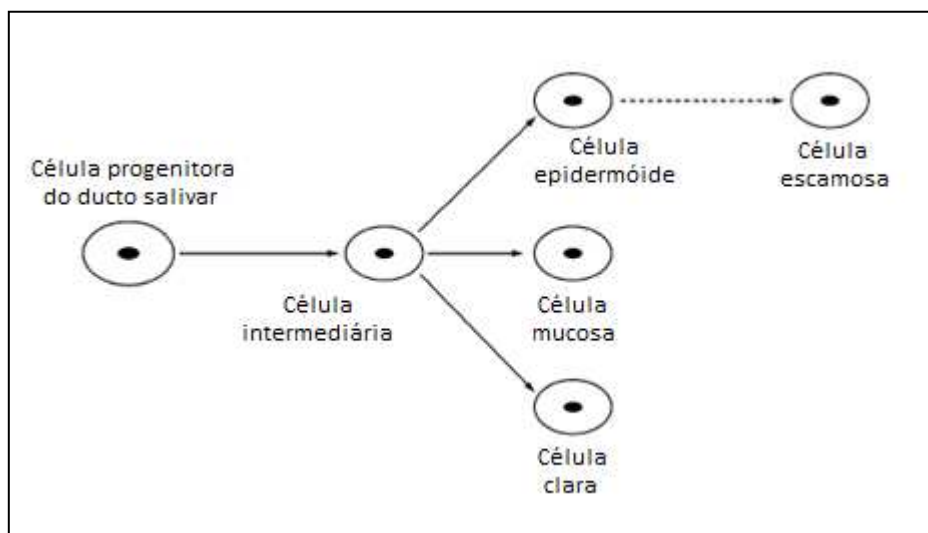


Figura 1. Histogênese sugerida para os tipos celulares do CME. A célula intermediária é a progenitora dos outros tipos celulares (Adaptado de Luna, 2006)

Diversas neoplasias das glândulas salivares são caracterizadas por abundantes secreções extra e intracelulares de mucina. O CME é o tumor de glândula salivar produtor de mucina primário mais comum. Outros tumores menos comuns são o carcinoma colóide, cistadenocarcinoma mucinoso, carcinoma do ducto salivar, carcinoma de células *signet ring*, adenocarcinoma (NOS) e alguns tumores metastásicos. Raramente o adenoma pleomorfo ou o mioepitelioma podem apresentar uma proeminente metaplasia mucinosa (Yakirevich *et al.*, 2010). O diagnóstico diferencial histopatológico do CME pode incluir o carcinoma espinocelular (principalmente nos casos de CME de alto grau), carcinoma adenoescamoso, cistadenoma, cistadenocarcinoma, carcinoma do ducto salivar rico em mucina e carcinoma sebáceo (Luna, 2006; Yakirevich *et al.*, 2010; Chenevert *et al.*, 2011). Os CMEs ricos em células claras devem ser diferenciados de carcinoma de células acinares, carcinoma de células claras hialinizante, oncocitomas de células claras e carcinoma renal metastático (Luna, 2006).

2.1.4 Histoquímica e Imunoistoquímica

Com o intuito de facilitar o diagnóstico de tumores que apresentam uma morfologia complexa, diversas técnicas de histoquímica e imunoistoquímica podem ser utilizadas. A produção citoplasmática de mucina e a localização das células mucosas são demonstradas por técnicas histoquímicas como PAS, mucicarmin e azul de Alcian, sendo muito úteis para o diagnóstico final de CME (Veras *et al.*, 2007; Vargas *et al.*, 2008).

Estudos de imunoistoquímica em CMEs demonstraram positividade para citoqueratina (CK), vimentina, proteína S-100, actina, alfa-fetoproteína e antígeno carcinoembrionário (CEA). A expressão imunoistoquímica para CK não está associada com o grau histológico ou nem com a diferenciação do tumor (Luna, 2006; Azevedo *et al.*, 2008). Os CMEs usualmente expressam em diferentes proporções MUC1 (MUC do inglês *mucin*), MUC4, MUC5AC e MUC5B, menos frequentemente MUC6, e raramente expressam MUC2 e MUC7. Uma alta expressão de MUC1 está associada com alto grau, alta recorrência e taxas de metástases, e intervalos curtos livres de doença. Inversamente, uma alta expressão de MUC4 tem sido associada a tumores de baixo grau, baixa taxa de recorrência e maiores períodos livres de doença (Luna, 2006).

Alguns autores relataram uma associação entre o grau histológico e o prognóstico do CME de glândulas salivares com a expressão de PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) e Ki-67 (Hicks e Flaitz, 2000; Triantafillidou *et al.*, 2006). Miyabe *et al.* (2009) associaram a expressão de p27kip1 (kip do inglês *kinase inhibitory protein*) e CRTC1-MAML2 (*CREB regulated transcription coactivator 1 - mastermind-like 2*) com características clinico-patológicas favoráveis dos tumores, assim como a expressão de ki-67 com características histopatológicas consideradas como marcadoras de agressividade. Um índice maior do que 10% de marcação para a proteína ki-67 é correlacionado com um alto grau histopatológico, maiores taxas de recorrência e metástase e diminuição do tempo de sobrevida dos pacientes com CME (Barnes *et al.*, 2005). Shigeishi *et*

al. (2009) relataram que a expressão de TPX2 (*Targeting protein for Xklp2*) em tumores malignos de glândulas salivares, entre eles o CME, estaria associada com uma maior proliferação celular. Demasi *et al.* (2010) associaram a maior expressão de GLUT-1 (*Glucose transporter 1*) com CME clinicamente mais agressivos. Yang *et al.* (2010) relataram que a expressão positiva para Id-1 (*inhibitors of DNA binding/differentiation protein 1*) está associada com CMEs de alta malignidade e de prognóstico ruim, e que a expressão positiva para TSP-1 (*tromboespondin-1*) está associada a baixa malignidade e bom prognóstico em CMEs. Com a crescente aplicação da biologia celular e molecular na área da patologia bucal, alguns estudos genéticos recentes identificaram que anormalidades envolvendo a translocação do gene MAML2 (*mastermind-like gene 2*) no cromossomo 11 e do gene MECT-1 (*mucoepidermoid carcinoma translocated gene 1*) no cromossomo 19 (Luna, 2006; Camelo-Piragua *et al.*, 2009) são potencialmente importante para a patogênese destes tumores.

Mais recentemente, Vargas *et al.* (2008) relataram a positividade de algumas proteínas da família PLUNC (LPLUNC1 e SPLUNC2) nos *plugs* de mucina, nas células mucosas e nas células intermediárias de CMEs e cistoadenocarcinoma papilar em um estudo realizado com diversos tumores benignos e malignos de glândula salivar, sendo todos os outros tumores estudados pelos autores considerados negativos para PLUNC.

2.1.5 Tratamento e Prognóstico

O tratamento do CME é baseado principalmente na localização, no grau histopatológico e no estágio clínico do tumor. A cirurgia é o tratamento de primeira escolha, podendo ser associado ou não à radioterapia (Triantafillidou *et al.*, 2006; Rapidis *et al.*, 2007). Tumores de baixo grau diagnosticados precocemente na glândula parótida podem ser tratados com parotidectomia parcial e preservação do nervo facial. Tumores avançados que afetam a glândula parótida devem ser tratados com parotidectomia total e sacrifício do nervo facial (Rapidis *et al.*, 2007).

CMEs que acometam a glândula submandibular são tratados com a remoção cirúrgica total da glândula. Quando as glândulas salivares menores são afetadas por CMEs, o tumor é tratado com remoção cirúrgica com uma pequena margem de segurança em casos de tumores de baixo grau, ou, tratados de modo semelhante aos carcinomas espinocelulares nos casos de CME de alto grau. O osso envolvido em alguns casos deve ser removido. A remoção dos linfonodos (esvaziamento cervical) é indicada em casos de evidência clínica ou imaginológica de metástase. A radioterapia adjuvante (pós-operatória) pode ser indicada nos tumores em estágio avançado mais agressivos ou removidos de modo incompleto durante a cirurgia (margens cirúrgicas comprometidas por tumor) (Rapidis et al., 2007).

O prognóstico dos pacientes com CME nas glândulas salivares depende do estágio clínico do tumor, do grau histológico e de sua localização (Triantafillidou et al., 2006; Luna; 2006). Geralmente o prognóstico é bom nos tumores de baixo grau de malignidade e pior nos tumores de alto grau (Triantafillidou et al., 2006), no entanto, embora raras, metástases foram descritas em todos os graus histológicos do tumor (Goode et al., 1998; Luna, 2006; Rapidis et al., 2007; Kolokythas et al., 2010). Tumores que acometem as glândulas submandibulares geralmente apresentam um pior prognóstico (Védrine et al., 2006). O envolvimento linfonodal regional é mais comum em pacientes com tumores da glândula submandibular e tumores de alto grau recorrentes na parótida (Luna, 2006). Goode et al. (1998) relataram que 8% dos pacientes com o diagnóstico de CME nas glândulas salivares tem óbito pela doença. O óbito nos casos de CME costuma resultar de tumores inoperáveis, metástases distantes (principalmente no pulmão) ou complicações da terapia adjuvante. Nas últimas décadas, estudos de imunoistoquímica e biologia molecular têm sido realizados para avaliar melhor o prognóstico dos pacientes (Batsakis, 1994; Hicks e Flaitz, 2000; Hocwald et al., 2001; Triantafillidou et al., 2007; Vargas et al., 2008).

2.2. PLUNC

2.2.1. Definição e Descrição da família PLUNC.

PLUNC (acrônimo de *palate, lung and nasal epithelium clone*) é uma família de proteínas descoberta no epitélio nasal do embrião de rato. Também foi identificada em palato, septo nasal, traquéia, brônquios, pulmão, entre outros tecidos do rato, camundongo, porco, vaca e humanos (Weston *et al.*, 1999; LeClair *et al.*, 2001; Sung *et al.*, 2002; LeClair, 2003a). O isolamento e a caracterização do PLUNC humano foram reportados por Bingle *et al.* (2000) em traquéia, vias aéreas superiores, epitélio nasofaríngeo e glândula salivar.

As proteínas PLUNC exibem uma similaridade estrutural com a BPI (*bactericidal/permeability-increasing protein*), uma proteína que participa na resposta imune inata contra as bactérias. A família PLUNC é composta por dez proteínas divididas em dois grupos de acordo com o tamanho e estão codificadas por genes localizados no cromossomo 20q11.2 (Figura 2). Um grupo é denominado como “proteínas curtas” (*short PLUNC* ou SPLUNC), as quais contêm um domínio único relacionado ao domínio N-terminal da BPI, e inclui as proteínas SPLUNC1, SPLUNC2, SPLUNC3 e BASE (*breast cancer and salivary expressed*). O segundo grupo é denominado como “proteínas longas” (*long PLUNC* ou LPLUNC), e possui dois domínios BPI, N- e C-terminal, e compreende as proteínas LPLUNC1, LPLUNC2, LPLUNC3, LPLUNC4, LPLUNC5 e LPLUNC6 (Bingle & Craven, 2002; Egland *et al.*, 2003; Bingle & Craven, 2004; Bingle *et al.*, 2004). Recentemente, foi descrita a proteína SPLUNC5, cuja expressão parece estar restrita ao epitélio interpapilar da superfície dorsal da língua dos ratos (LeClair, 2004).

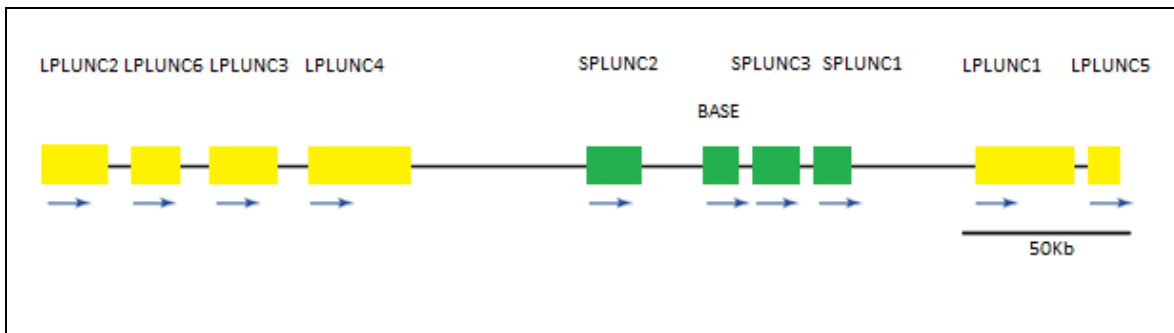


Figura 2. Organização genômica do PLUNC humano no cromossomo 20q11.2 (Adaptado de Bingle & Craven, 2004).

2.3.2. Funções das proteínas da família PLUNC

A função das proteínas da família PLUNC ainda não é bem definida, mas tem sido proposta a participação dessas proteínas na defesa inata do hospedeiro nas vias aéreas e orais, morfogênese das estruturas faciais e olfação. Atualmente existe evidência científica disponível a respeito da função desempenhada pelas proteínas PLUNC nos mecanismos de defesa imune inata do hospedeiro (Bingle & Bingle, 2000; Bingle & Craven, 2003). A família de proteínas PLUN tem sido associada com outras proteínas que apresentam semelhanças estruturais, como PSP (*parotid secretory protein*), BPI, LBP (*lipopolysaccharide-binding protein*), SMGB (*submandibular gland protein B*), PLTP (*phospholipid transfer protein*), CETP (*cholesteryl ester transfer protein*) entre outras secretadas pelo epitélio nasofaríngeo e glândulas salivares. Além da semelhança na estrutura protéica, essas proteínas têm uma expressão similar em sítios de epitélio oral, nasofaríngeo e respiratório. Alguns autores incluem todo aquele grupo de proteínas descrito como formando parte de uma superfamília (Bingle & Bingle, 2000; Bingle & Craven, 2002; Sung *et al.*, 2002; Ball *et al.*, 2003; Beamer, 2003; Andrault *et al.*, 2003; LeClair, 2003b; Bingle & Craven, 2004; Bingle & Gorr, 2004; Hou *et al.*, 2004; Larsen *et al.*, 2005).

A função defensiva do PLUNC é reforçada pela homologia estrutural com proteínas que participam na defesa do hospedeiro contra bactérias gram negativas

como a BPI, o que permite sugerir que são proteínas secretadas e que agem bloqueando a junção de LBP ao LPS e impedindo a ativação dos macrófagos pelo LPS (Figura 3), tal como a BPI, que possui um papel regulador antiinflamatório na resposta ao LPS (Levy, 2000; Levy *et al.*, 2003; Weiss, 2003; Wheeler *et al.*, 2003; Bingle *et al.*, 2004; Bingle & Gorr, 2004). LBP e BPI são proteínas antagônicas; a primeira é uma proteína pro-inflamatória, e a segunda tem uma função antiinflamatória, mantendo uma regulação da resposta inflamatória desencadeada pelo LPS bacteriano. A literatura mostra que a SPLUNC1 é uma proteína imuno-defensiva inata que pode se ligar ao LPS e, por conseguinte, neutralizar a endotoxina através de seu domínio BPI (Ghafouri *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2006b). A capacidade do PLUNC se ligar ao LPS é o que permite afetar o crescimento bacteriano (Geetha *et al.*, 2005; Zhou *et al.*, 2006b; Wu *et al.*, 2009).

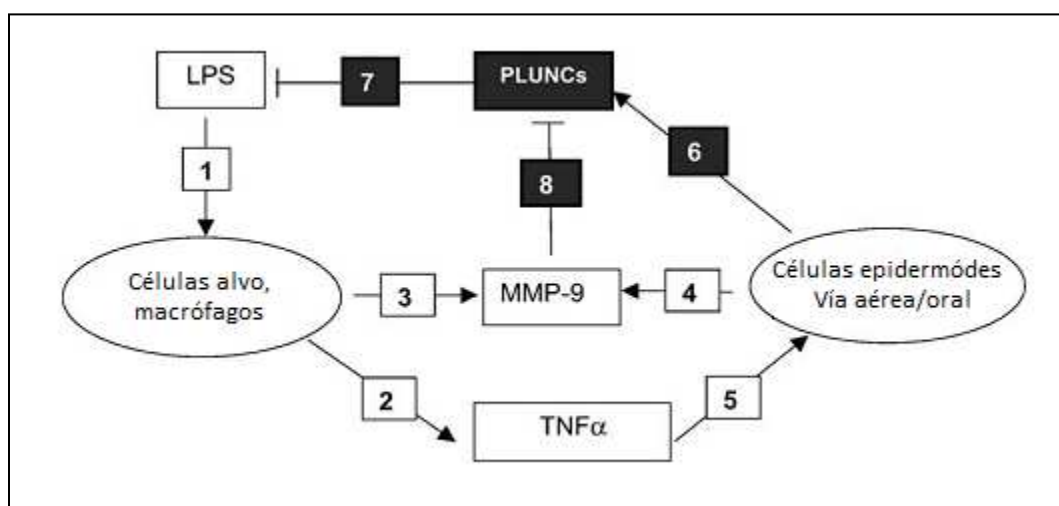


Figura 3. Inflamação da mucosa e papel das proteínas PLUNC. Esquema baseado em estudos feitos com PSP. As bactérias gram negativas na cavidade oral e nas vias aéreas superiores expressam LPS, que geram uma resposta inflamatória nas células alvo e em macrófagos (1), secretam citocinas pro-inflamatórias (2) e metaloproteinases (3). MMP-9 também é secretada pelas células epiteliais da via aérea e salivares (4), em resposta ao TNF- α (5). As proteínas PLUNC são secretadas pelas células epiteliais das vias aéreas e orais (6). As proteínas PLUNC bloqueariam então a ligação da LPB ao LPS, e a

ativação dos macrófagos pelo LPS (7). Além disso, os níveis de PLUNC seriam regulados por clivagem pela MMP-9. As caixas pretas representam conhecimento sem evidência suficiente na literatura (Adaptado de Bingle & Gorr, 2004).

A cavidade oral e as vias aéreas estão continuamente expostas a diversos organismos potencialmente patogênicos, onde a saliva e os fluidos da superfície das vias aéreas têm uma reconhecida importância na manutenção da saúde oral e respiratória (Martin, 2000; Amerogen e Veerman 2002; Bingle & Gorr, 2004). Esta capacidade protetora da saliva e dos fluídos das vias aéreas se deve, ao menos parcialmente, às suas diversas proteínas e péptidos com atividade antimicrobiana e antiinflamatória, que evitam infecções recorrentes e toleram as populações microbianas residentes (Bingle & Gorr, 2004). A participação da saliva na prevenção de infecções tem sido demonstrada em estudos que associam um aumento das infecções orais como candidose e de cáries em pacientes com um fluxo salivar diminuído, por exemplo, pacientes tratados por radioterapia na região de cabeça e pescoço, ou pacientes diagnosticados com síndrome de Sjögren (Jonsson *et al.*, 2002; Dirix *et al.*, 2006). A família PLUNC é composta por proteínas cuja expressão já foi demonstrada na saliva, o que sugere uma eventual participação das proteínas PLUNC na resposta imune inata da cavidade oral (Bingle & Gorr, 2004).

Os genes ortólogos são genes que cumprem funções similares em diferentes espécies. O genoma do rato possui genes ortólogos dos seis tipos de LPLUNCs e da maioria dos SPLUNCs humanos (Bingle & Craven, 2003). O gene ortólogo mais estudado dessas proteínas é o SPLUNC2, que é o ortólogo da PSP, proteína abundante na saliva e tecido de glândulas salivares dos ratos e camundongos (Gupta *et al.*, 2000; Wheeler *et al.*, 2003; Bingle & Craven, 2003; Bingle & Gorr, 2004; Geetha *et al.*, 2005; Bingle & *et al.*, 2009). Geetha *et al.* (2003) demonstraram que a SPLUNC2 (PSP humana) pode ser identificada na parótida. Estudos recentes demonstraram atividade bactericida ou bacteriostática para

diversas bactérias gram negativas, particularmente a *Pseudmona aeruginosa* (Geetha *et al.*, 2003; Gorr *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2008).

Zhou *et al.* (2008) avaliaram os efeitos do SPLUNC1 sobre a *P. aeruginosa* e o Vírus Epstein Barr (EBV), demonstrando que essa proteína pode se ligar ao LPS bacteriano, inibir o crescimento da bactéria, aumentar a ruptura e apoptose dos linfócitos infectados com EBV e regular a expressão das proteínas de membrana do EBV. Os autores sugerem que o SPLUNC1, além de ter um papel antibacteriano e antiviral, pode inibir o potencial oncogênico do EBV no epitélio respiratório.

A participação do PLUNC na defesa inata do hospedeiro é bem relatada e aceita, mas a existência de diferentes proteínas dentro desta família sugere que elas podem possuir diferenças intrínsecas na atividade biológica ou que elas podem ser seletivamente efetivas para o controle de determinados patógenos, moléculas de LPS, ou outras moléculas antigênicas (Bingle & Gorr, 2004).

2.3.3. Estudos da expressão das proteínas da família PLUNC

Genes PLUNC-like são expressos por células epiteliais desde o ápice da língua até o duodeno, apresentando uma expressão seletiva de cada proteína em cada região anatômica, o que está associado às peculiaridades dependentes da diversa flora microbiana que habita cada uma destas regiões (LeClair, 2003a). As proteínas da família PLUNC têm sido identificadas em diferentes fluidos no ser humano tais como a saliva, o fluido nasal, as secreções traquéio-bronquiais e as pulmonares; e os sítios de expressão dessas proteínas incluem glândulas salivares e epitélio respiratório nasal, traqueal ou bronquial, entre outros (LeClair *et al.*, 2001; Bingle & Craven, 2002; Andrault *et al.*, 2003; Ghafouri *et al.*, 2003; Kim *et al.*, 2006). SPLUNC1, SPLUNC2 e LPUNC1 foram identificados na saliva por diferentes pesquisadores, sugerindo que são produzidas pelas glândulas salivares (Ghafouri *et al.*, 2003; Campos *et al.*, 2004; Vitorino *et al.*, 2004; Ramachandran *et al.*, 2006; Vargas *et al.*, 2008). Níveis aumentados de PLUNC

foram relatados em pacientes fumantes e expostos a irritantes químicos, assim como no esputo de pacientes com doença respiratória obstrutiva crônica (Ghafouri *et al.*, 2002; Di *et al.*, 2003). Ghafouri *et al.* (2003) demonstraram que PLUNC é uma proteína abundante no fluido nasal de indivíduos saudáveis e que a expressão é diminuída em pacientes expostos a irritantes como o tabaco quando a exposição a estes irritantes químicos é prolongada, possivelmente por um efeito tóxico nas células secretoras.

Recentemente, foi descrita a expressão de PLUNC nos grânulos específicos de neutrófilos humanos, células importantes na resposta imune do hospedeiro, o que sugere que também podem liberar essas proteínas ao serem estimulados (Bartlett *et al.*, 2008). Embora estes autores não tenham conseguido demonstrar a atividade antibacteriana do PLUNC, o armazenamento e a secreção por uma célula fagocítica suportam a hipótese de que essa proteína participa na resposta inflamatória e contribui na defesa do hospedeiro. Foi demonstrado que o PLUNC é armazenado nos grânulos específicos dos neutrófilos e é secretado por degranulação, em contraste com a proteína BPI, que é um produto dos grânulos azurófilos, um compartimento subcelular diferente dos grânulos específicos. Estes autores realizaram o primeiro relato de expressão de PLUNC por uma célula de linhagem hematopoiética e sugeriram que a expressão do PLUNC é menos restrita do que se pensava previamente (Bartlett *et al.*, 2008).

Estudos que demonstraram a expressão de SPLUNC1 na cavidade oral e no trato aéreo superior localizaram a proteína nas células epiteliais do trato respiratório, na superfície do epitélio que cobre as vias aéreas principais, no esputo e nas secreções nasais. Entretanto, a expressão mais significativa dessa proteína foi observada em células mucosas e ductos de glândulas submucosas (Bingle & Craven, 2003; Zhou *et al.*, 2006b). Uma expressão intensa também foi detectada em glândulas menores da cavidade nasal, seios paranasais, região posterior da língua e tonsilas, sugerindo a presença nas secreções mucosas desses tecidos (Bingle *et al.*, 2005). Recentemente, Bingle *et al.* (2007) reportaram um incremento na expressão de SPLUNC1 nas vias aéreas menores dos pulmões

em pacientes com fibrose cística, o que pode ser interpretado como uma resposta defensiva do epitélio ao componente infeccioso nessa doença. Chu *et al.* (2007) estudaram a função e regulação da SPLUNC1 na infecção por *Mycoplasma pneumoniae* e na inflamação alérgica (asma), concluindo que o SPLUNC participa na defesa imune contra a infecção nas vias aéreas e inibe a produção epitelial de IL-8, além de que a inflamação alérgica (com uma maior expressão de IL-13) diminui significativamente a expressão de SPLUNC1, o que em parte contribuiria para a natureza persistente das infecções bacterianas em pacientes alérgicos.

A expressão no tecido nasal também foi estudada, e mostrou que o PLUNC é uma proteína expressa pelas células epiteliais nasais e que não é influenciada por mediadores de diferenciação ou proliferação. A expressão foi identificada nas células ciliadas do epitélio superficial e nas células serosas das glândulas submucosas no epitélio nasal (Kim *et al.*, 2006). Outros estudos relataram a expressão de PSP e SMGB na glândula parótida e submandibular por técnicas de imunoistoquímica e biologia molecular (Ball *et al.*, 2003; Bingle & Gorr, 2004). A expressão de PSP (SPLUNC2) também foi identificada em queratinócitos gengivais o que pode ser regulado por fatores humorais e bactérias, sugerindo um papel na defesa do epitélio de superfície gengival (Shiba *et al.*, 2005). Wu *et al.* (2009) relataram uma diminuição de SPLUNC2 na saliva de pacientes com periodontite agressiva generalizada. Essa diminuição poderia ser o resultado da resposta imune inibitória induzida pela bactéria que causa a periodontite o que sugere que as glândulas salivares estão envolvidas no processo de resposta imune na doença periodontal (Wu *et al.*, 2009)

Foram gerados dois clones de SPLUNC2 pela injeção de dois peptídeos sintéticos em coelhos, correspondendo aos aminoácidos 156–168: (VTIETDPQTHQPV) (designado SPLUNC2A) e aminoácidos 236–249-COOH: (VDNPQHKTQLQTLI) (designado SPLUNC2B). SPLUNC2A reconhece um epítipo que é encontrado internamente na proteína, e o segundo anticorpo, SPLUNC2B, reconhece um epítipo no extremo C-terminal da proteína. Ambos os

anticorpos são capazes de identificar constituintes da saliva humana (Bingle *et al.*, 2009).

Zhou *et al.* (2006a) realizaram um estudo em fetos humanos de 28 a 30 semanas de gestação reportou a expressão imunoistoquímica de SPLUNC1 em glândulas salivares, epitélio do trato respiratório superior e digestivo, além de olhos e tecido adiposo. A expressão em olhos e tecido adiposo não tem sido relatada em tecidos adultos. Esses autores reportaram a expressão da proteína secretada no fluido nasofaríngeo, saliva e lágrimas e sugeriram que a SPLUNC teria um papel antimicrobiano e de manutenção da homeostase no trato respiratório superior, olhos e trato digestivo; e pode ser importante no desenvolvimento e no metabolismo do tecido adiposo (Zhou *et al.*, 2006a). Posteriormente, Alves & Vargas (2010) avaliaram a expressão de membros da família PLUNC em fetos humanos de 12 a 25 semanas de gestação em glândulas salivares maiores e menores, concluindo que a expressão de SPLUNC1 tem início na vida intra-uterina, quando as glândulas salivares se acham em um estágio de morfodiferenciação avançado com marcação nos *plugs* de mucina dos ductos estriados e no citoplasma dos ácinos mucosos. Pela negatividade para SPLUNC2, os autores sugeriram que a expressão dessa proteína tem início na vida pós-natal.

Bingle *et al.* (2009) estudaram a expressão do SPLUNC2 em glândulas salivares maiores e menores normais. Observaram que essa proteína apresenta expressão predominantemente nas células dos ácinos serosos de glândulas salivares maiores, nos ductos das glândulas salivares maiores e menores, assim como nos túbulos sero-mucosos de glândulas salivares menores da mucosa oral, região posterior da língua e tonsila. A positividade é mais forte para SPLUNC2B que SPLUNC2A nos ácinos serosos da glândula parótida, no entanto na glândula submandibular a expressão foi maior para SPLUNC2A do que para SPLUNC2B, um padrão similar foi identificado na glândula sublingual. A identificação da expressão nesses sítios, reconhecidamente produtores de proteínas importantes para a defesa do hospedeiro, suportam a teoria de que SPLUNC agiria na defesa imune inata na cavidade oral.

Em glândulas salivares menores, foi relatada a expressão de SPLUNC1 nos ácinos mucosos e para SPLUNC2 nos ácinos serosos, em um padrão similar da glândula submandibular e sublingual. Nas glândulas do trato respiratório superior, foi identificada uma forte expressão de SPLUNC1 e negatividade para SPLUNC2 (Bingle *et al.*, 2009).

Da Silva *et al.* (2010) compararam a expressão de membros da família PLUNC em glândulas salivares maiores de pacientes HIV positivos e HIV negativos. Eles concluíram que não há diferença entre a expressão de SPLUNC1 entre pacientes dos grupos estudados, sendo que a expressão foi identificada nos ácinos mucosos das glândulas sublinguais e submandibulares. Além disso, SPLUNC2 foi expressa nos ácinos serosos das glândulas salivares maiores estudadas, sendo significativamente maior a sua expressão em pacientes HIV positivos com micobacteriose e citomegalovirose. LPLUNC1 mostrou marcação em ductos estriados, intercalares e excretorios, mas sem diferença entre os grupos estudados.

2.3.4 Expressão das proteínas da família PLUNC em tumores

A proteína SPLUNC1 (LUNX) tem sido confirmada como um marcador diagnóstico em câncer de pulmão, especialmente no caso de micrometástase de câncer de células não pequenas, adenocarcinoma, CME e carcinoma brônquio-alveolar (Iwao *et al.*, 2001; Mitas *et al.*, 2003; Bingle *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2005; Kim *et al.*, 2007; Cheng *et al.*, 2008; Benlloch *et al.*, 2009). Também foi identificada a expressão de PLUNC em carcinoma nasofaríngeo e câncer gástrico (Zhang *et al.*, 2003; He *et al.*, 2005; Sentani *et al.*, 2008; Yasui *et al.*, 2009). SPLUNC4, também conhecido como BASE, pode ser usado em provas diagnósticas para câncer de mama, pois é expresso em linhas celulares malignas em uma grande proporção de tecidos de câncer de mama primários, sendo que em tecidos normais só é expresso em glândulas salivares (Egland *et al.*, 2003).

Vargas *et al.* (2008) determinaram a expressão de proteínas PLUNC (SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1) em tumores malignos e benignos de glândula salivar, encontrando expressão de PLUNC apenas em CME e cistoadenocarcinoma papilar. Todos os tipos de PLUNC avaliados foram positivos no cistoadenocarcinoma papilar. LPLUNC1 e SPLUNC2 foram positivos em CMEs, sendo expressos em *plugs* de mucina, e células intermediárias e mucosas. As células epidermóides e claras foram negativas. Estes autores concluíram que a expressão de PLUNC pode ser uma ferramenta de diagnóstico útil em casos de CME e cistoadenocarcinoma papilar. Estes resultados motivaram a realização do presente estudo que se propõe a analisar a expressão das proteínas da família PLUNC em uma amostra maior de CMEs de glândulas salivares maiores e menores, avaliando o potencial destas proteínas no diagnóstico destes tumores quando comparadas com técnicas histoquímicas disponíveis atualmente.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

O objetivo deste estudo foi avaliar a expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC em CME de glândulas salivares maiores e menores.

3.2 Objetivos específicos

1. Revisar os casos de CME coletados e classificá-los histologicamente de acordo com os últimos parâmetros da OMS (Barnes *et al.*, 2005).
2. Caracterizar a expressão imunoistoquímica das proteínas SPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B, LPLUNC1 e LPLUNC2 em CMEs das glândulas salivares maiores e menores.
3. Correlacionar o grau de malignidade dos CMEs estudados com a expressão das proteínas da família PLUNC.
4. Correlacionar o padrão de marcação das proteínas da família PLUNC com o padrão de marcação de PAS e mucicarmin em CMEs.
5. Avaliar a capacidade das proteínas da família PLUNC como marcadores úteis no diagnóstico de CMEs de glândulas salivares.
6. Caracterizar a expressão das proteínas SPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B, LPLUNC1 e LPLUNC2 em tecido de glândula salivar normal adjacente aos CMEs estudados.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Características da amostra

Foi realizado um estudo retrospectivo descritivo com casos que pertencem ao Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP) entre os anos 1989 e 2004.

Os dados clínico-patológicos foram coletados retrospectivamente nos prontuários dos pacientes. Os dados clínicos incluíram gênero, idade, tamanho do tumor e localização da lesão. Os blocos de parafina contendo biópsias dos casos selecionados no período foram resgatados do arquivo, posteriormente foram feitos novos cortes e novas colorações em Hematoxilina Eosina. Todos os casos foram revisados por microscopia óptica para confirmação do diagnóstico por três patologistas (W.A.G.A., A.R.S.S. e P.A.V.) e foi realizada a gradação histológica de acordo com o sistema de classificação publicado pela OMS (Barnes *et al.*, 2005). Colorações histoquímicas especiais como PAS e mucicarmin foram feitas para confirmar a presença de mucina nos tumores.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (Protocolo nº 047/2010).

4.2 Protocolo das técnicas de PAS e mucicarmin

As técnicas de coloração histoquímica para PAS e mucicarmin de Mayer foram realizadas de acordo com os protocolos utilizados no Laboratório de Patologia Oral da FOP-UNICAMP, como descrito a seguir.

Foram obtidos dois cortes de 5mm de espessura a partir de cada bloco de parafina selecionado, os cortes foram montados em lâminas não silanizadas. A técnica de PAS utilizada foi realizada a partir da desparafinização em xilol dos

novos cortes histológicos e posteriormente, foi realizada a hidratação dos cortes em etanol absoluto e álcool 70% por cinco minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada. Na sequência, os cortes foram banhados com ácido periódico a 5 % durante 5 minutos. Realizou-se enxágue das lâminas e cortes histológicos em água corrente durante 5 minutos. O reativo de Schiff foi aplicado durante 15 minutos nos cortes. Posteriormente, os cortes foram deixados em bisulfito sódico a 2 % por 5 minutos. As lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos e posteriormente submergidas em hematoxilina de Mayer por 10 minutos. Por fim, se realizou um lavado com água corrente durante 5 minutos, desidratação, diafanização com xilol e finalmente as lâminas foram montadas para análise microscópica com auxílio de bálsamo do Canadá. Técnicas de PAS com e sem diastase foram feitas em todos os casos.

A técnica de mucicarmin foi realizada a partir da desparafinização em xilol e posteriormente, foi realizada a hidratação dos cortes em etanol absoluto e álcool 70% por cinco minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada. Depois, os cortes foram banhados com hematoxilina de Weigert durante 10 minutos. Realizou-se um lavado em água corrente durante 3 minutos, e as lâminas foram submergidas em solução diluída de mucicarmin (1:4) durante 30 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados com água corrente durante 10 minutos, as lâminas desidratadas e montadas para análise microscópica com auxílio de bálsamo do Canadá.

4.3 Protocolo das técnicas de imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram realizadas no Laboratório de Patologia Oral da FOP-UNICAMP. Os seguintes anticorpos foram utilizados: SPLUNC1 (diluição 1:300), SPLUNC2A (diluição 1:250), SPLUNC2B (diluição 1:500), LPLUNC1 (diluição 1:600) e LPLUNC2 (diluição 1:600). Esses anticorpos não estão disponíveis comercialmente e foram doados para essa pesquisa pela Dra. Lynne Bingle do Departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade

de Odontologia Clínica da Universidade de Sheffield (Inglaterra). Os anticorpos foram desenvolvidos e validados segundo protocolos estabelecidos e publicados por Bingle et al. (2005) e Vargas et al. (2008).

Foram obtidos 6 cortes de 3mm de espessura de cada biópsia incluída em parafina e montados em lâminas silanizadas. Foi realizada a primeira desparafinização em xilol por cinco minutos e a segunda desparafinização em xilol por mais cinco minutos. Posteriormente, foram realizadas duas hidratações dos cortes em etanol absoluto e álcool 70% por cinco minutos cada, seguida por lavagens em água corrente e destilada, para depois fazer o bloqueio da peroxidase endógena, em água oxigenada (3% em metanol) por 20 minutos, e lavadas rapidamente em PBS. A recuperação antigênica foi realizada pela fervura em microondas, com solução de citrato de sódio (tribásico) 0,01M por oito minutos, deixando esfriar até atingir a temperatura ambiente seguida por lavagem em PBS.

Posteriormente, foi realizado um bloqueio de proteínas com 100% de soro fetal de cabra (Sigma Aldrich), em câmara úmida por 30 minutos em temperatura ambiente. Então, foi efetuada a incubação por 18 horas a 4°C com o anticorpo primário diluído em soro fetal de cabra. Um controle negativo utilizando anticorpo IgG (Dako) foi utilizado em cada caso. As lâminas foram lavadas duas vezes em PBS sob agitação por cinco minutos cada e então incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit, Vector Laboratories) por 30 minutos a temperatura ambiente, seguido de duas lavagens em PBS sob agitação por cinco minutos cada. Na sequência, as lâminas foram incubadas com complexo Avidina – Biotina (Vectastain Elite ABC kit, Rabbit, Vector Laboratories) por mais 30 minutos em temperatura ambiente. Em seguida foi realizada uma nova lavagem com PBS com duas trocas de cinco minutos sob agitação. Na próxima etapa as lâminas foram reveladas com o substrato cromógeno para peroxidase (Vector NovaRed, *Substrate kit for peroxidase*) por dois a cinco minutos ou até o aparecimento de cor em temperatura ambiente. Em seguida, foram lavadas em água destilada por cinco minutos. As lâminas foram

então contra-coradas com Hematoxilina e lavadas em água corrente e água destilada. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool 70%, 90% e absoluto, seguido pela diafanização em xilol e montagem das lâminas com resina de baixa viscosidade.

4.4 Avaliação da marcação imunoistoquímica

As reações de imunoistoquímica foram classificadas como positivas ou negativas, especificando o tipo celular marcado pelo anticorpo. Também foi analisada a intensidade e a porcentagem da marcação no tumor segundo a Escala Imunoreativa Semiquantitativa de Remmele (Semiquantitative Immunoreactive Score – IRS) (Remmele & Stegner, 1987 citado por Kohlberger e cols., 1997 e Magerl e cols., 2010). Este é um sistema subjetivo no qual se avalia a porcentagem de células marcadas (PP, do inglês *percentage of positively stained cells*) e a intensidade de marcação nas células (SI, do inglês *stain intensity*). A porcentagem de células marcadas foi analisada com uma lente objetiva de 4X e a intensidade de marcação com uma lente de 40X. O escore (IRS) foi determinado multiplicando PP por SI (Tabela 2).

Tabela 2. Escala Imunoreativa Semiquantitativa de Remmele (Semiquantitative Immunoreactive Score – IRS)

PP=0	Sem marcação
PP=1	Marcação em <10% das células
PP=2	Marcação em 10-50% das células
PP=3	Marcação em 51-80% das células
PP=4	Marcação em > 80% das células
SI=1	Sem marcação
SI=2	Marcação fraca
SI=3	Marcação intensa
SI=4	Marcação forte

IRS = porcentagem de células marcadas (PP) X intensidade de marcação (SI).

Finalmente os escores foram classificados em três grupos:

- a) Negativo = 0
- b) Baixo = 1-7
- c) Alto = 8-16

4.5 Forma de análise dos resultados

Os resultados foram tabulados com auxílio do software Microsoft Excel (Office 2007), e posteriormente foi realizada uma análise estatística descritiva.

5 RESULTADOS

5.1 Achados demográficos e clínico-patológicos

A amostra de pacientes consistiu de 30 casos de CME. A faixa etária foi de 5 a 80 anos (média de idade de 44,07 anos). A relação homem:mulher foi 1:1,9 (19 mulheres (63,33%) e 10 homens (33,33%)). Um caso não tinha informação sobre o gênero. Todos os casos pertencem ao Laboratório de Histopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A distribuição por localização dos tumores foi de 19 casos de glândulas salivares menores (63,33%), 8 casos de glândula parótida (26,66%), um caso de glândula submandibular (3,33%) e 2 casos de CME intra-ósseo (6,66%).

Com relação à gradação histológica de acordo com a OMS (Barnes *et al.*, 2005), 19 (63,33%) casos foram classificados como de baixo grau de malignidade, 4 (13,33%) casos de grau intermediário e 7 (23,33%) casos de alto grau (Figuras 4-6). A maioria dos casos [25 (83,33%)] foi do tipo clássico ou convencional, 3 (10%) casos foram da variante de células claras e 2 (6,66%) casos foram da variante de células oncocíticas. Os achados demográficos e clínico-patológicos estão descritos na tabela 3.

Tabela 3. Características demográficas e clínico-patológicas da amostra utilizada no estudo.

Nº	Idade	Gênero	Localização	Grau (Barnes <i>et al.</i> , 2005/OMS)	Variante histológica
1	42	F	Parótida	Baixo	Clássico
2	49	F	gl sal men	Baixo	Clássico
3	48	F	gl sal men	Alto	Clássico

4	33	F	gl sal men	Intermédio	Clássico
5	50	F	gl sal men	Baixo	Células claras
6	44	F	Intraósseo	Baixo	Clássico
7	16	M	gl sal men	Baixo	Clássico
8	ND	F	gl sal men	Baixo	Clássico
9	57	F	gl sal men	Baixo	Células claras
10	63	F	gl sal men	Baixo	Clássico
11	49	M	Parótida	Baixo	Células oncocíticas
12	58	M	Parótida	Intermédio	Clássico
13	61	M	gl sal men	Baixo	Clássico
14	22	M	gl sal men	Intermédio	Células claras
15	13	F	gl sal men	Intermédio	Clássico
16	64	F	gl sal men	Alto	Clássico
17	41	F	gl sal men	Baixo	Clássico
18	5	F	Submand	Alto	Células oncocíticas
19	39	F	Parótida	Alto	Clássico
20	30	M	gl sal men	Baixo	Clássico
21	ND	ND	gl sal men	Baixo	Clássico
22	62	M	Parótida	Alto	Clássico
23	60	F	gl sal men	Baixo	Clássico
24	46	M	Intraósseo	Baixo	Clássico
25	40	F	gl sal men	Baixo	Clássico
26	80	M	gl sal men	Alto	Clássico

27	42	M	Parótida	Baixo	Clássico
28	26	F	gl sal men	Baixo	Clássico
29	25	F	Parótida	Baixo	Clássico
30	69	F	Parótida	Alto	Clássico

ND = não disponível; gl sal men = glândula salivar menor.

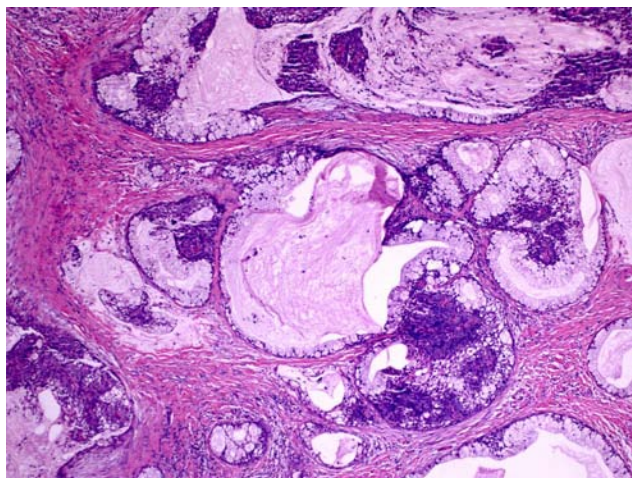


Figura 4. Carcinoma mucoepidermóide de baixo grau. Tumor predominantemente cístico com um alto número de células mucosas (caso 24, HE, 50x).

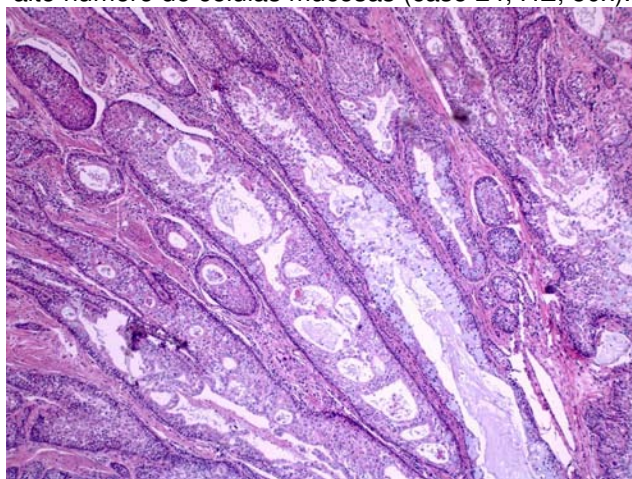


Figura 5. Carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário. Tumor com presença de alguns espaços císticos, predominância de células intermediárias e pode-se observar alguns ninhos de células epidermóides (caso 12, HE, 50x).

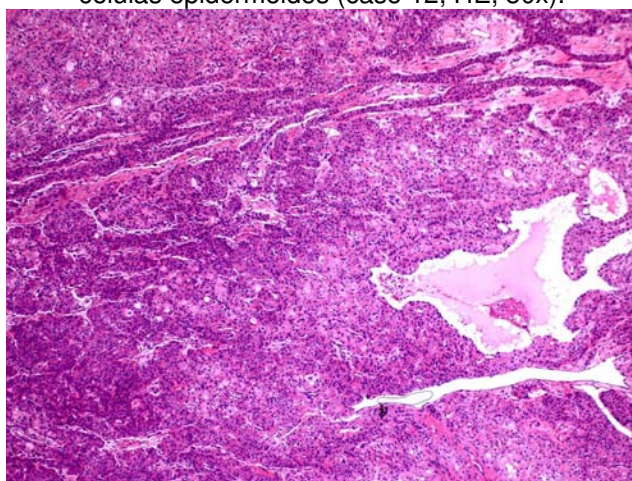


Figura 6. Carcinoma mucoepidermóide de alto grau. Tumor com poucos espaços císticos presentes e predominância de células epidermóides (caso 19, HE, 50x).

6.2 Coloração histoquímica de PAS e mucicarmin

Todos os casos foram avaliados pelas técnicas histoquímicas de PAS (Figuras 7-8) e mucicarmin (Figura 9). Todas as amostras mostraram positividade nas células mucosas e *plugs* de mucina para PAS e mucicarmin (Tabela 4). A intensidade de marcação foi maior para PAS do que para mucicarmin. A técnica de PAS foi negativa nas células intermediárias, epiteliais, oncocíticas e na maioria das células claras. A técnica de mucicarmin foi negativa nas células intermediárias, epiteliais, oncocíticas e claras.

Tabela 4. Marcação para técnicas de PAS e mucicarmin.

Técnica histoquímica	Casos positivos	Casos negativos	Porcentagem de positividade
PAS	30	0	100%
Mucicarmin	30	0	100%

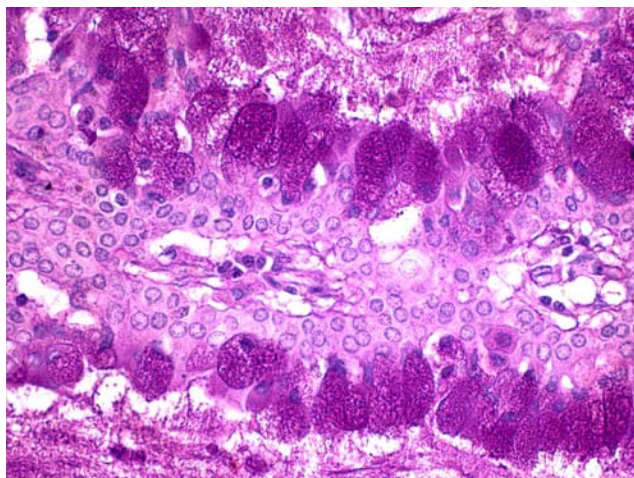


Figura 7. Positividade para PAS em células mucosas (caso 27, PAS, 400x).

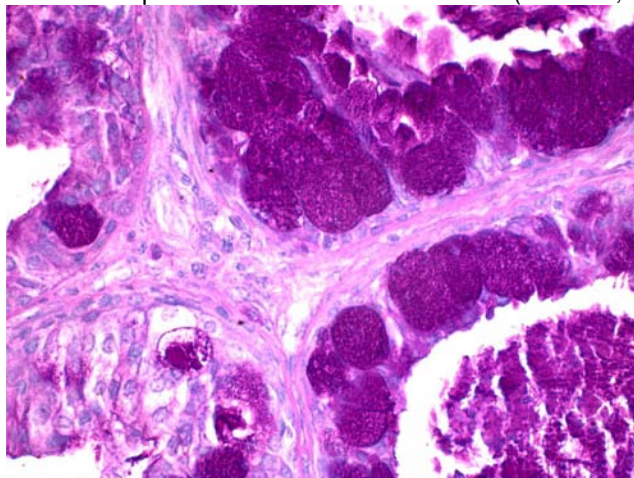


Figura 8. Positividade para PAS em células mucosas e *plugs* de mucina (caso 12, PAS, 400x).

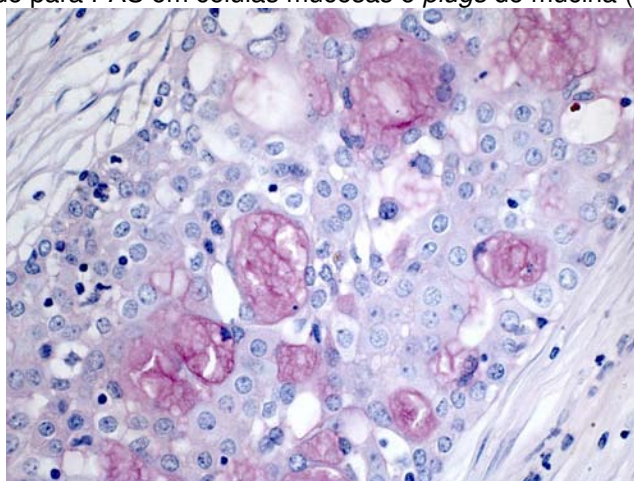


Figura 9. Positividade para mucicarmin em células mucosas e *plugs* de mucina (caso 18, mucicarmin de Mayer, 400x)

5.3 Expressão imunoistoquímica das proteínas PLUNC

Foram avaliadas 5 proteínas da família PLUNC: SPLUNC1, SPLUNC2A, SPLUNC2B, LPLUNC1 e LPLUNC2. Vale destacar que SPLUNC1 e LPLUNC1 apresentaram uma marcação positiva na maioria dos casos estudados. Por outro lado, SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC2 foram negativos na maioria dos tumores. A expressão imunoistoquímica no tumor para essas proteínas são mostradas na tabela 5.

Tabela 5. Expressão imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC nos CME avaliados no estudo.

Proteína PLUNC	Casos positivos	Casos negativos	Porcentagem de positividade
SPLUNC1	27	3	90%
SPLUNC2A	2	28	6,66%
SPLUNC2B	0	30	0%
LPLUNC1	28	2	93,33%
LPLUNC2	0	30	0%

5.3.1- Análise de intensidade e quantidade de marcação no tumor (Escala Imunoreativa Semiquantitativa)

Para cada proteína, foi analisada a intensidade e porcentagem da marcação no tumor segundo a Escala Imunoreativa Semiquantitativa de Remmele. Os resultados estão detalhados na tabela 6.

Tabela 6. Escala Imunoreativa Semiquantitativa de Remmele (Semiquantitative Immunoreactive Score – IRS) nos tumores estudados.

Nº	PLUNC	PP	SICM (IRS)	SIPM (IRS)	SICI (IRS)	SICE (IRS)
1	SP1	2	2(4)	1(2)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	1	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
2	SP1	2	1(2)	2(4)	1(2)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	2(4)	2(4)	1(2)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
3	SP1	1	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	3	2(6)	0(0)	1(3)	1(3)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
4	SP1	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	1(2)	0(0)	1(2)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
5	SP1	3	3(9)	1(3)	2(6)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

6	LP1	1	2(2)	0(0)	1(1)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	1	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
7	LP1	1	1(1)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	3	3(9)	3(9)	1(3)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
8	LP1	3	3(9)	3(9)	1(3)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	2	1(2)	1(2)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
9	LP1	4	3(12)	3(12)	1(4)	1(4)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	3	1(3)	2(6)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
10	LP1	2	1(2)	2(4)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	2	1(2)	2(4)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	3	1(3)	2(6)	0(0)	0(0)

	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
11	SP1	1	1(1)	2(2)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	1	1(0)	1(0)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
12	SP1	2	3(6)	2(4)	1(2)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	3	3(9)	2(4)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
13	SP1	2	2(4)	1(2)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	1(2)	2(4)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
14	SP1	4	2(8)	1(4)	2(8)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	4	3(12)	3(12)	2(8)	1(4)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
16	SP1	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2A	2	3(6)	2(4)	2(4)	1(2)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	3	1(3)	0(0)	1(3)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

17	SP1	3	1(3)	3(9)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	4	3(12)	3(12)	1(4)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
18	SP1	3	2(6)	3(9)	1(3)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	3	2(6)	3(9)	1(3)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
19	SP1	2	2(4)	2(4)	1(2)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	1(2)	0(0)	1(2)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
20	SP1	2	2(4)	1(2)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	3	2(6)	2(6)	1(3)	1(3)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
21	SP1	4	3(12)	1(4)	1(4)	1(4)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	3(6)	1(2)	1(2)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
22	SP1	1	2(2)	0(0)	0(0)	0(0)

	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
23	SP1	2	2(4)	1(2)	0(0)	0(0)
	S2A	2	1(2)	1(2)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	4	3(12)	1(4)	2(8)	1(4)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
24	SP1	2	1(2)	2(4)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	1(2)	2(4)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
25	SP1	3	2(6)	1(3)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	4	3(12)	3(12)	2(8)	1(4)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
26	SP1	1	1(1)	1(1)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
27	SP1	4	3(12)	3(12)	2(8)	1(4)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

28	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	3(6)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	2	3(6)	2(4)	1(2)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
29	LP1	4	3(12)	3(12)	2(8)	1(4)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	2	2(4)	2(4)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	4	2(8)	1(4)	1(4)	0(0)
30	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	SP1	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2A	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	S2B	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)
	LP1	2	0(0)	0(0)	0(0)	1(2)
	LP2	0	0(0)	0(0)	0(0)	0(0)

SP1=SPLUNC1; S2A=SPLUNC2A; S2B=SPLUNC2B; LP1=LPLUN1;
LP2=LPLUNC2; PP=porcentagem de marcação; SICM=intensidade de marcação de células mucosas; SIPM=intensidade de marcação de *plugs* de mucina;
SICl=intensidade de marcação de células intermediárias; SICE: intensidade de marcação de células epidermóides.

Os resultados definitivos da Escala IRS para LPLUNC1 (Tabela 7) e SPLUNC1 (Tabela 8) mostraram que as células mucosas apresentaram maior positividade que as células intermediárias e epidermóides, que os escores são

maiores nos casos de baixo grau quando comparados com os casos de grau intermediário e alto grau e que a maioria dos escores foram considerados como marcação baixa. Os outros anticorpos não foram tabulados devido a sua escassa marcação no tumor.

Tabela 7. Distribuição da expressão imunoistoquímica para LPLUNC1 em todos os tumores.

Grupo de escores	LPLUNC1											
	CME baixo grau (n=7)				CME grau intermediário (n=4)				CME alto grau (n=19)			
	CM	PM	CI	CE	CM	PM	CI	CE	CM	PM	CI	CE
Negativo	5,3%	26,3%	42,1%	73,7%	0%	25%	25%	50%	42,9%	85,7%	42,9%	71,4%
Baixo	57,9%	47,3%	42,1%	26,3%	25%	50%	50%	50%	57,1%	0%	57,1%	28,6%
Alto	36,8%	26,3%	15,8%	0%	75%	25%	25%	0%	0%	14,3%	0%	0%

CM: células mucosas; PM: *plugs* de mucina; CI: células intermediárias; CE: células epidermóides.

Tabela 8. Distribuição da expressão imunoistoquímica para SPLUNC1 em todos os tumores.

Grupo de escores	SPLUNC1											
	CME baixo grau (n=7)				CME grau intermediário (n=4)				CME alto grau (n=19)			
	CM	PM	CI	CE	CM	PM	CI	CE	CM	PM	CI	CE
Negativo	0%	5,3%	68,4%	89,5%	25%	25%	25%	100%	28,6%	42,8%	71,4%	100%
Baixo	78,9%	78,9%	26,3%	10,5%	25%	50%	25%	0%	71,4%	42,8%	28,6%	0%
Alto	21,1%	15,8%	5,3%	0%	50%	25%	50%	0%	0%	14,3%	0%	0%

CM: células mucosas; PM: *plugs* de mucina; CI: células intermediárias; CE: células epidermóides.

5.3.2- Expressão imunoistoquímica de SPLUNC1 no tumor

SPLUNC1 foi positivo em 27 (90%) dos 30 casos do estudo, principalmente em células mucosas e *plugs* de mucina. Foi positivo nas células mucosas em 27 (90%) casos, nos *plugs* de mucina em 25 (83,33%) casos e em células intermediárias em 11 (36,66%) casos (Figuras 10-11). Foi positivo na membrana celular das células claras. A quantidade e a intensidade da marcação foram maiores nos tumores de baixo grau, e foram diminuindo à medida que aumentava o grau do tumor.

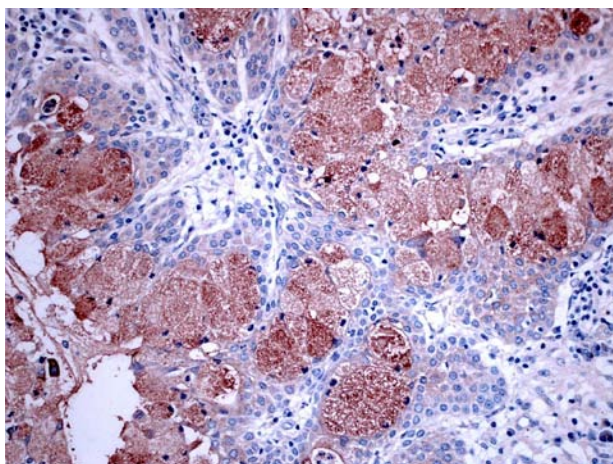


Figura 10. Positividade para SP1 em células mucosas e algumas células intermediárias em CME de baixo grau (caso 27, 200x)

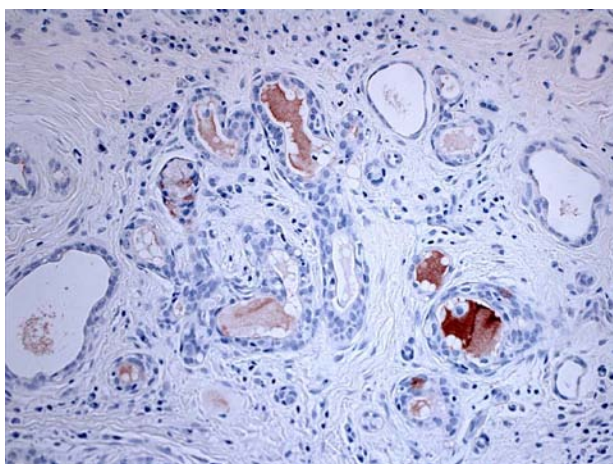


Figura 11. Positividade para SP1 em *plugs* de mucina e algumas células mucosa em CME de baixo grau (caso 13, 200x).

5.3.3- Expressão imunoistoquímica de LPLUNC1 no tumor

LPLUNC1 foi positivo em 28 (93,33%) dos 30 casos estudados, mostrando uma alta positividade em células mucosas, *plugs* de mucina e células intermediárias. Foi positivo nas células mucosas em 27 (90%) casos, *plugs* de mucina em 19 (63,33%) casos, células intermediárias em 17 (56,66%) casos e células epidermóides em 10 (33,33%) casos (Figuras 12-13). Foi positivo na membrana celular das células claras e no citoplasma das células oncocíticas. A quantidade e intensidade da marcação foram maiores nos tumores de baixo grau, e diminuíram à medida que aumenta o grau do tumor.

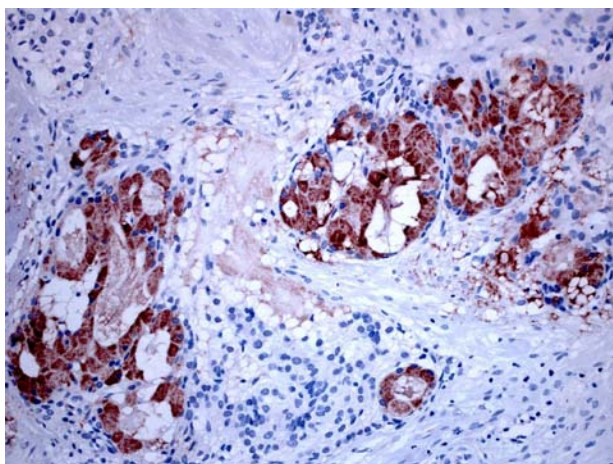


Figura 12. Positividade para LP1 em células mucosas, *plugs* de mucina e algumas células intermediárias em CME de baixo grau (caso 7, 200x).

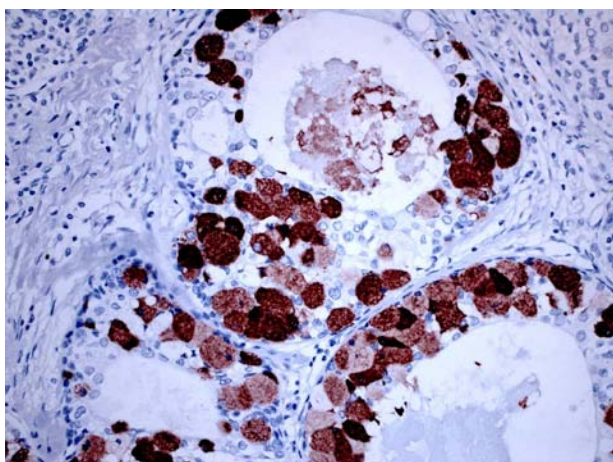


Figura 13. Positividade para LP1 em células mucosas e *plugs* de mucina em CME de grau intermediário (caso 12, 200x).

5.3.4- Expressão imunoistoquímica de LPLUNC2 no tumor

A expressão de LPLUNC2 foi negativa em todos os casos estudados, em todos os tipos celulares que compõem o tumor.

Foi observada positividade em células com morfologia semelhante a mastócitos degranulados e não degranulados. Estas células com citoplasma granular estavam distribuídas em um padrão disperso tanto em áreas intra-tumorais como peri-tumorais (Figura 14). As células LPLUNC2 positivas foram localizadas tanto no parênquima como no estroma tumoral e na zona peri-tumoral, tanto em áreas próximas de vasos sanguíneos e nervos como em áreas próximas dos ductos salivares (Figuras 15-16).

A positividade para LPLUNC2 nas células semelhantes a mastócitos foi forte e específica e encontrada em 25 (83,33%) casos. Nos tumores de baixo grau foi positivo em 16 (84,21%) dos 19 casos, nos tumores de grau intermédio foi positivo em 3 (75%) dos 4 casos e nos tumores de alto grau foi positivo em 6 (85,71%) dos 7 casos. Nos casos de glândulas salivares menores, incluindo os dois casos intraósseos, foi positivo em 17 (80,95%) dos 21 casos, enquanto que nos casos de glândulas salivares maiores foi positivo em 8 (88,88%) de 9 casos. As lâminas de CME coradas em HE foram examinadas à procura de mastócitos dentro do tumor, e estes foram identificados nas mesmas áreas descritas acima onde existiu marcação imunoistoquímica para LPLUNC2 (Figura 17).

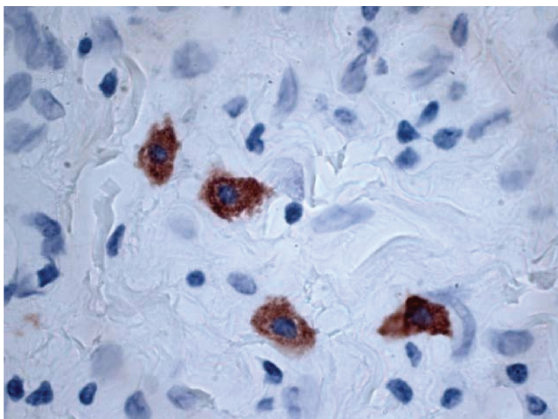


Figura 14. Positividade de LPLUNC2 em células citoplasma granular dentro do estroma tumoral (caso 13, 1000x).

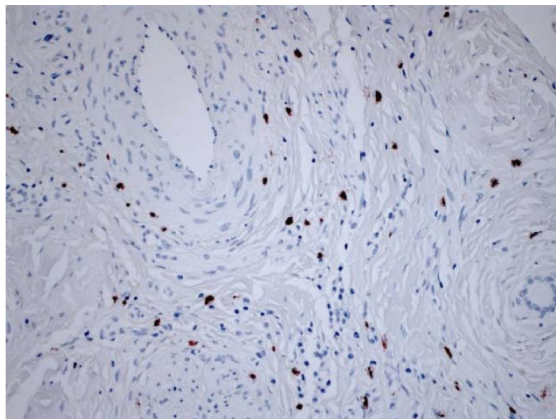


Figura 15. Positividade para LPLUNC2 em células semelhantes a mastócitos perto de vasos (caso 13, 200x).

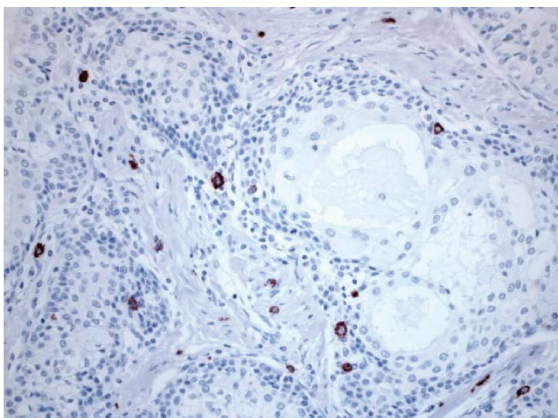


Figura 16. Positividade para LPLUNC2 em células semelhantes a mastócitos em área tumoral (caso 7, 200x).

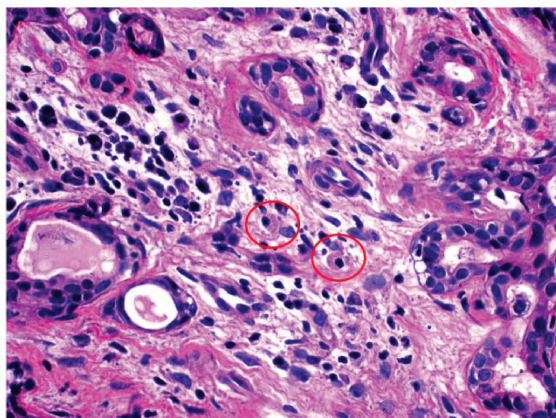


Figura 17. Imagem de HE mostrando a presença de mastócitos (círculos) dentro do estroma tumoral dos CME (caso 13, 400x).

5.3.5 Expressão imunoistoquímica de PLUNC em CME de baixo grau

SPLUNC1 foi expresso principalmente nas células mucosas de 19 (100%) dos 19 casos de baixo grau, em *plugs* de mucina 18 (94,73%) casos e em 6 (31,57%) casos foi positivo para células intermediárias. A marcação foi forte em células mucosas e *plugs* de mucina e de menor intensidade nas células intermediárias (Figuras 18-19).

LPLUNC1 foi expresso dos tumores de baixo grau principalmente nas células mucosas em 19 (100%) casos, nos *plugs* de mucina 14 (73,84%) casos e nas células intermediárias 11 (57,89%) casos. Cinco casos foram positivos em células epidermóides (26,31%). A marcação foi forte nas células mucosas e *plugs* de mucina e de menor intensidade nas células intermediárias e epidermóides (Figuras 20-21). LPLUNC2 foi positivo nas células semelhantes a mastócitos dispersas em 16 dos 19 casos (84,21%).

SPLUNC2A foi positivo em apenas 1 caso em células mucosas e *plugs* de mucina. SPLUNC2B e LPLUNC2 foram negativos em todos os casos estudados.

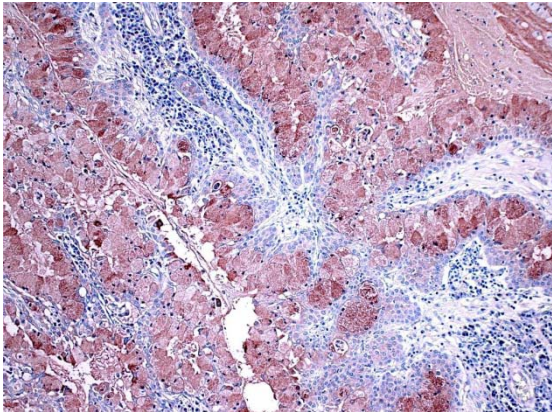


Figura 18. Positividade para SP1 em células mucosas, *plugs* de mucina e células intermediárias (caso 27, 100x).

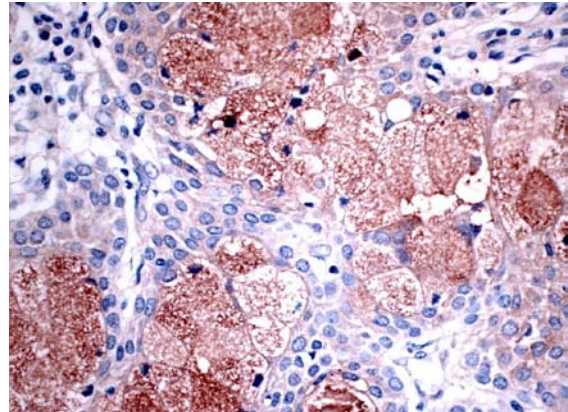


Figura 19. Positividade para SP1 em células mucosas e algumas células intermediárias (caso 27, 400x)

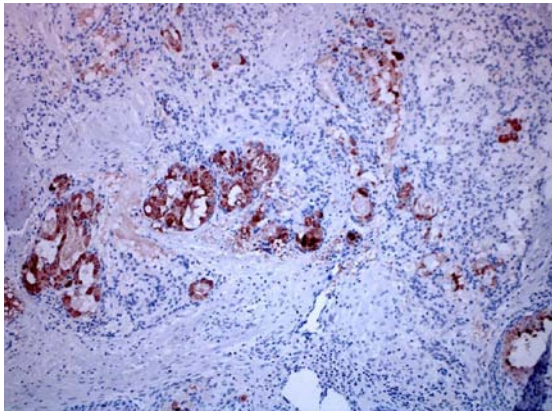


Figura 20. Positividade para LP1 para células mucosas, *plugs* de mucina e algumas células intermediárias (caso 7, 100x)

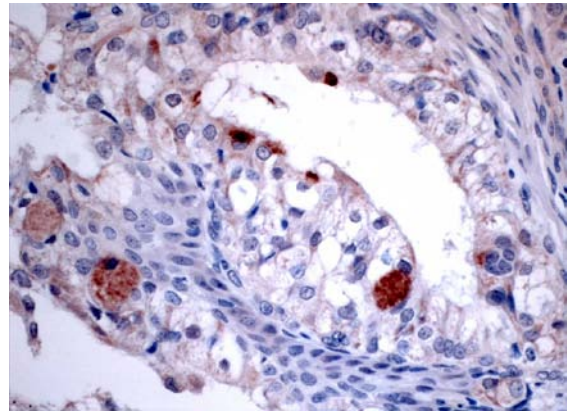


Figura 21. Positividade para LP1 em células mucosas e algumas intermediárias (caso 7, 400x).

5.3.6 Expressão imunoistoquímica de PLUNC em CME de grau intermediário

SPLUNC1 foi expresso principalmente nas células mucosas 3 (75%) de 4 casos nos CMEs de grau intermediários, assim como nos *plugs* de mucina em 3 (75%) casos e em 3 (75%) casos nas células intermediárias (75%). A marcação foi forte nas células mucosas e *plugs* de mucina e de menor intensidade nas células intermediárias (Figuras 22-23).

LPLUNC1 foi principalmente expresso em células mucosas 4 casos (100%), *plugs* de mucina 3 (75%) casos e células intermediárias 3 (75%) casos. A marcação foi forte nas células mucosas e *plugs* de mucina e de menor intensidade nas células intermediárias (Figuras 24-25). LPLUNC2 foi positivo nas células semelhantes a mastócitos dispersas em 3 (75%) casos.

SPLUNC2 e LPLUNC2 foram negativos em todos os casos estudados.

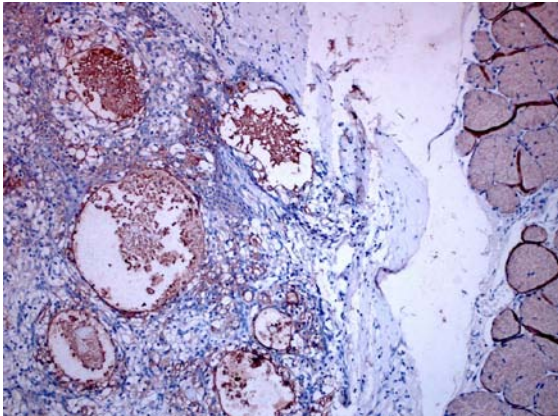


Figura 22. Positividade para SP1 em células mucosas e intermediárias e *plugs* de mucina (caso 15, 100x).

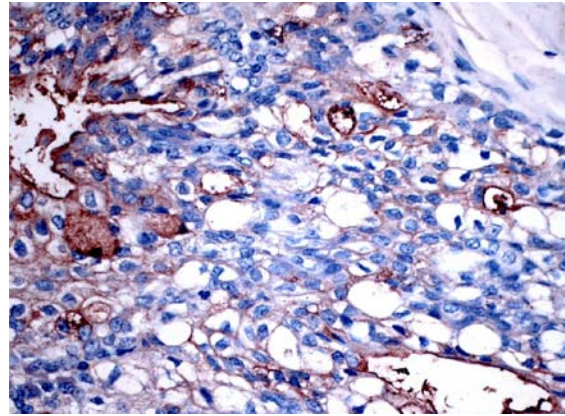


Figura 23. Positividade para SP1 em células mucosas e intermediárias (caso 15, 400x).

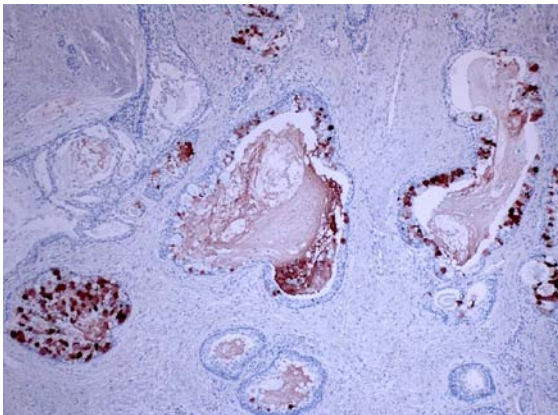


Figura 24. Positividade em células mucosas, *plugs* de mucina e algumas células intermediárias para LP1. (caso 12, 50x).

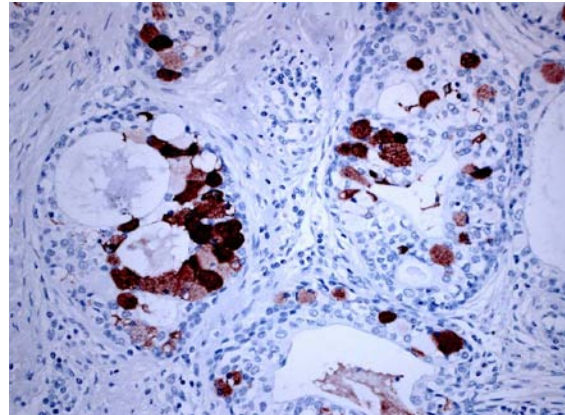


Figura 25. Positividade para LP1 em células mucosas e algumas células intermediárias (caso 12, 200x).

5.3.7- Expressão imunoistoquímica de PLUNC em CME de alto grau

Nos tumores de alto grau, SPLUNC1 foi expresso principalmente em células mucosas 5 (71,42%) de 7 casos, *plugs* de mucina 4 (57,14%) casos e em 2 (28,57%) casos foi positivo nas células intermediárias. A marcação foi forte nas células mucosas e *plugs* de mucina e menos intensa nas células intermediárias (Figuras 26-27).

LPLUNC1 foi principalmente expresso nas células mucosas 4 (57,14%) casos e células intermediárias 4 (57,14%) casos. Em 2 (28,57%) casos foi positivo para *plugs* de mucina e em 3 (42,85%) casos foi positivo em células epidermóides. A marcação foi forte em células mucosas e *plugs* de mucina e de menor intensidade nas células intermediárias e epidermóides (Figuras 28-29). LPLUNC2 foi positivo nas células semelhantes a mastócitos dispersas em 6 (85,71%) casos.

SPLUNC2A foi positivo em apenas 1 caso (3,33%) nas células mucosas, *plugs* de mucina, células intermediárias e epidermóides. SPLUNC2B e LPLUNC2 foram negativos em todos os casos estudados.

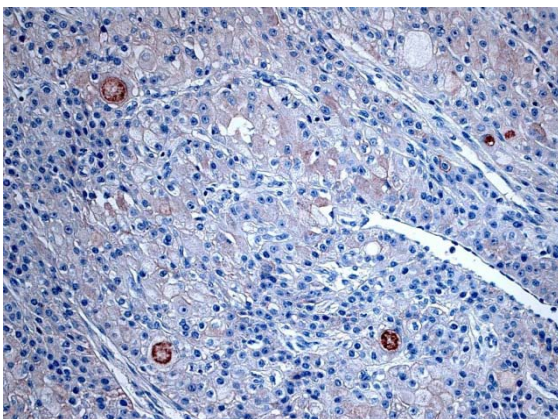


Figura 26. Positividade em *plugs* de mucina para SP1 (caso 19, 200x).

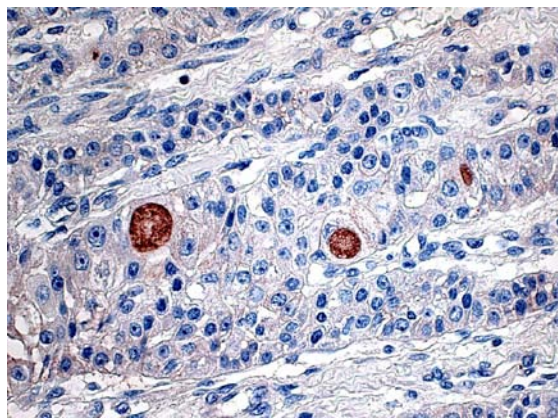


Figura 27. Positividade para SP1 em *plugs* de mucina dentro de ilhas de células epiteliais (caso 19, 400x).

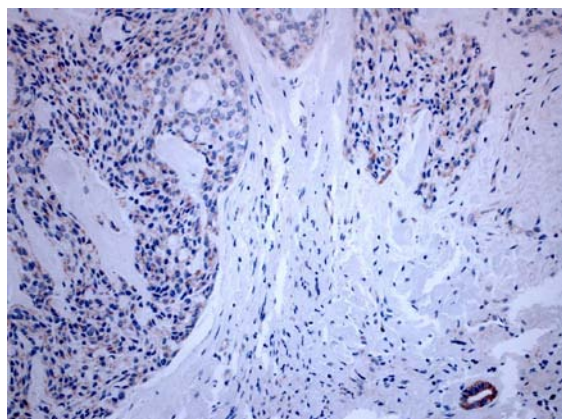


Figura 28. Positividade para LP1 em células epidermóides. Na parte inferior direita se observa o controle de um ducto remanente normal (caso 3, 200x).

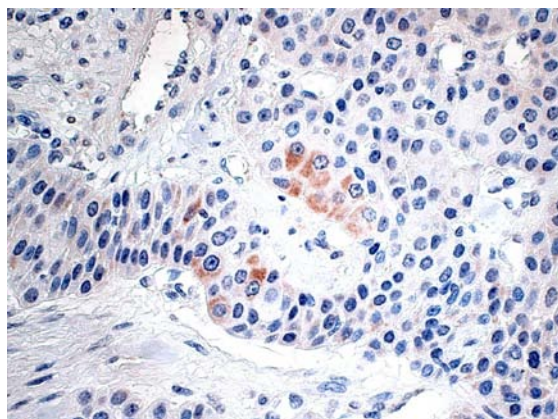


Figura 29. Positividade para LP1 em algumas células epidermóides (caso19, 400x).

5.3.8- Expressão imunoistoquímica de PLUNC em tecido de glândula salivar normal

Dos 30 casos de CME avaliados neste estudo, 13 mostraram fragmentos de tecido de glândula salivar normal adjacente aos tumores. Dentre estes 13 casos, 8 foram oriundos de glândulas salivares menores, 4 de glândula salivar parótida e 1 de glândula submandibular.

SPLUNC1 foi positivo em 2 (25%) dos 8 casos com glândulas salivares menores normais, em áreas de ductos de 2 (25%) casos, em 2 (25%) casos nos ácinos mucosos (Figuras 30 e 31) e nos *plugs* de mucina em 1 (12,5%) caso. SPLUNC1 não mostrou positividade na glândula parótida (Figura 32) nem na submandibular.

SPLUNC2A e SPLUNC2B foram positivos em todas as áreas de ácinos serosos de glândula parótida e submandibular normais. A expressão de SPLUNC2A foi localizada nos ácinos serosos de 4 (100%) casos (Figura 33) e nos ductos normais de 1 (25%) caso na glândula parótida; nos ácinos serosos (1 de 1 caso, 100%) da glândula submandibular, assim como nos ductos e ácinos serosos de 2 (25%) casos com glândulas salivares menores mistas (Figuras 34-35). SPLUNC2A foi negativo em todas as áreas de ácinos mucosos. A expressão de SPLUNC2B foi localizada nos ácinos serosos (4 de 4 casos, 100%) e ductos 3 (75%) casos da glândula parótida (Figura 36) e ácinos serosos (1 de 1 caso, 100%) de submandibular normal. SPLUNC2B foi negativo em todos os casos de glândulas salivares menores (Figura 37), sendo negativo em todas as áreas de ácinos mucosos.

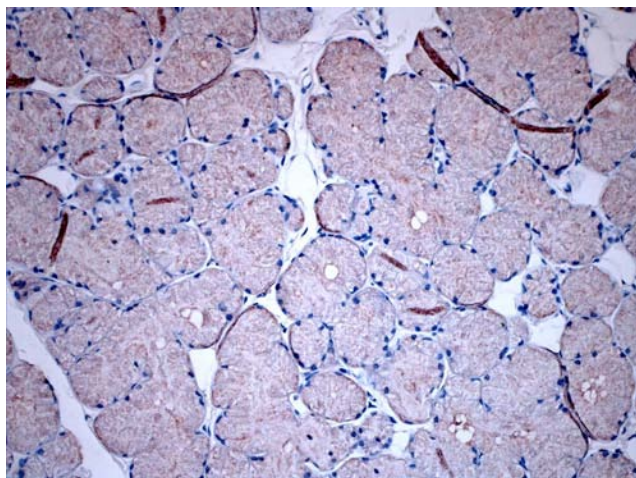


Figura 30. Positividade para SP1 em ácinos mucosos de glândula salivar menor (caso 15, 200x).

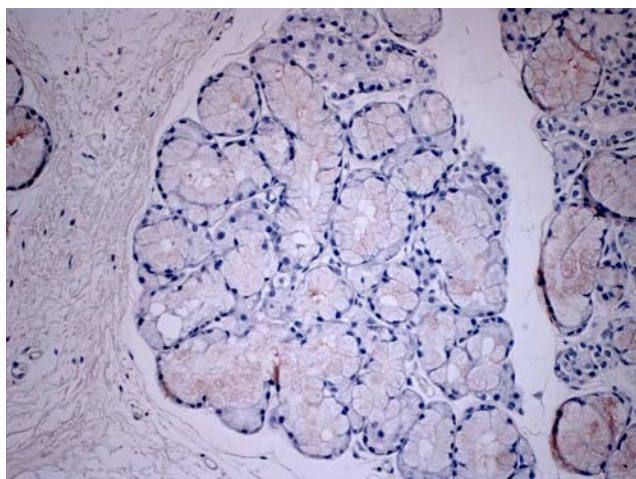


Figura 31. Positividade para SP1 em células mucosas em ácinos mistos (caso 8, 200x).

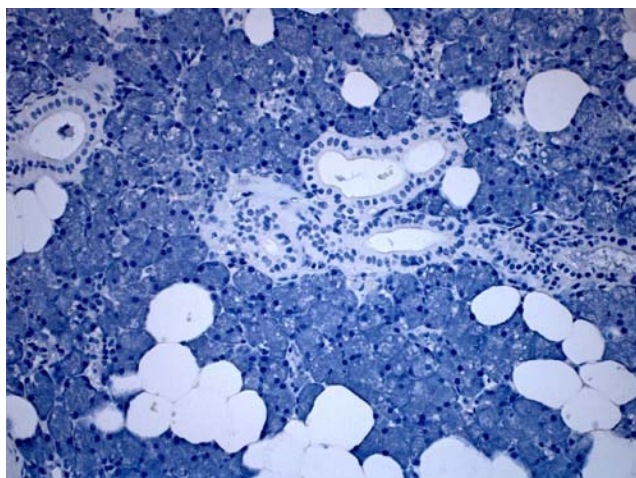


Figura 32. Negatividade para SP1 em ácinos serosos da glândula parótida (caso 29, 200x).

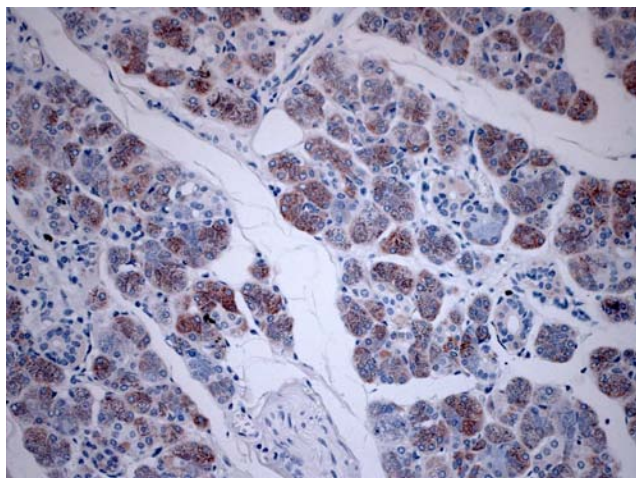


Figura 33. Positividade para SP2A em ácidos serosos e fraco em ductos de glândula parótida (caso 18, 200x).

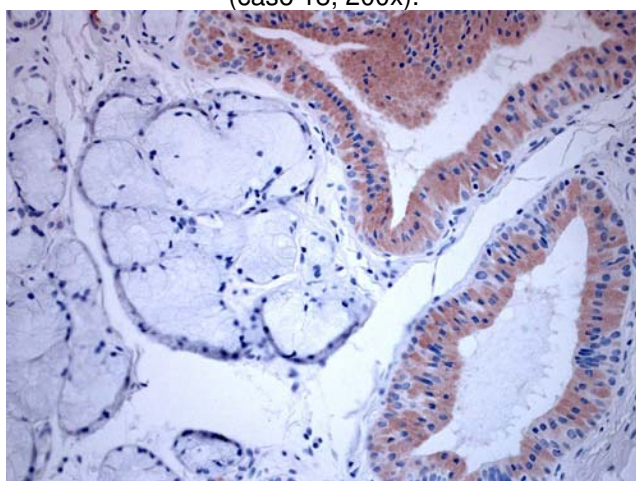


Figura 34. Negatividade para SP2A em ácidos mucosos e positividade em ductos de glândula salivar menor (caso 13, 200x).

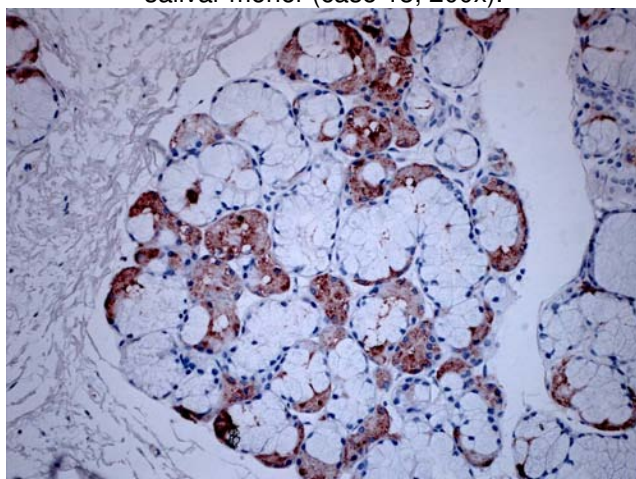


Figura 35. Positividade para SP2A em células serosas em ácidos mistos (caso 8, 200x).

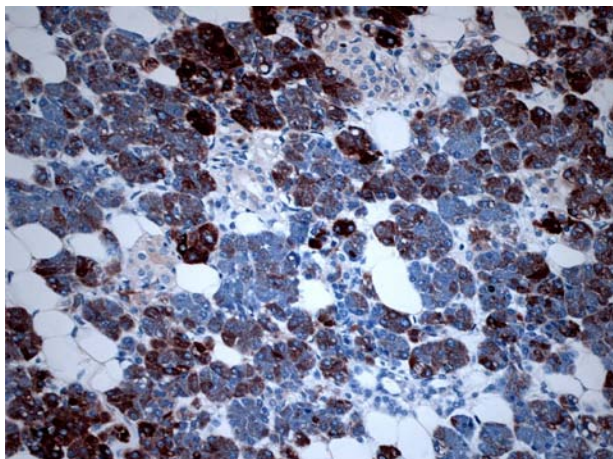


Figura 36. Positividade para SP2B em ácinos serosos e fraco em ductos de glândula parótida (caso 29, 200x).

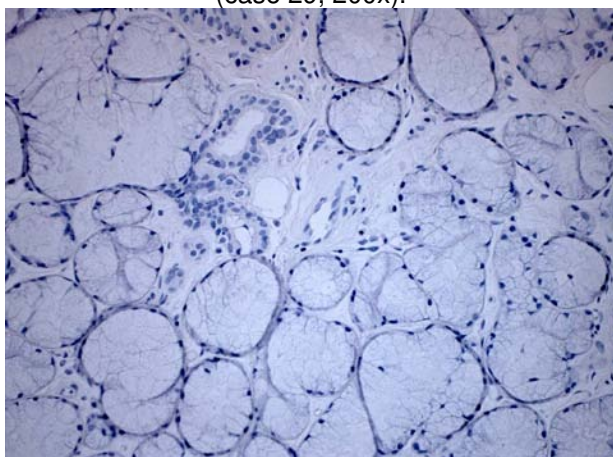


Figura 37. Negatividade para SP2B em ácinos mucosos e ductos de glândula salivar menor (caso 13, 200x).

LPLUNC1 foi positivo nos ductos normais das glândulas salivares menores em 4 (50%) de 8 casos (Figura 38), da glândula parótida 2 (50%) casos (Figura 39) e da glândula submandibular 1 caso (100%). Apenas 2 (25%) casos foram positivos para *plugs* de mucina e 1 (12,5%) caso nos ácinos mucosos de glândulas salivares menores.

LPLUNC2 foi positivo em ácinos mucosos de glândulas salivares menores em 5 (62,5%) casos. Em 1 (12,5%) caso foi positivo em *plugs* de mucina de glândula salivar menor e em outro(12,5%) caso nos ductos de glândula submandibular.

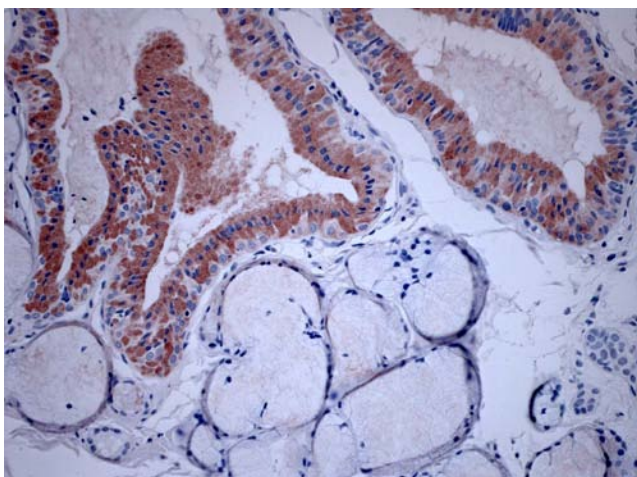


Figura 38. Positividade para LP1 em ductos de glândula salivar menor e fraco em *plugs* de mucina e células mucosas (caso 13, 200x).

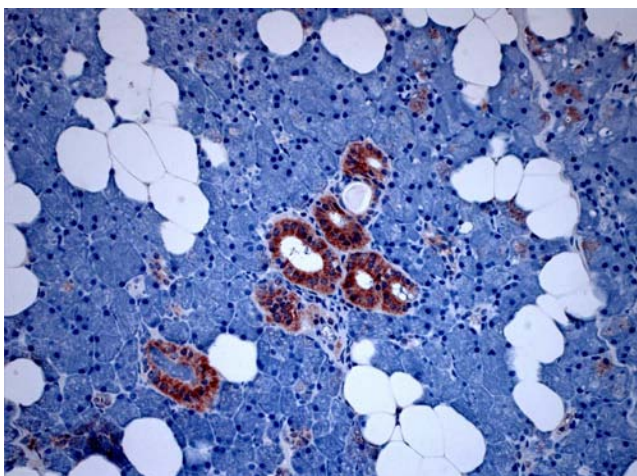


Figura 39. Positividade para LPLUNC1 em ductos de glândula parótida e negativo em ácinos serosos (caso 29, 200x).

6 DISCUSSÃO

O CME é um tumor produtor de mucina que representa o tumor maligno mais comum das glândulas salivares (Speight e Barrett, 2002; Védrine *et al.*, 2006). O diagnóstico e a gradação histológica do CME se baseiam nas características histopatológicas do tumor, no entanto, em alguns casos o diagnóstico pode se tornar difícil, principalmente nos casos de alto grau que apresentam uma histopatologia complexa, com pouca quantidade de células mucosas e baixa produção de mucina. Nestas circunstâncias, os CMEs podem ser confundidos com outros tumores malignos como o carcinoma espinocelular, o qual apresenta um comportamento clínico e tratamento distintos (Luna, 2006).

As características epidemiológicas encontradas na amostra estudada nesta dissertação estão de acordo com aquelas descritas na literatura (Brandwein *et al.*, 2001; Kokemueller *et al.*, 2005; Luna, 2006; Vargas *et al.*, 2008; Demasi *et al.*, 2010).

As proteínas da família PLUNC são proteínas secretadas que teriam uma importante participação na defesa imune inata do hospedeiro nas vias aéreas e cavidade oral, e que apresentam uma expressão tanto nos tecidos que recobrem essas regiões como nos fluídos oriundos destes locais. Diversos autores reportaram a presença de proteínas da família PLUNC na saliva (Vitorino *et al.*, 2004; Guo *et al.*, 2006; Ramachandran *et al.*, 2006) e nas glândulas salivares utilizando diferentes técnicas de biologia molecular, biologia celular (Bingle & Bingle, 2000; Bingle & Craven, 2002), e de imunoistoquímica (Vargas *et al.*, 2008; Alves & Vargas, 2010).

A expressão imunoistoquímica de PLUNC no CME de glândulas salivares foi originalmente descrita por Vargas *et al.* (2008), que sugeriram sua utilidade no diagnóstico de CME de difícil diagnóstico. O presente trabalho parece ser o segundo que se propôs a analisar imunoistoquimicamente as proteínas da família PLUNC em CMEs, e, aparentemente, se trata da maior amostra de casos de CMEs já investigada para a expressão de PLUNC. Os resultados encontrados

nesta dissertação mostraram uma elevada expressão de LPLUNC1 e SPLUNC1 em CME. Apesar de Vargas *et al.* (2008) terem descrito a expressão positiva de LPLUNC1 nos CMEs, estes autores relataram que SPLUNC1 foi negativo nos tumores e SPLUNC2 foi considerado positivo nas células intermediárias. Interessantemente, estes resultados não foram encontrados no presente estudo, onde SPLUNC2A e SPLUNC2B apresentaram marcação escassa ou nula em todos os casos de CMEs estudados, sugerindo por meio de uma maior casuística que SPLUNC2A e SPLUNC2B não teriam importância diagnóstica. Vale a pena destacar que Vargas *et al.* (2008) afirmaram que a positividade para LPLUNC1 em células mucosas e *plugs* de mucina indicaria um potencial uso diagnóstico em casos de CME de difícil diagnóstico, relatando que a positividade para LPLUNC1 e SPLUNC2 em células intermediárias como um achado interessante que requer futuros estudos.

Baseado nos resultados obtidos tanto com a proteína SPLUNC1 como com LPLUNC1, estes anticorpos parecem ser potencialmente importantes no diagnóstico de CME. SPLUNC1 mostrou uma forte marcação, principalmente em células mucosas e *plugs* de mucina, além de algumas células intermediárias que apresentaram expressão menos intensa. A marcação de LPLUNC1 foi forte, principalmente nas células mucosas, *plugs* de mucina e células intermediárias. LPLUNC1 mostrou positividade em células epidermóides em poucos casos. Não foi possível fazer uma associação entre o grau de marcação para PLUNC, tamanho, presença de metástase ou prognóstico dos tumores, por que estas informações não estavam disponíveis para os pesquisadores desta dissertação.

A intensidade da marcação de SPLUNC1 e LPLUNC1 foi maior nas células mucosas e *plugs* de mucina e menor nas células intermediárias e epidermóides. A positividade das células intermediárias e epidermóides estaria associada à origem comum entre os tipos celulares que compõem o CME, sendo as células intermediárias as progenitoras das outras células que compõem o tumor (Luna, 2006). As células intermediárias teriam o potencial de se transformar em células mucosas e células epidermóides. A variação na intensidade da marcação deve ser

considerada no momento de determinar se as células neoplásicas são positivas ou se representam uma marcação inespecífica de fundo (*background*).

A marcação das proteínas SPLUNC1 e LPLUNC1 nos CMEs apresentou um padrão de marcação semelhante ao encontrado com as técnicas de PAS e mucicarmin, as quais foram positivas em células mucosas e *plugs* de mucina. As colorações histoquímicas utilizadas foram negativas nas células intermediárias e epidermóides, entretanto, tanto SPLUNC1 como LPLUNC1 mostraram positividade em algumas células intermediárias, o que é uma diferença entre as proteínas da família PLUNC e as técnicas de PAS e mucicarmin. Ou seja, a detecção imunoistoquímica das proteínas SPLUNC1 e LPLUNC1 se mostrou mais sensível para identificar células intermediárias e epidermóides de CMEs do que as técnicas rotineiramente utilizadas de histoquímica. No que diz respeito ao grau do tumor, as técnicas histoquímicas de PAS e mucicarmin marcaram em maior quantidade os casos de baixo grau quando comparadas aos casos de grau intermediário e alto. Esta característica de padrão de marcação também foi observada na marcação das proteínas SPLUNC1 e LPLUNC1, mostrando uma forte associação entre a expressão de PLUNC e CMEs de glândulas salivares. No entanto, os tumores de alto grau mostram um pequeno número de células mucosas, as quais são difíceis de reconhecer com PAS e mucicarmin.

O presente estudo também demonstrou que a intensidade e, principalmente, a quantidade da marcação são inversamente proporcionais ao grau do tumor. Em outras palavras, aparentemente, os CME de baixo grau expressaram as proteínas PLUNC em maior intensidade, enquanto os tumores de alto grau expressaram PLUNC em menor intensidade. Os casos de baixo grau apresentaram grandes áreas marcadas dentro do tumor. Estas áreas foram menos evidentes nos casos de grau intermediário e ainda menos intensas nos casos de alto grau. Essas características de marcação são similares às observadas quando as lâminas são coradas com PAS ou mucicarmin. Esses achados são esperados, devido ao fato de que quanto maior é o grau do tumor, menor é a quantidade de células mucosas e menor é a produção de mucina. É por este motivo que, nos

casos de CME de alto grau de malignidade, onde as células mucosas e os *plugs* de mucina são escassos, a identificação das células intermediárias e epidermóides se tornam importantes. Neste contexto, os resultados deste trabalho mostraram que SPLUNC1 e LPLUNC1 podem ser ferramentas importantes no diagnóstico do CME quando comparados com as técnicas histoquímicas do PAS e do mucicarmin. Já que nos casos de CMEs de alto grau estudados, foi detectada positividade para SPLUNC1 e LPLUNC1 nas células intermediárias, mesmo quando as células mucosas ou *plugs* de mucina foram pouco evidentes. O presente estudo valoriza a expressão de PLUNC em casos de CME de alto grau, entretanto, novos estudos que avaliem a expressão das proteínas SPLUNC1 e LPLUNC1 apenas em CMEs de alto grau, e com um maior número de casos, certamente aprimorariam a compreensão do uso destes anticorpos no diagnóstico de CMEs de alto grau.

Apesar dos resultados promissores discutidos nos parágrafos acima, é preciso reconhecer que a técnica de detecção imunoistoquímica das proteínas da família PLUNC demanda maiores custos do que as técnicas histoquímicas para PAS e mucicarmin e é mais complexa do ponto de vista laboratorial. Além disso, os anticorpos utilizados neste estudo ainda não estão disponíveis comercialmente.

Em glândula salivar normal, SPLUNC1 mostrou positividade em poucos casos, principalmente localizada em ácinos mucosos, *plugs* de mucina e ductos, exclusivamente em casos de glândula salivar menor. Foi negativo em todos os ácinos serosos, esses resultados são similares aqueles descritos por Vargas *et al.* (2008) e Da Silva *et al.* (2010). Esses mesmos autores encontraram que LPLUNC1 mostrou positividade em ductos intercalares, estriados e excretores presentes tanto em glândulas salivares normais maiores quanto menores. Estes resultados também foram observados nesta dissertação, entretanto, em alguns casos os ácinos mucosos e os *plugs* de mucina das glândulas salivares menores também mostraram positividade. A expressão imunoistoquímica para LPLUNC2 em glândula salivar normal não foi previamente relatada na literatura.

Vargas *et al.* (2008) e Da Silva *et al.* (2010) relataram a positividade nos ácinos serosos para SPLUNC2. Neste presente estudo, tanto SPLUNC2A quanto SPLUNC2B mostraram positividade em todos os ácinos serosos de glândula parótida e glândula submandibular. Também se observou positividade nos ductos da glândula parótida, resultados que são coincidentes aqueles obtidos por Bingle *et al.* (2009) e não foram relatados por Vargas *et al.* (2008) nem por Da Silva *et al.* (2010). Bingle *et al.* (2009) relataram resultados diferentes no padrão de marcação entre os anticorpos SPLUNC2A e SPLUNC2B principalmente em glândulas salivares maiores com um alto componente mucoso, por exemplo, glândula sublingual. Na presente amostra, também foram observadas diferenças evidentes na marcação destes dois anticorpos, mas a quantidade de tumores com tecido normal foi pequena e não foi possível obter resultados conclusivos. Baseados em nossos resultados e nos resultados previamente relatados na literatura pode-se concluir que a expressão mediante técnicas de imunoistoquímica das proteínas PLUNC possuem seletividade para estruturas normais das glândulas salivares (Tabela 9), sendo que SPLUNC1 é expresso nas células mucosas e ductos de ácinos mucosos, e SPLUNC2A e SPLUNC2B são positivos em células serosas e ductos dos ácinos serosos.

Tabela 9. Marcação das proteínas da família PLUNC em glândula salivar normal.

Proteína	Marcação em glândula salivar normal
SPLUNC1	Alguns ácinos mucosos e ductos de glândulas mucosas
SPLUNC2A	Ácinos serosos e ductos de glândulas serosas
SPLUNC2B	Ácinos serosos e ductos de glândulas serosas
LPLUNC1	Ductos de glândulas serosas e mucosas
LPLUNC2	Alguns ácinos mucosos e ductos de glândulas mucosas

As mucinas epiteliais (MUC) são os principais componentes glicoprotéicos do muco e participam principalmente como um fator protetor nos tecidos epiteliais. Também foi proposta a sua participação na renovação e diferenciação do epitélio,

modulação da adesão e sinalização celular. Os genes MUC podem ser classificados em duas famílias principais: MUCs ligados a membrana (MUC1, MUC3, MUC4, MUC11 e MUC12) e MUCs secretados (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 e MUC7) (Alos *et al.*, 2005; Handra-Luca *et al.*, 2005). No presente estudo LPLUNC1 mostrou positividade principalmente nos ductos tanto de ácinos mucosos quanto serosos de glândulas salivares normais, padrão de marcação semelhante ao observado com MUC1, MUC2, MUC4 e MUC5AC. O padrão de marcação para SPLUNC1 em ácinos mucosos é similar ao relatado para MUC5B e a positividade em ácinos serosos para SPLUNC2 lembra a marcação de MUC7 (Alos *et al.*, 2005).

No que diz respeito à expressão imunoistoquímica em CMEs, as proteínas MUC também apresentam padrões comparáveis com o PLUNC. Positividade nas células mucosas, principalmente nos casos de baixo grau, foi relatada para MUC2, MUC5AC, MUC5B e MUC6, podendo ser comparável com o padrão de expressão mostrado por SPLUNC1 e LPLUNC1. No entanto, essas proteínas PLUNC apresentaram uma expressão variável em todos os tipos celulares. MUC1 e MUC4, da mesma forma, apresentaram positividade em células epidermóides, intermediárias, mucosas e claras, mas essa expressão é associada com o grau histológico, ou seja, MUC1 teve uma maior expressão em casos de alto grau, enquanto MUC4 teve uma maior expressão em casos de baixo grau (Alos *et al.*, 2005; Handra-Luca *et al.*, 2005). Devido a esta diferença na expressão associada ao grau do tumor para MUC1 e MUC4, Handra-Luca *et al.* (2005) relataram que a expressão de MUC1 e MUC4 é observada em células intermediárias, claras e epidermóides, mostrando que as células mucosas seriam positivas para MUC2 e MUC5AC, proteínas que também seriam expressas nas células intermediárias. Alos *et al.* (2005) relataram que a transformação maligna dos CMEs de glândulas salivares é associada com mudanças nos padrões de expressão para MUC e pode ser usada com propósitos diagnósticos. Essa diferença na positividade associada ao grau de malignidade do tumor também é observada para SPLUNC1 e LPLUNC1, sendo estas proteínas mais expressas no casos de baixo grau

quando comparados com os casos de alto grau. Essa diferença não foi observada entre glândulas salivares maiores e menores (Handra-Luca *et al.*, 2005).

LPLUNC2 apresentou uma escassa marcação no tumor e se considera que não tem importância no diagnóstico de CME. A marcação imunoistoquímica de LPLUNC2 não foi previamente estudada em tumores de glândulas salivares e na literatura são relatados escassos estudos avaliando a expressão desta proteína em tecidos normais ou outros tumores. A função do LPLUNC2 não está esclarecida, mas se acredita que tenha um papel na resposta imune inata, tal como os outros membros da família. Este estudo mostrou que LPLUNC2 apresenta uma marcação diferente das outras proteínas da família PLUNC, pois marcou seletivamente células distribuídas em um padrão disperso tanto em áreas intratumorais como peritumorais em 83,33% dos tumores estudados. As células marcadas apresentaram um citoplasma granular, semelhantes a mastócitos, tanto degranulados como não degranulados. Não foi descrito na literatura que o mastócito seja uma célula produtora de PLUNC e futuras pesquisas devem ser realizadas para confirmar e aprofundar estes achados.

Devido à marcação específica de LPLUNC2 nas células semelhantes a mastócitos, que não foi observada nas outras proteínas da família PLUNC estudadas, é sugerido que as proteínas PLUNC poderiam participar da resposta imune frente a diferentes estímulos, sugerindo que o LPLUNC2 desempenharia uma função na resposta imune contra as células neoplásicas. Estudos que avaliem a identificação de LPLUNC2 em outros tecidos e tumores são necessários para a confirmação destes achados.

Os mastócitos podem apresentar uma morfologia variada, pois podem estar degranulados ou não, apresentam um núcleo redondo e um citoplasma granular que são suas principais características morfológicas. As células marcadas com LPLUNC2 apresentaram uma morfologia compatível com a dos mastócitos, sugerindo que estão presentes no CME (Roitt *et al.*, 2000; Abbas *et al.*, 2002; Pejler *et al.*, 2010). Interessantemente, a literatura não relata a presença de mastócitos como uma característica dos CMEs de glândulas salivares, relata

apenas a presença dessas células em outros tumores de glândulas salivares como o tumor de Warthin (Bottles *et al.*, 1985) e outras desordens que afetam as glândulas salivares como a síndrome de Sjögren (Kottinen *et al.*, 2000). Alguns autores consideram os mastócitos como parte integral da aparência citomorfológica típica do tumor de Warthin (Flezar & Pogacnik, 2002), sendo que quando são achados mastócitos na citologia aspirativa em um tumor de glândulas salivares, este é sugestivo de tumor de Warthin (Kobayashi *et al.*, 1999).

A importância do componente estromal no desenvolvimento e progressão do câncer tem sido frequentemente relatado na literatura, com foco principalmente no estudo das populações celulares de miofibroblastos e mastócitos (Mueller & Fusening, 2004; Carlini *et al.*, 2010). Já foi relatado que os produtos dos mastócitos podem induzir a diferenciação miofibroblástica (Gailit *et al.*, 2001) e que interações entre o estroma e epitélio seriam eventos precoces da carcinogênese, participando da regulação, migração, morfogênese, proliferação e diferenciação de muitos tipos celulares especializados (Conti *et al.*, 2007). A maioria dos tumores contém células inflamatórias, incluindo mastócitos, que teriam efeitos potenciais no aumento e no crescimento do tumor ou contribuindo para a resistência do hospedeiro contra ao tumor (Theoharides & Conti, 2004; Conti *et al.*, 2007; Kafelnikoff & Galli, 2008). Os mastócitos, por meio de seus mediadores, poderiam participar da diferenciação celular e, eventualmente, do desenvolvimento do CME.

São escassos os relatos da presença de proteínas da família PLUNC em células de linhagem hematopoiética, sendo que na literatura só existe um relato da presença de PLUNC em grânulos específicos de neutrófilos, célula importante que participa na resposta imune inata do hospedeiro (Bartlett *et al.*, 2008). Sugere-se que essas proteínas podem ser liberadas quando os neutrófilos são estimulados, entretanto, a verdadeira função do PLUNC nos neutrófilos não está esclarecida. Alguns mediadores liberados pelos mastócitos são mostrados como críticos no recrutamento dos neutrófilos nos tecidos inflamados (Mercer-Jones *et al.*, 1999; Malaviya e Abraham, 2000; Heib *et al.*, 2008), sugerindo que nos sítios de

inflamação aguda pode ocorrer uma comunicação bidirecional entre mastócitos e neutrófilos (Befus *et al.*, 1999). A presença de PLUNC tanto nos neutrófilos quanto nos mastócitos reforça ainda mais as teorias que outorgam um papel das proteínas da família PLUNC na defesa inata do hospedeiro.

A detecção de LPLUNC2 pode significar uma nova linha de pesquisa com respeito à participação dos mastócitos na resposta imune inata, e especificamente no papel que essas células desempenhariam na defesa do hospedeiro contra as células neoplásicas. Não se sabe se esta proteína cumpre alguma função na defesa ou no desenvolvimento do CME. Outra possibilidade é a de que se trate de uma proteína que esteja presente constitutivamente no citoplasma de alguns mastócitos, mas que não tenha nenhuma participação no desenvolvimento do tumor ou proteção contra o CME. É provável que o LPLUNC2 seja encontrado só em alguns mastócitos das vias aéreas superiores e glândulas salivares, onde o PLUNC é normalmente encontrado. Dessa forma, estudos posteriores que avaliem a marcação de LPLUNC2 em outros tecidos e tumores são necessários para dar respostas a estas dúvidas.

Os mastócitos são pouco evidentes nas lâminas histológicas a menos que sejam identificados por imunoistoquímica (triptase, quimase, CD117, mast cell) ou técnicas de histoquímica como o azul de toluidina. Assim, este presente estudo sugere que LPLUNC2 poderia ser considerado um novo marcador de mastócitos nas glândulas salivares. Futuros estudos são necessários para confirmar essa utilidade do LPLUNC2.

O presente estudo analisou a expressão das proteínas da família PLUNC em CMEs de glândulas salivares com o intuito de observar sua utilidade diagnóstica. As proteínas SPLUNC1 e LPLUNC1 mostraram uma ampla expressão nos casos avaliados, sendo que as outras proteínas estudadas (SPLUNC2A, SPLUNC2B e LPLUNC2) mostraram marcação escassa ou nula nos CMEs. Em linhas gerais, foi observado que a utilidade diagnóstica das proteínas desta família é semelhante à promovida pelas técnicas histoquímicas de PAS e mucicarmin. Entretanto, a expressão de SPLUNC1 e LPLUNC1 em células

intermediárias e células epidermóides (que são negativas para PAS e mucicarmin) poderiam ser consideradas como um importante auxiliar diagnóstico para os casos de CME alto grau. A constatação da expressão de LPLUNC2 em mastócitos representa um resultado potencialmente importante para a compreensão do papel das proteínas PLUNC na resposta imune inata, e também para a problemática da interação estroma-tumor na defesa do hospedeiro contra as células malignas.

7-CONCLUSÕES:

1. A intensidade e a quantidade da marcação de SPLUNC1 e LPLUNC1 foram inversamente proporcionais ao grau de malignidade do tumor.
2. SPLUNC1 e LPLUNC1 apresentaram um padrão de marcação no CME semelhante às técnicas histoquímicas de PAS e mucicarmin.
3. SPLUNC1 e LPLUNC1 podem ser marcadores úteis no diagnóstico de CME de alto grau.
4. A expressão das proteínas PLUNC apresenta seletividade entre ácinos mucosos, ácinos serosos e ductos salivares nos tecidos das glândulas salivares normais.
5. Não foi descrito na literatura que o mastócito seja uma célula produtora de PLUNC e futuras pesquisas devem ser realizadas para confirmar e aprofundar estes achados.

REFERÊNCIAS*

1. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Imunologia celular e molecular. 4ta Edição. Revinter. 2002. Rio de Janeiro.
2. Alves DBM, Vargas PA. Estudo da expressão imunoistoquímica de SPLUNC1, SPLUNC2 e LPLUNC1 nas glândulas salivares, língua e palatos de fetos humanos. [Tese para obtenção do título de Mestre em Estomatopatologia], FOP-UNICAMP, Piracicaba-SP, Brasil. Fevereiro, 2010.
3. Amerongen AV, Veerman EC. Saliva-the defender of the oral cavity. Oral Dis. 2002; 8(1):12-22.
4. Andraut JB, Gaillard I, Giorgi D, Rouquier S. Expansion of the BPI family by duplication on human chromosome 20: characterization of the RY gene cluster in 20q11.21 encoding olfactory transporters/antimicrobial-like peptides. Genomics. 2003; 82(2):172-84.
5. Auclair PL, Goode RK, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of intraoral salivary glands. Evaluation and application of grading criteria in 143 cases. Cancer. 1992; 69(8):2021-30.
6. Azevedo RS, de Almeida OP, Kowalski LP, Pires FR. Comparative cytokeratin expression in the different cell types of salivary gland mucoepidermoid carcinoma. Head Neck Pathol. 2008 Dec;2(4):257-64.
7. Ball WD, Mirels L, Hand AR. Psp and Smgb: a model for developmental and functional regulation in the rat major salivary glands. Biochem Soc Trans. 2003; 31:777-80.
8. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. (Eds.): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.

*De acordo com a Norma da UNICAMP/FOP, baseada no modelo Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

9. Bartlett JA, Hicks BJ, Schlomann JM, Ramachandran S, Nauseef WM, McCray PB Jr. PLUNC is a secreted product of neutrophil granules. *J Leukoc Biol.* 2008; 83(5): 1201-6
10. Batsakis JG. Staging of salivary gland neoplasms: role of histopathologic and molecular factors. *Am J Surg.* 1994; 168(5):386-90.
11. Batsakis JG, Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasms: I. Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1990; 99:835-8.
12. Beamer LJ. Structure of human BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) and implications for related proteins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:791-4.
13. Befus AD, Mowat C, Gilchrist M, Hu J, Solomon S, Bateman A. Neutrophil defensins induce histamine secretion from mast cells: mechanisms of action. *J Immunol.* 1999; 163, 947–953.
14. Benlloch S, Galbis-Caravajal JM, Alenda C, Peiró FM, Sanchez-Ronco M, Rodríguez-Paniagua JM *et al.* Expression of molecular markers in mediastinal nodes from resected stage I non-small-cell lung cancer (NSCLC): prognostic impact and potential role as markers of occult micrometastases. *Ann Oncol.* 2009; 20(1):91-7.
15. Bingle CD, Bingle L. Characterization of the human PLUNC gene, a gene product with an upper airways and nasopharyngeal restricted expression pattern. *Biochim Biophys Acta.* 2000; 1493(3): 363-7.
16. Bingle CD, Craven J. PLUNC: A novel family of candidate host defense proteins expressed in the upper airways and nasopharynx. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(8): 932-943.
17. Bingle CD, Craven CJ. Meet the relatives: a family of BPI- and LBP-related proteins. *Trends Immunol.* 2004; 25(2):53-5.
18. Bingle CD, Gorr SU. Host defense in oral and airway epithelia: chromosome 20 contributes a new protein family. *Int J Biochem Cell Biol.* 2004; 36(11):2144-52.

19. Bingle CD, LeClair EE, Havard S, Bingle L, Gillingham P, Craven CJ. Phylogenetic and evolutionary analysis of the PLUNC gene family. *Protein Sci.* 2004; 13(2):422-30.
20. Bingle L, Cross SS, High AS, Wallace WA, Devine DA, Havard S *et al.* SPLUNC1 (PLUNC) is expressed in glandular tissues of the respiratory tract and in lung tumours with a glandular phenotype. *J Pathol.* 2005; 205(4): 491-7.
21. Bingle L, Barnes FA, Cross SS, Rass ID, Wallace WA, Campos MA *et al.* Differential epithelial expression of the putative innate immune molecule SPLUNC1 in cystic fibrosis. *Respir Res.* 2007; 8: 79.
22. Bingle L, Barnes FA, Lunn H, Musa M, Webster S, Douglas CW *et al.* Characterisation and expression of SPLUNC2, the human orthologue of rodent parotid secretory protein. *Histochem Cell Biol.* 2009; 132(3):339-49.
23. Bottles K, Lwhagen T, Miller TR. Mast cells in the aspiration cytology differential diagnosis of adenolymphoma. *Acta Cytol* 1985; 29: 513–5.
24. Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, Hille JJ, Wang B, Fahmy A *et al.* Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. *Am J Surg Pathol.* 2001; 25(7):835-45.
25. Brannon RB, Willard CC. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of parotid gland origin. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96:727-33.
26. Camelo-Piragua SI, Habib C, Kanumuri P, Lago CE, Mason HS, Otis CN. Mucoepidermoid carcinoma of the breast shares cytogenetic abnormality with mucoepidermoid carcinoma of the salivary gland: a case report with molecular analysis and review of the literature. *Hum Pathol.* 2009 Jun; 40(6):887-92.
27. Campos MA, Abreu AR, Nlend MC, Cobas MA, Conner GE, Whitney PL. Purification and characterization of PLUNC from human tracheobronchial secretions. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2004; 30(2): 184-92.

28. Carlini MJ, Dalurzo MC, Lastiri JM, Smith DE, Vasallo BC, Puricelli LI *et al.* Mast cell phenotypes and microvessels in non-small cell lung cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol.* 2010; 41(5): 697-705.
29. Chenevert J, Barnes LE, Chiosea SI. Mucoepidermoid carcinoma: a five-decade journey. *Virchows Arch.* 2011; 458:133–140.
30. Cheng M, Chen Y, Yu X, Tian Z, Wei H. Diagnostic utility of LUNX mRNA in peripheral blood and pleural fluid in patients with primary non-small cell lung cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8:156.
31. Chu HW, Thaikottathil J, Rino JG, Zhang G, Wu Q, Moss T *et al.* Function and regulation of SPLUNC1 protein in *Mycoplasma* infection and allergic inflammation. *J Immunol.* 2007; 179(6): 3995-4002.
32. Conti P, Castellani ML, Kempuraj D, Salini V, Vecchiet J, Tetè S *et al.* Role of mast cells in tumor growth. *Ann Clin Lab Sci.* 2007; 37(4):315-22.
33. Corcione L, Giordano G, Gnetti L, Multinu A, Ferrari S. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of a submandibular gland: a case report and review of the literature. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 36(6):560-3.
34. Demasi AP, Costa AF, Altemani A, Furuse C, Araújo NS, Araújo VC. Glucose transporter protein 1 expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: correlation with grade of malignancy. *Int J Exp Pathol.* 2010; 91(2):107-13.
35. Di, Y.-P., Harper, R., Zhao, Y., Pahlavan, N., Finkbeiner, W., Wu, R. Molecular cloning and characterization of spurt, a human novel gene that is retinoic acid-inducible and encodes a secretory protein specific in upper respiratory tracts. *Journal of Biological Chemistry.* 2003, 278(2): 1165–1173.
36. Dincer N, Tezel GG, Sungur A, Himmetoglu C, Huebner K, Güler G. Study of FHIT and WWOX expression in mucoepidermoid carcinoma and adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Oral Oncol.* 2010; 46(3):195-9.
37. Dirix P, Nuyts S, Van den Bogaert W. Radiation-induced xerostomia in patients with head and neck cancer: a literature review. *Cancer.* 2006; 107(11):2525-34.

38. Egland KA, Vincent JJ, Strausberg R, Lee B, Pastan I. Discovery of the breast cancer gene BASE using a molecular approach to enrich for genes encoding membrane and secreted proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(3):1099-104.
39. Eversole LR. Mucoepidermoid carcinoma: review of 815 reported cases. *J Oral Surg*. 1970; 28(7):490-4.
40. Eveson JW, Cawson RA. Salivary gland tumours. A review of 2410 cases with particular reference to histological types, site, age and sex distribution. *J Pathol*. 1985; 146(1):51-8.
41. Flezar M, Pogacnik A. Warthin's tumour: unusual vs. common morphological findings in fine needle aspiration biopsies. *Cytopathology*. 2002; 13(4):232-41.
42. Gailit J, Marchese MJ, Kew RR, Gruber BL. The differentiation and function of myofibroblasts is regulated by mast cell mediators. *J Invest Dermatol*. 2001; 117(5):1113-9.
43. Geetha C, Venkatesh SG, Dunn BH, Gorr SU. Expression and anti-bacterial activity of human parotid secretory protein (PSP). *Biochem Soc Trans*. 2003; 31:815-8.
44. Geetha C, Venkatesh SG, Bingle L, Bingle CD, Gorr SU. Design and validation of anti-inflammatory peptides from human parotid secretory protein. *J Dent Res*. 2005; 84(2): 149-153.
45. Ghafouri B, Stahlbom B, Tagesson C, Lindahl M. Newly identified proteins in human nasal lavage fluid from non-smokers and smokers using two-dimensional gel electrophoresis and peptide mass fingerprinting. *Proteomics*. 2002; 2(1):112-20.
46. Ghafouri B, Kihlström E, Ståhlbom B, Tagesson C, Lindahl M. PLUNC (palate, lung and nasal epithelial clone) proteins in human nasal lavage fluid. *Biochem Soc Trans*. 2003; 31: 810-4.
47. González-Arriagada WA, Santos-Silva AR, Ito FA, Vargas PA, Lopes MA. Calcifications may be a frequent finding in mucoepidermoid carcinomas of

- the salivary glands: A clinicopathologic study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2010; accepted for publication Oct 13, 2010.
48. Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. *Cancer*. 1998; 82(7):1217-24.
 49. Gorr SU, Sotsky JB, Shelar AP, Demuth DR. Design of bacteria-agglutinating peptides derived from parotid secretory protein, a member of the bactericidal/permeability increasing-like protein family. *Peptides*. 2008; 29(12): 2118-27.
 50. Gupta N, Asp E, Levan G, Mirels L. Structure and chromosomal localization of the rat salivary Psp and Smgb genes. *Gene*. 2000; 243(1-2):11-8.
 51. Guzzo M, Andreola S, Sirizzotti G, Cantu G. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: clinicopathologic review of 108 patients treated at the National Cancer Institute of Milan. *Ann Surg Oncol*. 2002 ;9(7):688-95.
 52. He Y, Zhou G, Zhai Y, Dong X, Lv L, He F *et al*. Association of PLUNC gene polymorphisms with susceptibility to nasopharyngeal carcinoma in a Chinese population. *J Med Genet*. 2005; 42(2): 172-6.
 53. Heib V, Becker M, Taube C, Stassen M. Advances in the understanding of mast cell function. *Br J Haematol*. 2008; 142(5):683-94.
 54. Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. *Oral Oncol*. 2000; 36(5):454-60.
 55. Hocwald E, Korkmaz H, Yoo GH, Adsay V, Shibuya TY, Abrams J *et al*. Prognostic factors in major salivary gland cancer. *Laryngoscope*. 2001; 111(8):1434-9.
 56. Hou J, Yashiro K, Okazaki Y, Saijoh Y, Hayashizaki Y, Hamada H. Identification of a novel left-right asymmetrically expressed gene in the mouse belonging to the BPI/PLUNC superfamily. *Dev Dyn*. 2004; 229(2):373-9.

57. Ide F, Obara K, Enatsu K, Mishima K, Saito I. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the oral cavity. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(3):187-9.
58. Iwao K, Watanabe T, Fujiwara Y, Takami K, Kodama K, Higashiyama M *et al*. Isolation of a novel human lung-specific gene, LUNX, a potential molecular marker for detection of micrometastasis in non-small-cell lung cancer. *Int J Cancer*. 2001; 91(4):433-7.
59. Jahan-Parwar B, Huberman RM, Donovan DT, Schwartz MR, Ostrowski ML. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Am J Surg Pathol* 1999; 23:523-9.
60. Jonsson R, Moen K, Vestrheim D, Szodoray P. Current issues in Sjögren's syndrome. *Oral Dis*. 2002; 8(3):130-40.
61. Kafelnikov J, Galli SJ. New developments in mast cell biology. *Nat Immunol*. 2008; 9(11): 1215–1223.
62. Kim CH, Kim K, Kim HJ, Kim JK, Lee JG, Yoon JH. Expression and regulation of PLUNC in human nasal epithelium. *Acta Otolaryngol*. 2006; 126(10): 1073-8.
63. Kim B, Lee HJ, Choi HY, Shin Y, Nam S, Seo G *et al*. Clinical validity of the lung cancer biomarkers identified by bioinformatics analysis of public expression data. *Cancer Res*. 2007; 67(15):7431-8.
64. Kobayashi TK, Ueda M, Nishino T *et al*. Association of mast cells with Warthin's tumour in fine needle aspirates of the salivary gland. *Acta Cytol* 1999; 43: 1052–8.
65. Kokemueller H, Brueggemann N, Swennen G, Eckardt A. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands--clinical review of 42 cases. *Oral Oncol*. 2005; 41(1):3-10.
66. Kolokythas A, Connor S, Kingsoo D, Fernandes RP, Ord RA. Low-grade mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary glands with cervical metastasis: report of 2 cases and review of the literature. *J Oral Maxillofac Surg*. 2010; 68(6):1396-9.

67. Kwon H, Lim W, Choi Y, Nam J, Han C, Kim J *et al.* High-grade oncocytic mucoepidermoid carcinoma of the minor salivary gland origin: a case report with immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 109(6):e72-7.
68. Larsen K, Madsen LB, Bendixen C. Porcine SPLUNC1: molecular cloning, characterization and expression analysis. *Biochim Biophys Acta.* 2005; 1727(3):220-6.
69. LeClair EE, Nguyen L, Bingle L, MacGowan A, Singleton V, Ward SJ *et al.* Genomic organization of the mouse PLUNC gene and expression in the developing airways and thymus. *Biochem Biophys Res Commun.* 2001; 284(3): 792-797.
70. LeClair EE. Four BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like genes expressed in the mouse nasal, oral, airway and digestive epithelia. *Biochem Soc Trans.* 2003a; 31(Pt 4): 801-805.
71. LeClair EE. Four reasons to consider a novel class of innate immune molecules in the oral epithelium. *J Dent Res.* 2003b; 82(12):944-50.
72. LeClair EE, Nomellini V, Bahena M, Singleton V, Bingle L, Craven CJ *et al.* Cloning and expression of a mouse member of the PLUNC protein family exclusively expressed in tongue epithelium. *Genomics.* 2004; 83(4):658-66.
73. Lemaire F, Millon R, Young J, Cromer A, Wasylyk C, Schultz I *et al.* Differential expression profiling of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC). *British Journal of Cancer.* 2003, 89(10):1940–1949.
74. Levy O. A neutrophil-derived anti-infective molecule: bactericidal/permeability-increasing protein. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(11):2925-31.
75. Levy O, Canny G, Serhan CN, Colgan SP. Expression of BPI (bactericidal/permeability-increasing protein) in human mucosal epithelia. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:795-800.

76. Li Y, Dong X, Yin Y, Su Y, Xu Q, Zhang Y *et al.* BJ-TSA-9, a novel human tumor-specific gene, has potential as a biomarker of lung cancer. *Neoplasia*. 2005; 7(12):1073-80.
77. Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol*. 2006; 13(6):293-307.
78. Malaviya R, Abraham SN. Role of mast cell leukotrienes in neutrophil recruitment and bacterial clearance in infectious peritonitis. *J Leuk Biol*. 2000; 67, 841–846.
79. Martin TR. Recognition of bacterial endotoxin in the lungs. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2000; 23(2):128-32.
80. Mercer-Jones MA, Shrotri MS, Heinzelmann M, Peyton JC, Cheadle WG. Regulation of early peritoneal neutrophil migration by macrophage inflammatory protein-2 and mast cells in experimental peritonitis. *J Leuk Biol*. 1999; 65, 249–255.
81. Mitas M, Hoover L, Silvestri G, Reed C, Green M, Turrisi AT *et al.* Lunx is a superior molecular marker for detection of non-small cell lung cancer in peripheral blood. *J Mol Diagn*. 2003; 5(4):237-42.
82. Miyabe S, Okabe M, Nagatsuka H, Hasegawa Y, Inagaki A, Ijichi K *et al.* Prognostic significance of p27Kip1, Ki-67, and CRTC1-MAML2 fusion transcript in mucoepidermoid carcinoma: a molecular and clinicopathologic study of 101 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2009; 67(7):1432-41.
83. Mueller MM, Fusenig NE. Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4(11):839-49.
84. Pejler G, Rönnberg E, Waern I, Wernersson S. Mast cell proteases: multifaceted regulators of inflammatory disease. *Blood*. 2010; 115(24): 4981-90.
85. Ramachandran P, Boonthung P, Xie Y, Sondej M, Wong DT, Loo JA. Identification of N-linked glycoproteins in human saliva by glycoprotein capture and mass spectrometry. *J Proteome Res*. 2006; 5(6): 1493-503.

86. Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, Stavrianos SD, Faratzis G, Lagogiannis GA *et al.* Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. Review of the literature and clinicopathological analysis of 18 patients. *Oral Oncol.* 2007; 43(2):130-6.
87. Raut D, Khedkar S. Primary intraosseous mucoepidermoid carcinoma of the maxilla: a case report and review of literature. *Dentomaxillofac Radiol.* 2009; 38(3):163-8.
88. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Inmunologia. 5ª Edição. Espanhol.* Editorial Harcourt. 2000.
89. Schapher M, Wendler O, Gröschl M, Schäfer R, Iro H, Zenk J. Salivary leptin as a candidate diagnostic marker in salivary gland tumors. *Clin Chem.* 2009; 55(5):914-22.
90. Sentani K, Oue N, Sakamoto N, Arihiro K, Aoyagi K, Sasaki H *et al.* Gene expression profiling with microarray and SAGE identifies PLUNC as a marker for hepatoid adenocarcinoma of the stomach. *Mod Pathol.* 2008; 21(4):464-75.
91. Shiba H, Venkatesh SG, Gorr SU, Barbieri G, Kurihara H, Kinane DF. Parotid secretory protein is expressed and inducible in human gingival keratinocytes. *J Periodontal Res.* 2005; 40(2): 153-7.
92. Shigeishi H, Ohta K, Hiraoka M, Fujimoto S, Minami M, Higashikawa K *et al.* Expression of TPX2 in salivary gland carcinomas. *Oncol Rep.* 2009; 21(2):341-4.
93. Da Silva AA, Bingle L, Speight PM, Bingle CD, Mauad T, Da Silva LF *et al.* PLUNC protein expression in major salivary glands of HIV-infected patients. *Oral Dis.* 2010. doi: 10.1111/j.1601-0825.2010.01733.x. [Epub ahead of print]
94. Speight PM, Barrett AW. Salivary gland tumours. *Oral Dis.* 2002; 8(5):229-40.
95. Sung YK, Moon C, Yoo JY, Moon C, Pearse D, Pevsner J *et al.* PLUNC, a member of the secretory gland protein family, is up-regulated in nasal

- respiratory epithelium after olfactory bulbectomy. *J Biol Chem.* 2002; 277(15): 12762-12769.
96. Theoharides TC, Conti P. Mast cells: the Jekyll and Hyde of tumor growth. *Trends Immunol.* 2004; 25(5):235-41.
 97. Triantafyllidou K, Dimitrakopoulos J, Iordanidis F, Koufogiannis D. Mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands: a clinical study of 16 cases and review of the literature. *Oral Dis.* 2006; 12(4):364-70.
 98. Vargas PA, Gerhard R, Araújo Filho VJ, de Castro IV. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo.* 2002; 57(6):271-6.
 99. Vargas PA, Speight PM, Bingle CD, Barrett AW, Bingle L. Expression of PLUNC family members in benign and malignant salivary gland tumours. *Oral Dis.* 2008; 14(7): 613-9.
 100. Veras EF, Sturgis E, Luna MA. Sclerosing mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. *Ann Diagn Pathol.* 2007; 11(6):407-12.
 101. Vitorino R, Lobo MJ, Ferrer-Correia AJ, Dubin JR, Tomer KB, Domingues PM *et al.* Identification of human whole saliva protein components using proteomics. *Proteomics.* 2004; 4(4): 1109-15.
 102. Weinreb I, Seethala RR, Perez-Ordoñez B, Chetty R, Hoschar AP, Hunt JL. Oncocytic mucoepidermoid carcinoma: clinicopathologic description in a series of 12 cases. *Am J Surg Pathol.* 2009; 33(3):409-16.
 103. Weiss J. Bactericidal/permeability-increasing protein (BPI) and lipopolysaccharide-binding protein (LBP): structure, function and regulation in host defense against Gram-negative bacteria. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31(4):785-90.
 104. Weston WM, LeClair EE, Trzyna W, McHugh KM, Nugent P, Lafferty CM *et al.* Differential display identification of plunc, a novel gene expressed in embryonic palate, nasal epithelium and adult lung. *J Biol Chem.* 1999; 274(19):13698-703.

105. Wheeler TT, Hood K, Oden K, McCracken J, Morris CA. Bovine parotid secretory protein: structure, expression and relatedness to other BPI (bactericidal/permeability-increasing protein)-like proteins. *Biochem Soc Trans.* 2003; 31:781-4.
106. Wu Y, Shu R, Luo LJ, Ge LH, Xie YF. Initial comparison of proteomic profiles of whole unstimulated saliva obtained from generalized aggressive periodontitis patients and healthy control subjects. *J Periodontal Res.* 2009; 44(5): 636-44.
107. Yakirevich E, Sabo E, Klorin G, Alos L, Cardesa A *et al.* Primary mucin-producing tumours of the salivary glands: a clinicopathological and morphometric study. *Histopathology* 2010; 57, 395–409
108. Yang S, Guo LJ, Tang XF, Tan K, Gong RG, Li A *et al.* The alteration of Id-1 and TSP-1 expression in mucoepidermoid carcinoma associated with its clinical features and prognosis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2010; 39(1):29-35.
109. Yasui W, Oue N, Sentani K, Sakamoto N, Motoshita J. Transcriptome dissection of gastric cancer: identification of novel diagnostic and therapeutic targets from pathology specimens. *Pathol Int.* 2009; 59(3):121-36.
110. Zhang B, Nie X, Xiao B, Xiang J, Shen S, Gong J *et al.* Identification of tissue-specific genes in nasopharyngeal epithelial tissue and differentially expressed genes in nasopharyngeal carcinoma by suppression subtractive hybridization and cDNA microarray. *Genes Chromosomes and Cancer.* 2003, 38(1): 80–90.
111. Zhou HD, Fan SQ, Zhao J, Huang DH, Zhou M, Liu HY *et al.* Tissue distribution of the secretory protein, SPLUNC1, in the human fetus. *Histochem Cell Biol.* 2006a; 125(3):315-24.
112. Zhou HD, Li GY, Yang YX, Li XL, Sheng SR, Zhang WL *et al.* Intracellular co-localization of SPLUNC1 protein with nanobacteria in nasopharyngeal

- carcinoma epithelia HNE1 cells depended on the bactericidal permeability increasing protein domain. *Mol Immunol.* 2006b; 43(11):1864-71.
113. Zhou HD, Li XL, Li GY, Zhou M, Liu HY, Yang YX *et al.* Effect of SPLUNC1 protein on the *Pseudomonas Aeruginosa* and Epstein-Barr virus. *Mol Cell Biochem.* 2008; 309(1-2):191-7.

ANEXO



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa **"Estudo da expressão imunoistoquímica de proteínas da família plunc em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares"**, protocolo nº 047/2010, dos pesquisadores Marcio Ajudarte Lopes e Wilfredo Alejandro González Arriagada, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 07/07/2010.

The Ethics Committee in Research of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that the project **"Study of immunohistochemical expression of family plunc proteins in mucoepidermoid carcinomas of salivary glands"**, register number 047/2010, of Marcio Ajudarte Lopes and Wilfredo Alejandro González Arriagada, comply with the recommendations of the National Health Council - Ministry of Health of Brazil for research in human subjects and therefore was approved by this committee at 07/07/2010.

Prof. Dr. Pablo Agustin Vargas
Secretário
CEP/FOP/UNICAMP

Prof. Dr. Jacks Jorge Junior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.