



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA-DIAGNÓSTICO BUCAL

Ana Guadalupe Gama Cuellar

**Imunoexpressão de marcadores imunológicos e apoptóticos em neoplasias de
glândulas salivares: relevância clínico-patológica**

Florianópolis

2023

Ana Guadalupe Gama Cuellar

Imunoexpressão de marcadores imunológicos e apoptóticos em neoplasias de glândulas salivares: relevância clínico-patológica

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito para a obtenção do título de Doutora em Odontologia.

Orientador: Prof. Dr. Rogério Gondak

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Cuellar, Ana Guadalupe

Imunoexpressão de marcadores imunológicos e apoptóticos
em neoplasias de glândulas salivares: relevância clínico
patológica / Ana Guadalupe Cuellar ; orientador, Rogério
Gondak, 2023.

111 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós
Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Neoplasias de glândulas salivares. 3.
Adenomas pleomorficos. 4. imuno-histoquímica. 5.
Imunoterapia. I. Gondak, Rogério. II. Universidade Federal
de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
III. Título.

Ana Guadalupe Gama Cuellar

Imunoexpressão de marcadores imunológicos e apoptóticos em neoplasias de glândulas salivares: relevância clínico-patológica

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:



Documento assinado digitalmente

Rogério de Oliveira Gondak

Data: 24/02/2023 14:59:56-0300

CPF: ***.521.929-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof. Dr. Rogério Gondak

Orientador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof.^a Dr.^a Elena Riet Correa Rivero

Avaliadora

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior

Avaliador

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Victor Angelo Martins Montalli

Avaliador

Faculdade São Leopoldo Mandic

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Odontologia na área de Diagnóstico Bucal.



Documento assinado digitalmente

Mariane Cardoso

Data: 24/02/2023 18:14:04-0300

CPF: ***.647.159-**

Verifique as assinaturas em <https://v.ufsc.br>

Prof.^a Dr.^a Mariane Cardoso Carvalho
Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Florianópolis, 2023

*Aos meus pais, Felipa e Eustolio e meus irmãos, Pedro e Erick.
Obrigada por me amar e me encorajar a ser melhor a cada dia.*

AGRADECIMENTOS

Estudar no exterior foi uma experiência única com a qual evoluí muito em diversas áreas da vida e não somente a nível profissional. Aprendi uma língua nova, a me cuidar e virar sozinha, uma cultura, formas de pensamento e de enxergar a vida diferentes. Aprendi a precisar mais de pessoas e menos de coisas, a escutar mais, a ser mais tolerante e receptiva. Aprendi também a amar a comida brasileira com a suas variedades e misturas com culinárias como a portuguesa, italiana, alemã e africana. E que posso dizer da música, eu adoro um samba, um sertanejo e dançar um forró. Com certeza posso dizer que não estou indo embora do Brasil pois levarei uma parte dele comigo.

Confesso que me perdi na metade do caminho, acredito que isso aconteça ainda que de diversas formas para alguns de nós, especialmente para quem faz doutorado, ainda não saberia dizer o que é: cansaço, desanimo, ficar muitas horas na frente do notebook às vezes à toa porque você não consegue produzir, mas quaisquer que for o motivo, parece que faz parte do processo, daquelas coisas que muitos sabem mas ninguém conta, não porque as pessoas não querem que você saiba mas sim porque acontece de forma diferente para cada um de nós. E ainda para mim teve a pandemia de COVID-19. Sem as pessoas que se importam comigo eu provavelmente não teria chegado até este momento. Ainda tem muita coisa que não aprendi, mas sou ciente das minhas deficiências e estou disposta a melhorar, acredito que o ser humano está constantemente se aprimorando e é um processo que não acaba.

Quero começar agradecendo aos meus pais e meus irmãos que desde o começo me apoiaram para vir ao Brasil e sempre tiveram palavras de consolo nos momentos difíceis, vocês são muito importantes e meu maior desejo é que se sintam orgulhosos de mim.

Ao meu namorado, que chegou na minha vida inesperadamente e que veio para me incentivar a dar os últimos passos do doutorado.

Ao professor Rogério, que sem me conhecer aceitou me orientar e que teve a paciência e a assertividade de me guiar durante o mestrado e doutorado. Muitíssimo obrigada pelos seus ensinamentos que levarei para o resto da vida e a carreira acadêmica.

Ao senhor João e a Dona Léa que foram as pessoas que me receberam quando cheguei em Florianópolis em 2016 e que me deram moradia durante dois anos e um espaço no seu coração.

As minhas queridas amigas Angélica, Manu, Fernanda, Jussara, Carol, Rúbia e Georgia que passaram junto comigo pela pós-graduação, com quem compartilhei muitos momentos especiais e que me deram muito carinho e um lugar nas suas vidas, não tenho palavras suficientes para expressar quanto amo vocês e sempre estou torcendo pelo seu sucesso e sua felicidade.

A Maninha que me acolheu alguns natais e que me abriu os olhos para o mundo do ensino e me apresentou autores como Rubem Alves. Você tem a capacidade para enxergar a pessoa e não só o aluno. Sempre aprendi muito com você, inclusive em conversas casuais.

Ao professor Felipe Daltoé que me convidou pela primeira vez para participar de uma banca de TCC, confesso que fiquei muito nervosa, mas agradeço demais por essa oportunidade. Obrigada também por compartilhar comigo seus conhecimentos e experiências.

Aos professores do departamento de Diagnóstico Bucal: A professora Elena, que quando conheci ela falou comigo na minha língua, mas também falou que seria a última vez que falaria espanhol comigo. Confesso que fiquei um pouco chateada, mas com o tempo percebi que ela tinha razão, precisava aprender português rápido.

A professora Liliane com quem tomei minha primeira aula e quem se preocupou o tempo todo com que eu estivesse entendendo. Também me ajudou para conseguir fazer terapia na fonoaudiologia para reproduzir melhor alguns sons do português, principalmente o “r” glótico, “v” e “z”.

Ao professor Filipe Modolo que quando fomos apresentados falou que precisaria muitas vezes pedir para as pessoas falarem devagar!

Ao professor Filipe Daniel que me ajudou muito e me deu varias dicas para conseguir dar aulas sem ficar tão nervosa durante meu estágio de docência na sua disciplina.

Ao professor Rodrigo (*in memoriam*) a quem conheci por pouco tempo, mas com quem compartilhei momentos muito agradáveis e quem sempre tinha um sorriso e palavras amáveis.

À Gilmara, amiga e técnica do laboratório de Patologia Bucal, por ser sempre solícita e disposta a ajudar, e pelas nossas conversas que tornaram minhas jornadas de trabalho laboratorial mais leves.

Aos colegas da área de concentração em diagnóstico bucal com quem conversei bastante e aprendi muito, as horas de trabalho na sala 8 foram mais prazerosas graças a sua companhia.

Aos Professores que compõem minha banca de defesa por aceitarem participar, dedicando seu tempo para contribuir com o meu trabalho.

Aos pacientes, sem os quais essa pesquisa não seria possível assim como os pequenos avanços que contribuem a ciência.

A CAPES que financiou meus estudos no curso de doutorado.

Desejo que esse trabalho possa ser útil e contribua com um grau de areia na construção do conhecimento de quem o leia.

Sinto-me muito abençoada por esta oportunidade única e agora parto para os próximos episódios da minha vida levando no meu coração meu lindo Brasil brasileiro.

*"Nós não vemos o que vemos, nós vemos o que somos.
Só veem as belezas do mundo, aqueles que têm belezas dentro de si."
(Rubem Alves)*

RESUMO

As neoplasias de glândulas salivares (NGS) são neoplasias incomuns, caracterizadas por exibirem comportamentos clínico e histopatológico complexos, cuja compreensão tem sido amplamente explorada. O objetivo desta tese foi avaliar a expressão imuno-histoquímica (IHQ) dos marcadores imunológicos e de apoptose em adenomas pleomórficos (AP), neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) e tecido de glândula salivar com característica de normalidade como grupo controle (GC). Foram realizadas reações de IHQ contra os anticorpos anti- CD1a, CD83, HLA-DR, Ki-67, PD-L1, PD-L2, BCL-2 e BAX em 61 casos de AP, 43 casos de NMGS e 5 casos de GC. O grupo com NMGS apresentou menor densidade de células HLA-DR+ intratumorais do que o grupo com AP ($p = 0,001$). As NMGS metastáticas apresentaram menor quantificação de células dendríticas (CD) CD1a+ intratumoral do que as NMGS não metastáticas ($p = 0,001$). A proporção de células Ki-67-positivas foi significativamente maior em NMGS do que em AP ($p < 0,001$). No entanto, não foram encontradas diferenças nas CD CD83+ intra e peritumorais entre as NGS benignas e malignas. Uma baixa imunomarcagem de PD-L2 em NMGS foi associada a um menor risco de metástase à distância ($p = 0,018$). A expressão de BAX foi menor em NMGS do que AP ($p < 0,05$) e GC ($p = 0,03$). A expressão de BCL-2 também foi menor em NMGS em comparação com AP ($p = 0,02$). Esses resultados sugerem que a função imunoprotetora das CDs intratumorais está comprometida em NMGS. Também, marcadores de CDs assim como a proteína PD-L2 podem representar ferramentas úteis de previsão para metástases em neoplasias de glândulas salivares.

Palavras-chave: Neoplasias das Glândulas Salivares. Adenoma Pleomorfo. Células Dendríticas. Inibidores de Checkpoint Imunológico. Apoptose.

ABSTRACT

Salivary gland neoplasms (SGNs) are uncommon tumors, characterized by exhibiting complex clinical and histopathological behavior, whose understanding has been widely explored. The aim of this thesis was to evaluate the immunohistochemical (IHC) expression of immunologic and apoptotic markers in pleomorphic adenomas (PAs), malignant salivary gland neoplasms (MSGNs) and healthy salivary gland tissue as a control group (CG). IHC reactions were performed against anti-CD1a, CD83, HLA-DR, Ki-67, PD-L1, PD-L2, BCL-2 and BAX antibodies in 61 cases of PAs, 43 cases of MSGNs and 5 cases of CG. Research participants with MSGNs had a lower density of intratumoral HLA-DR⁺ cells than those with PAs ($p = 0.001$). Metastatic MSGNs had lower intratumoral CD1a⁺ dendritic cells (DCs) quantification than non-metastatic MSGNs ($p = 0.001$). The proportion of Ki-67-positive cells was significantly higher in MSGNs than in PAs ($p < 0.001$). However, no differences were found in intra and peritumoral CD83⁺ cells between benign and malignant SGNs. A low immunostaining of PD-L2 in MSGNs was associated with a lower risk of distant metastasis ($p = 0.018$). BAX expression was lower in MSGNs than PAs ($p < 0.05$) and CG ($p = 0.03$). BCL-2 expression was also lower in MSGNs compared to PAs ($p = 0.02$). These results suggest that the immunoprotective function of intratumoral DCs is compromised in MSGNs. Also, DCs markers and PD-L2 protein may represent useful predictive tools for metastases in SGNs.

Keywords: Salivary Gland Neoplasms. Pleomorphic Adenoma. Dendritic Cells. Immune Checkpoint Inhibitors. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Imunoexpressão dos anticorpos CD1a, CD83, HLA-DR e Ki-67 em adenomas pleomórficos.	34
Figura 2. Imunoexpressão dos anticorpos CD1a, CD83, HLA-DR e Ki-67 em neoplasias malignas de glândula salivar.	35
Figura 3. Imunomarcação dos anticorpos PD-L1 e PD-L2.	47
Figura 4. Porcentagem de marcação BAX e BCL-2 em neoplasias malignas de glândulas salivares, adenomas pleomórficos e glândulas	59
Figura 5. Expressão imuno-histoquímica dos anticorpos BAX e BCL-2.....	60

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Descrição dos anticorpos primários utilizados. 83

Quadro 2. Referências para a estratificação de risco das neoplasias 86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características clínicas de participantes de pesquisa com neoplasias de glândulas salivares.....	31
Tabela 2. Quantificação de células CD1a+, CD83+, HLA-DR+ (células/mm ²) nos compartimentos intra e peritumoral de neoplasias de glândulas salivares e índice Ki-67.....	33
Tabela 3. Quantificação de células CD1a+, CD83+, HLA-DR+ (células/mm ²) nos compartimentos intra e peritumoral de tumores malignos de glândula salivar metastáticos e não metastáticos.	33
Tabela 4. Correlação entre a porcentagem de células positivas PD-L1/PD-L2 e as características clínico-patológicas de todos os grupos.....	46
Tabela 5. Correlação entre metástase/risco e porcentagem de células PD-L1/PD-L2 positivas no grupo de neoplasias malignas de glândulas salivares.	47
Tabela 6. Imunoexpressão de BAX e BCL-2 comparada com achados clínico-patológicos em 109 pacientes com tumores de glândulas salivares.....	58
Tabela 7. Expressão de BAX e BCL-2 comparada com estratificação de risco e metástase em tumores malignos de glândulas salivares.....	61
Tabela 8. Análise qualitativa da imunorreatividade de BCL-2 e BAX em tumores de glândulas salivares.....	61
Tabela 9. Neoplasias malignas de glândula salivar (tipo de neoplasia e quantidade de casos obtidos por cada universidade).	81

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACP – Adenocarcinoma polimórfico

AP – Adenoma Pleomórfico

BAX – Proteína X Associada a bcl-2

BCL-2 – Proteína reguladora de apoptose (pró-apoptótica)

BR – Baixo risco

CAC – Carcinoma adenoide cístico

CAEXAP – Carcinoma ex adenoma pleomórfico

CAME – Carcinoma mioepitelial

CCA – Carcinoma de células acinares

CD1a – proteína humana codificada pelo gene CD1A.

CD83 – proteína humana codificada pelo gene CD83.

CDS – Carcinoma do ducto salivar

CDs – Células dendríticas

CLE – Carcinoma linfoepitelial

CLs – Células de Langerhans

CME – Carcinoma mucoepidermoide

CS – Carcinoma Secretor

CTLA-4 - Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico

DP – Desvio Padrão

GP – Glândula Parótida

GSL – Glândula Sublingual

GSm – Glândula Salivar Menor

GSM – Glândula Submandibular

H&E – Hematoxilina e Eosina

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

HLA-DR – Receptor de superfície celular de classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC).

HSV – Vírus da Herpes Simples

IHC-immunohistochemical

IHQ- Imuno-histoquímica

IIQ – intervalo interquartil

Ki-67 – Proteína que em humanos é codificada pelo gene MKI67.

LPB-UFSC – Laboratório de Patologia Bucal-Universidade Federal de Santa Catarina

M0 – Sem metástase a distância

M1 – Metástase a distância

NGS – Neoplasias de Glândula Salivar

NMGS – Neoplasia Maligna de Glândula Salivar

OMS – Organização Mundial da Saúde

PD-L1 – Proteína 1 Ligante de Morte Celular Programada 1

PD-L2 –Proteína 2 Ligante de Morte Celular Programada 1

PLAT – proliferação linfoide associada a tumor

Qxt – Quimioterapia

AR – Alto risco

RI – Risco intermediário

Rxt – Radioterapia

SOE – Sem outra especificação

UABC – HGR #1 IMSS – Universidade Autónoma de Baja California- Hospital Geral Regional nº 1 Instituto Mexicano do Seguro Social

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
>	maior que
<	menor que
=	igual que
μm	micrômetros
nº	número
®	marca registrada
p	probabilidade de significância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	OBJETIVOS	3
1.1.1	Objetivo geral	3
1.1.2	Objetivos específicos.....	3
2	Revisão da literatura	4
2.1	NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES.....	4
2.1.1	Neoplasias benignas de glândulas salivares	5
2.1.2	Neoplasias malignas de glândulas salivares	7
2.2	MARCADORES MOLECULARES DE GLÂNDULAS SALIVARES	14
2.2.1	CD1a, CD83, HLA-DR e Ki-67	15
2.2.2	PD-L1 E PD-L2	22
2.2.3	BCL-2 E BAX.....	23
3	JUSTIFICATIVA.....	25
4	ARTIGO 1	26
5	ARTIGO 2	42
6	ARTIGO 3	53
7	CONCLUSÕES	68
	REFERÊNCIAS.....	69
	<i>APÊNDICE 1 - Metodologia expandida.....</i>	<i>80</i>
	<i>ANEXO A – Aprovação do comitê de ética (México)</i>	<i>87</i>
	<i>ANEXO B – Aprovação do comitê de ética UFSC.....</i>	<i>88</i>

1 INTRODUÇÃO

O estudo das neoplasias de glândulas salivares (NGS) constitui uma área importante no campo da Patologia Oral e Maxilofacial (HAFED; FARAG; SHAKER; EL-ROUBY, 2012). A incidência de NGS varia de 0,4 a 13,5 casos por 100.000 pessoas anualmente (WANG; MENG; HOU; HUANG, 2015). Pouco mais de 20% dessas neoplasias são malignas, porém a maioria são benignas (ARAYA; MARTINEZ; NIKLANDER; MARSHALL *et al.*, 2015).

As NGS são histologicamente heterogêneas com alta diversidade de características morfológicas entre suas células e tecidos. As estruturas mais frequentemente afetadas são as glândulas salivares maiores, com predileção das glândulas parótidas (GP) (GOMES; DE VASCONCELOS CARVALHO; FONSECA; GONDAK *et al.*, 2016; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

As NGS em sua maioria, afetam indivíduos do sexo feminino, a partir dos 40 anos, sendo a taxa de sobrevida reduzida conforme a demora no diagnóstico e tratamento (EROVIC; SHAH; BRUCH; JOHNSTON *et al.*, 2015; REINHEIMER; VIEIRA; CORDEIRO; RIVERO, 2019). Seus dados epidemiológicos e etiológicos são pouco consistentes, o que dificulta a classificação e identificação das mais diferentes NGS. Atualmente, sua especificação é feita de acordo com a classificação histológica da OMS (Organização Mundial da Saúde), publicada em 2017 e, o estadiamento das lesões se baseia na classificação TNM de acordo com a Sétima Edição do Manual de Estadiamento de Câncer do *American Joint Committee on Cancer* (AJCC). (GUZZO; LOCATI; PROTT; GATTA *et al.*, 2010; TO; CHAN; TSANG; WEI, 2012; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

Células do sistema imune, como as células de Langerhans, linhagem derivada de células dendríticas (CDs), são capazes de transportar antígenos e apresentá-los aos linfócitos T, presentes em linfonodos próximos às lesões. O mecanismo imunológico e o papel destas células na progressão das NGS ainda não estão claramente definidos. No entanto, sabe-se que o desequilíbrio na regulação celular imunológica de CDs CD83+, CD1a+ e HLA-DR+ exerce papel fundamental no desenvolvimento de afecções neoplásicas (GOMES; DE VASCONCELOS

CARVALHO; FONSECA; GONDAK *et al.*, 2016; STANKOVIC; BJØRHOVDE; SKARSHAUG; AAMODT *et al.*, 2018).

Em vários carcinomas, o marcador proliferativo Ki-67 tem sido relatado como um marcador prognóstico, incluindo alguns estudos de subtipos únicos de carcinomas de glândulas salivares (TANG; FAN; LI; CHEN *et al.*, 2011). E em relação a proliferação celular, admite-se que parte do crescimento tumoral seja resultante da inibição da apoptose. Tal fenômeno é basicamente regulado pelo equilíbrio entre moléculas iniciadoras, inibidoras e promotoras de apoptose. Portanto, essa interação determina a sobrevivência ou morte celular, enquadrando esse mecanismo como um alvo benéfico para fins terapêuticos (LESSENE; CZABOTAR; COLMAN, 2008; ZHANG; LIU; ZHOU; ZHENG, 2020).

Em condições fisiológicas normais a via PD1/PD-L1 e PD-L2 controla a inflamação, inibindo a atividade das células T efectoras, protegendo assim o hospedeiro contra a autoimunidade (DONG; SUN; ZHANG, 2017). Num contexto de neoplasia, esta via ativada permite que as células neoplásicas evadam o sistema imunológico (CHANG; KIM; CHOI; CHO *et al.*, 2017). Vários estudos relataram que a superexpressão de PD-L1 e PD-L2 está correlacionada com mau prognóstico em vários tipos de neoplasias (JUNG; JEONG; JI; AHN *et al.*, 2017; WANG; WANG; LIU; ZHAO *et al.*, 2015). No entanto, a relação entre a expressão de PD-L1 e PD-L2 nas NGS e o comportamento clínico patológico ainda tem sido pouco estudada (NAKANO; TAKIZAWA; UEZATO; TAGUCHI *et al.*, 2019).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo desta tese foi avaliar a imunexpressão de marcadores imunológicos e apoptóticos em neoplasias de glândulas salivares (NGS).

1.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos desta tese compreendem:

- Registrar os dados clínicos (idade, sexo e localização anatômica) dos participantes de pesquisa diagnosticados com adenomas pleomórfico (AP), neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) e glândula salivar normal (GSN), a partir das fichas de biópsias;
- Classificar as NMGS de acordo com o risco;
- Classificar as lâminas histológicas (H&E) obtidas dos participantes da pesquisa de acordo com os critérios da OMS (2017);
- Avaliar a imunexpressão dos anticorpos anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-BCL-2 e anti-BAX em AP, NMGS e GSN;
- Quantificar, por meio de análise histomorfométrica, as CDs imaturas imunomarcadas pelos anticorpos anti-HLA-DR e anti-CD1a em AP, NMGS e GSN;
- Quantificar, por meio de análise histomorfométrica, as CDs maduras, imunomarcadas em AP, NMGS e GSN pelo anticorpo anti-CD83;
- Quantificar a expressão de células imunopositivas para o anticorpo anti-Ki-67;
- Investigar possíveis associações dos achados clínicos-patológicos das NGS com os marcadores imunológicos, de apoptose e de proliferação.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 NEOPLASIAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

As neoplasias de glândulas salivares (NGS) correspondem entre 3 e 6% do total de cânceres detectados na região de cabeça e pescoço (LAWAL; ADISA; KOLUDE; ADEYEMI, 2015; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016). Alguns fatores de risco para NGS são o histórico de câncer de cabeça e pescoço e radioterapia (Rxt) cervico-facial (RADOÏ; BARUL; MENVIELLE; CARTON *et al.*, 2018). Também foi recentemente demonstrado que aproximadamente um terço dos pacientes com ACC recorrente/metastático apresentava pelo menos uma mutação germinativa patogênica (HO; OCHOA; JAYAKUMARAN; ZEHIR *et al.*, 2019; TCHEKMEDYIAN, 2021).

A maior incidência dos indivíduos afetados encontra-se por volta da quinta década de vida. Divergências regionais quanto à média de idade em que as doenças surgem podem ocorrer, devido às diferenças na expectativa de vida da população investigada. Estudos de prevalência mostram resultados variados, ora com predileção pelo sexo feminino, ora com taxas semelhantes para ambos os sexos. Os dados epidemiológicos podem estar mais associados a variações de acordo com a demografia das populações estudadas, do que ao sexo propriamente dito (CARLSON; SCHLIEVE, 2019; GUZZO; LOCATI; PROTT; GATTA *et al.*, 2010; HÜHNS; SIMM; ERBERSDOBLER; ZIMPFER, 2015; LAWAL; ADISA; KOLUDE; ADEYEMI, 2015; SIMARD; TORRE; JEMAL, 2014; TO; CHAN; TSANG; WEI, 2012; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

De acordo com um estudo retrospectivo, dentre as neoplasias de cabeça e pescoço avaliadas, 11,2% afetaram as glândulas salivares, sendo 78% classificados como benignos e 22% malignos. (VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016). As glândulas salivares maiores são as mais acometidas por neoplasias, e a maior ocorrência tem sido observada nas GP, variando de 39,3% a 66,9% de acordo com as características epidemiológicas regionais (DAMJANOV; SKENDERI; VRANIC, 2016; GUZZO; LOCATI; PROTT; GATTA *et al.*, 2010; LAWAL; ADISA;

KOLUDE; ADEYEMI, 2015; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

São raros os casos de neoplasias em GSL, porém, quando ocorrem, aproximadamente 71,4% são malignos. Esse agravo pode ser decorrente dos ductos glandulares estarem constantemente abertos e posicionados de forma que substâncias carcinogênicas adentram facilmente (LAWAL; ADISA; KOLUDE; ADEYEMI, 2015; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

Tumores benignos tendem a ser insidiosos e de crescimento lento e sem aderência aos tecidos circundantes. As lesões malignas apresentam crescimento rápido e aderem a camadas profundas, com superfície ulcerada ou telangiectasia (VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

2.1.1 Neoplasias benignas de glândulas salivares

Aproximadamente 80% das NGS afetam as GP, e destes, 80% são diagnosticados como neoplasias benignas (GUZZO; LOCATI; PROTT; GATTA *et al.*, 2010; SHETTY; GEETHAMANI, 2016). O adenoma pleomórfico (AP) é a neoplasia benigna mais frequentemente encontrada nas glândulas salivares (PINKSTON; COLE, 1999).

O AP é caracterizado pelo polimorfismo celular, decorrente do padrão de diferenciação epitelial e crescimento celular. É chamado também de “tumor misto”, caracterizado por proliferações neoplásicas epiteliais e mioepiteliais glandulares, composto por células luminais de ductos e por células abluminais de tipo mioepitelial, apresentando morfologias variadas como fusiforme, arredondada, angular, poligonal, até tipos plasmacitóides e mucosos (ENESCU; ENESCU; BĂLĂȘOIU; CIOLOFAN *et al.*, 2014; LOPES; BARROSO; HENRIQUES; DOS SANTOS *et al.*, 2016).

Os arranjos celulares podem exibir aspectos insulares, em forma de ductos, trabeculares, fasciculares, em forma de cistos, pseudo-angiomatosos ou cribiformes. A composição do estroma é variável, sendo os tipos mixóide e condromixóide os mais frequentemente relatados e, em menor proporção, os tipos fibro-esclerótico,

hialino e osteóide (ENESCU; ENESCU; BĂLĂȘOIU; CIOLOFAN *et al.*, 2014; SHETTY; GEETHAMANI, 2016). Apresenta-se encapsulado quando ocorre em glândulas salivares maiores, e não-encapsulado em glândulas salivares menores (GSm) (LINGAM; DAGHIR; NIGAR; ABBAS *et al.*, 2011).

O local mais acometido tem sido GP, seguida das GSm no palato. Os indivíduos mais afetados são mulheres, entre a terceira e quinta década de vida (DE BRITO; GASPAR; EGAL; SANCHEZ-ROMERO *et al.*, 2016; LOPES; BARROSO; HENRIQUES; DOS SANTOS *et al.*, 2016). O AP é classificado em 4 subtipos principais, de acordo com as alterações moleculares a nível genético: tumores com translocações/reorganizações envolvendo o cromossomo 8q12, tumores com translocações/rearranjos envolvendo o cromossomo 12q13-15, tumores com trissomia 8 completa ou parcial e tumores com aberrações clonais não recorrentes sem envolvimento de 8q12 ou 12q13-15 (STENMAN; FEHR; SKÁLOVÁ; VANDER POORTEN *et al.*, 2022). Entre estas, as translocações com pontos de interrupção em 8q12 e 12q13-15, resultando em fusões gênicas envolvendo os genes do fator de transcrição PLAG1 e HMGA2 são as mais comuns (KLEMKE; MÜLLER; WOSNIOK; MARKOWSKI *et al.*, 2014). A recorrência do AP poderia também estar relacionada a superexpressão de PLAG1 (DE BRITO; GASPAR; EGAL; SANCHEZ-ROMERO *et al.*, 2016)

O diagnóstico realizado por meio de exame físico é essencial em casos de neoplasias benignas da cavidade oral, entretanto, não exclui a necessidade da realização de diagnósticos diferenciais em casos de linfadenopatia intraparótida, neuroma do nervo facial, tumor de Warthin, e outras manifestações como cistos, processos inflamatórios, processos hiperplásicos e alterações malignas (GUZZO; LOCATI; PROTT; GATTA *et al.*, 2010; LINGAM; DAGHIR; NIGAR; ABBAS *et al.*, 2011).

O tumor de Warthin é a segunda neoplasia benigna mais frequente em glândulas salivares maiores, com predileção ao sexo masculino, a partir da quinta década de vida, sendo que o tabagismo pode aumentar em até oito vezes o risco de desenvolvimento da lesão (NEVILLE; DAMM; ALLEN; CHI, 2016; SHETTY; GEETHAMANI, 2016; VASCONCELOS; NÖR; MEURER; SALVADORI *et al.*, 2016).

Esta neoplasia acomete preferencialmente as GP, podendo estar presente bilateralmente, mas em estágios de desenvolvimento distintos (NEVILLE; DAMM; ALLEN; CHI, 2016).

Histologicamente o tumor de Warthin é composto por estroma linfoide e epitélio celular ductal oncocítico, disposto em fileiras uniformes rodeado por espaços císticos. As células, com citoplasma eosinofílico abundante, estão distribuídas em uma bicamada em cuja porção luminal encontra-se células colunares com núcleo picnótico e, a camada subjacente com células cuboidais e núcleo vesicular. O tecido epitelial se projeta em direção aos espaços císticos, e é envolto por um estroma do tipo linfoide (NEVILLE; DAMM; ALLEN; CHI, 2016).

2.1.2 Neoplasias malignas de glândulas salivares

As Neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) possuem comportamento biológico amplo e diversificado. São alterações geralmente indolores, de progressão lenta, mas podem também ser agressivas, dolorosas, associadas a paralisias faciais, exibindo crescimento evidente, envolvendo nervos e linfonodos adjacentes. (GUZZO; LOCATI; PROTT; GATTA *et al.*, 2010).

A OMS, na classificação de 2017, considera as seguintes NMGS: carcinoma mucoepidermoide (CME), carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma de células acinares (CCA), adenocarcinoma polimórfico (ACP), carcinoma de células claras, adenocarcinoma de células basais, carcinoma intraductal, adenocarcinoma sem outra especificação (SOE), carcinoma do ducto salivar (CDS), carcinoma mioepitelial (CAME), carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma ex adenoma pleomórfico (CAEXAP), carcinoma secretor (CS), adenocarcinoma sebáceo, carcinosarcoma, carcinoma pobremente diferenciado (carcinoma indiferenciado, carcinoma neuroendócrino de grandes células, carcinoma neuroendócrino de pequenas células), carcinoma linfoepitelial (CLE), carcinoma de células escamosas, carcinoma oncocítico e sialoblastoma (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017).

Os estudos de prevalência apontam ao CME, CAC e CCA como as três NMGS mais frequentes em cavidade oral com porcentagens variadas (EROVIC; SHAH; BRUCH; JOHNSTON *et al.*, 2015; VASCONCELOS; NÖR; MEURER;

SALVADORI *et al.*, 2016) Fatores como idade acima de 60 anos, o grau histopatológico e a invasão linfovascular são considerados prognósticos desfavoráveis à sobrevida pós-tratamento (EROVIC; SHAH; BRUCH; JOHNSTON *et al.*, 2015).

O CME representa de 10 a 15% de todas as NGS e é ~~NMGs~~ mais comum em jovens (TRIANTAFILLIDOU; DIMITRAKOPOULOS; IORDANIDIS; KOUFOGIANNIS, 2006). A idade média de aparecimento é de 48,8 anos com uma predileção pelo sexo feminino (PERAZA; GÓMEZ; BELTRAN; AMARISTA, 2020). Histologicamente o CME é composto por células mucosas, intermediárias e epidermóides, com características colunares, de células claras e oncócitoídes (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017). Pode se apresentar como de baixo, intermediário ou alto grau, sendo a apresentação de baixo grau a mais habitual. O CME de baixo grau surge mais frequentemente em GSm e geralmente é detectado em estágios iniciais. Por outro lado, o CME de alto grau surge com mais frequência nas glândulas salivares maiores, especialmente na GP, e está mais associado a estágios T e N mais altos (DALGIC; KARAKOC; AYDIN; HIDIR *et al.*, 2014) O estágio e o grau do tumor têm sido importantes preditores de sobrevida (WALDRON; EL-MOFTY; GNEPP, 1988).

O CME está associado a uma translocação genética específica entre os cromossomos 11 e 19, t(11;19)(q14-21; p12-13) (QANNAM; BELLO, 2016). O tratamento é a ressecção cirúrgica com margens de segurança (YIH; KRATOCHVIL; STEWART, 2005). A Rxt pós-operatória é recomendada em casos de estágio tumoral avançado, tumor de alto grau, invasão perineural ou linfovascular, margens de ressecção positivas, extensão extraparotídea ou envolvimento de linfonodos (ROH; CHOI; LEE; CHO *et al.*, 2008). O uso de quimioterapia (Qtx) atualmente desempenha um papel apenas paliativo (LOPES; DA CRUZ PEREZ; DE ABREU ALVES; DE ALMEIDA *et al.*, 2006).

Com uma incidência anual de 3 a 4,5 casos por milhão, o CAC é uma neoplasia maligna rara que surge nas glândulas salivares e outros locais, caracterizada por um curso clínico indolente, mas agressivo, pela presença de invasão perineural precoce, recidiva local frequente e alta taxa de metástase à

distância tardia. O acompanhamento clínico deve se estender por mais de 15 anos (CANTÙ, 2021; COCA-PELAZ; RODRIGO; BRADLEY; VANDER POORTEN *et al.*, 2015; HO; OCHOA; JAYAKUMARAN; ZEHIR *et al.*, 2019). É mais prevalente em mulheres de meia-idade e o tratamento de escolha para a maioria dos pacientes é a cirurgia radical com Rxt pós-operatória (DANTAS; MORAIS; MACEDO; TINÔCO *et al.*, 2015).

O CAC apresenta padrões de crescimento lobulados ou invasivos. Morfologicamente, é composto em grande parte de células não luminais, basaloides, hematoxifílicas, com quantidades pequenas a moderadas de citoplasma e muito menos células luminais, cúbicas curtas e eosinófilas. Os núcleos tendem a ser relativamente claros com nucléolos pequenos ou inconspícuos. As células luminais podem ser imperceptíveis, embora marcadores de imuno-histoquímica (IHQ) ajudem na sua distinção (COCA-PELAZ; RODRIGO; BRADLEY; VANDER POORTEN *et al.*, 2015)

O CAC é subdividido em 3 grupos histológicos: cribriforme (células basalóides dispostas em massas arredondadas de tamanho variável perfuradas por espaços rígidos, ovais, semelhantes a cistos que podem conter "cilindros" de material hialino e/ou glicosaminoglicanos mixóides e ocasionais pequenos lúmens verdadeiros revestido por células luminais), tubular (constituído por túbulos de duas camadas revestidos por células luminais circundadas por células não luminais que frequentemente apresentam citoplasma "claro") e sólido (composto principalmente de células tumorais basalóides crescendo sem formação de lúmen) (FRIERSON; EL-NAGGAR; WELSH; SAPINOSO *et al.*, 2002). Alguns estudos demonstraram que os tumores com um componente de crescimento sólido têm um curso rápido e fatal, em comparação com os outros subtipos histológicos (DA CRUZ PEREZ; DE ABREU ALVES; NOBUKO NISHIMOTO; DE ALMEIDA *et al.*, 2006). Não existe um sistema de classificação histológica universalmente aceito e nenhum estudo de reprodutibilidade dos sistemas de classificação existentes (CANTÙ, 2021).

O CAME é uma neoplasia maligna derivada da diferenciação de células mioepiteliais, sem a presença de elementos ductais, constituindo o 2% dos carcinomas que acometem glândulas salivares. Podem surgir primariamente, ou a

partir de alterações pré-existentes como o AP ou o mioepitelioma, cujo diagnóstico diferencial baseia-se na presença ou ausência de crescimento invasivo (PASSADOR-SANTOS; GRÖNROOS; IRISH; GILBERT *et al.*, 2016).

É possível que as células mioepiteliais sejam responsáveis pelas alterações estromais de algumas neoplasias, tendo em vista que no espaço intercelular se concentra substância mucoide, o que caracteriza o estroma mixomatoso. Além disso, a degeneração vacuolar das células garante um aspecto condroide local (NEVILLE; DAMM; ALLEN; CHI, 2016).

O carcinoma do ducto salivar (CDS) é uma neoplasia maligna, que afeta em sua maioria homens, a partir da quinta década de vida. Aproximadamente 80% acometem GP sendo que dentre as neoplasias que afetam esta glândula, o CDS representa 15 a 23% do total. A etiologia ainda permanece desconhecida, porém, acredita-se que seja derivada de CAEXAP pré-existentes (DAMJANOV; SKENDERI; VRANIC, 2016).

O CDS é classificado como o subtipo histológico mais comum dentre os CAEXAP, seguido pelo CAME (KATABI; GHOSSEIN; HO; DOGAN *et al.*, 2015). Os achados histológicos revelam aspectos muito semelhantes ao carcinoma do ducto de mama, tais como a presença de componentes infiltrados e intraductais, bem como ductos salivares expandidos, arranjados de forma fenestrada, sólida, papilar, cribiforme e com agrupamento necrótico ao centro (AL-QAHTANI; TUNIO; BAYOUMI; GURUSAMY *et al.*, 2016; CHANDRASEKAR; SALATI; RAO; RADHAKRISHNAN, 2016; DELGADO; VUITCH; ALBORES-SAAVEDRA, 1993).

Os achados microscópicos do CDS revelam componentes infiltrados intraductais, comedonecrose central e arquitetura cribiforme, sólida ou micropapilar. As células neoplásicas ductais são amplas, poligonais, com citoplasma eosinofílico granular ou pulverulento, com efetiva atividade mitótica e, são circundadas por estroma hialino. As neoplasias mais agressivas apresentam invasão perineural, vascular e linfática (DELGADO; VUITCH; ALBORES-SAAVEDRA, 1993).

As características próprias do CDS são verificadas por ultrassom, tomografia computadorizada e ressonância magnética, sendo o exame histopatológico, reações

IHQ e o perfil molecular utilizados no diagnóstico diferencial para câncer de mama (BOROVEC; CEGAN; MALA; HARMASH *et al.*, 2015). Em decorrência da alta incidência de envolvimento de linfonodos cervicais, o tratamento consiste na parotidectomia, dissecação homolateral do pescoço, Rxt e, eventualmente, Qxt, porém o prognóstico não costuma ser favorável (AL-QAHTANI; TUNIO; BAYOUMI; GURUSAMY *et al.*, 2016).

O CCA é uma NMGS geralmente considerada um tumor de baixo grau e com diagnóstico frequentemente complicado pela sua semelhança com tumores benignos, porém, existe uma variante de alto grau mais agressiva que tem sido associada a pior sobrevida e propensão para metástase à distância (VANDER POORTEN; TRIANTAFYLLOU; THOMPSON; BISHOP *et al.*, 2016). As mulheres são um pouco mais afetadas do que os homens, com um leve pico na quinta e sextas décadas de vida (KAYA; TAYLOR; MITCHELL; GUSS *et al.*, 2020). Surge tipicamente na GP e a apresentação mais comum é uma massa sólida indolor bem definida (CAVALIERE; DE LUCA; SCARPA; SAVIGNANO *et al.*, 2020; KHELFA; MANSOUR; ABDEL-AZIZ; RAUFI *et al.*, 2016). Os fatores de risco mais reconhecidos são a exposição prévia à radiação e predisposição familiar (AL-ZAHER; OBEID; AL-SALAM; AL-KAYYALI, 2009)

Perda de CDKN2A e CDKN2B, Mutação SETD2 e PIK3CA e TP53 c.217-c.1178 missense (alteração genética na qual a substituição de um único par de bases altera o código genético de forma a produzir um aminoácido diferente do aminoácido usual naquela posição), são as alterações mais comuns no CCA (CONSORTIUM, 2017). Baixos níveis séricos de adiponectina, leptina e visfatina parecem desempenhar um papel na patologia das NGS; e um estudo demonstrou maior nível plasmático de adiponectina em tumores benignos da GP em comparação com CCA (SOWA; MISIOLEK; ORECKA; CZECIOR *et al.*, 2018). Histologicamente apresenta diferenciação de células acinares serosas. No entanto, vários tipos de células e padrões de crescimento histomorfológico são reconhecidos. Estes incluem padrões de crescimento acinar, ductal intercalado, vacuolizado, claro e glandular inespecífico e sólido-lobular, microcístico, papilar-cístico e folicular (BANSAL; KAUR; DALAL; SIRAJ, 2018) O tratamento preferencial da doença local é a excisão

cirúrgica completa, que consiste em parotidectomia total ou superficial (GOMEZ; KATABI; ZHUNG; WOLDEN *et al.*, 2009). Tumores recorrentes, margens duvidosas ou positivas, tumor adjacente ao nervo facial, envolvimento do lobo profundo, metástases linfonodais, extensão extra-parotídea, e tumores maiores de 4 cm, são indicações para Rxt adjuvante pós-operatória (SPAFFORD; MINTZ; HAY, 1991).

Em 2016, Damjanov *et al.* descreveram as características do CS que acomete glândulas salivares, mas se assemelha ao carcinoma secretório de mama nos aspectos histopatológicos, de IHQ e genético-moleculares. Microscopicamente apresenta-se como uma massa multilobulada, bem delimitada, composta por fragmentos menores de septos fibrosos. As células possuem contorno uniforme, núcleos vesiculares contendo nucléolos centrais e citoplasma eosinofílico vacuolado, com baixa atividade mitótica (DAMJANOV; SKENDERI; VRANIC, 2016).

O CS compõe aproximadamente 4,5% das NMGS, com predileção para o sexo masculino. O diagnóstico diferencial inclui o CCA, CME e o cistoadenocarcinoma cribiforme de baixo grau (DAMJANOV; SKENDERI; VRANIC, 2016).

O CAEXAP é caracterizado como uma NMGS rara frequentemente encontrado em glândulas salivares maiores, como a GP (KATABI; GHOSSEIN; HO; DOGAN *et al.*, 2015). O CAEXAP é categorizado com base na extensão da invasão, como: intracapsular, minimamente invasivo ou amplamente invasivo (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017)

A sequência evolutiva da lesão, consiste em um carcinoma *in situ*, no qual as células com potencial de malignização substituem as células luminais do ducto, preservando uma camada intacta mioepitelial abluminal do AP. Gradativamente as células neoplásicas invadem o estroma e, uma vez que ultrapassam o limite da cápsula fibrosa, a neoplasia passa a ser designada como invasiva (KATABI; GOMEZ; KLIMSTRA; CARLSON *et al.*, 2010).

O ACP é uma neoplasia epitelial maligna caracterizada por uniformidade citológica, diversidade morfológica e padrão de crescimento infiltrativo (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017). O ACP se apresenta

tipicamente como nódulos lobulados, firmes, circunscritos e não encapsulados, de tamanho variável (média: 2,1 cm), duração variável (de algumas semanas a anos), comumente indolor (PATEL; VAZQUEZ; DUBAL; BAREDES *et al.*, 2015). Aproximadamente 60% dos casos de ACP envolvem o palato. Outras localizações intraorais são a mucosa bucal, região retromolar, lábio superior e base da língua. Locais incomuns incluem as glândulas salivares maiores e lacrimais, nasofaringe e cavidade nasal (KIMPLE; AUSTIN; SHAH; WELCH *et al.*, 2014).

Histologicamente as células neoplásicas do ACP são de tamanho pequeno a médio, uniformes, com núcleos ovais, minimamente hiper cromáticos e apenas nucléolos ocasionais. Mitoses são incomuns e a detecção de necrose é vista em lesões de alto grau (XU; ANEJA; GHOSSEIN; KATABI, 2016).

O adenocarcinoma SOE, representa um espectro de carcinomas epiteliais que formam estruturas ductais e/ou glandulares (com ou sem formação cística) (EL-NAGGAR; CHAN; GRANDIS; TAKATA *et al.*, 2017). O adenocarcinoma SOE representa aproximadamente 10-15% de todas as NMGS (BJØRNDAL; KROGDAHL; THERKILDSEN; OVERGAARD *et al.*, 2011; SPIRO; HUVOS; STRONG, 1982; WALDRON; EL-MOFTY; GNEPP, 1988). A idade média dos pacientes é de cerca de 58 anos, mas uma ampla faixa etária foi relatada (WAHLBERG; ANDERSON; BIÖRKLUND; MÖLLER *et al.*, 2002). Estas neoplasias são extremamente raras em crianças (MAMLOUK; ROSBE; GLASTONBURY, 2015).

O adenocarcinoma SOE surge em mais de 50% dos casos na GP, 40% nas GSm, mais frequentemente no palato duro, mucosa bucal e lábios (FOSS; ELLIS; AUCLAIR, 1996; SPIRO; HUVOS; STRONG, 1982). Clinicamente se apresenta como massa solitária ou cística assintomática e podem ser parcialmente circunscritas ou ter uma aparência irregular e infiltrativa (SPIRO; HUVOS; STRONG, 1982).

Histologicamente, o adenocarcinoma SOE exibe proliferações ductais ou glandulares com ou sem formação cística. As células neoplásicas podem ser morfológicamente cuboidais, colunares, poligonais, claras, mucosas, oncocitóides e/ou plasmocitoides e organizadas em diversos padrões de crescimento. Para o

diagnóstico de adenocarcinoma SOE, os subtipos primários mais comuns devem primeiro ser excluídos, incluindo carcinoma ductal salivar, CME de alto grau, ACP e adenocarcinoma metastático (NIKITAKIS; TOSIOS; PAPANIKOLAOU; RIVERA *et al.*, 2004). A IHQ pode ser útil para distingui-lo de CCA (CK18, DOG1) e de neoplasias com composição mioepitelial/basocelular (calponina, SMA, CK5 / 6, p63) (IHRLER; BLASENBREU-VOGT; SENDELHOFERT; LANG *et al.*, 2002).

A análise das NGS deve levar em consideração diversos aspectos teciduais para a definição do prognóstico da doença, incluindo: estágio, tipo e grau histológico, diferenciação tumoral o envolvimento nervoso, o local, as condições das margens cirúrgicas, sexo e idade do paciente. Destes, o estágio patológico e a invasão perineural são as características mais importantes para o desfecho do tratamento (RAYESS; DEZUBE; BAWAB; RAZA *et al.*, 2017; SPEIGHT; BARRETT, 2009).

Algumas ferramentas têm sido aplicadas para auxiliar a caracterização, o diagnóstico e o prognóstico de neoplasias benignas e malignas que acometem o ser humano. Técnicas moleculares e genéticas têm sido empregadas para facilitar a compreensão de inúmeras patologias, utilizando-se marcadores específicos (BELGE; MEYER; KLEMKE; BURCHARDT *et al.*, 2008).

2.2 MARCADORES MOLECULARES DE GLÂNDULAS SALIVARES

O diagnóstico de lesões neoplásicas, quando impossibilitado por simples análise morfológica, é realizado por testes como os de IHQ. O emprego de marcadores moleculares facilita a diferenciação de diversas anormalidades teciduais com características semelhantes entre si (KATABI; GHOSSEIN; HO; DOGAN *et al.*, 2015).

A associação entre diferentes marcadores moleculares e os diversos fenótipos neoplásicos permite a compreensão do papel dessas moléculas na transformação celular, bem como no diagnóstico diferencial e, eventualmente no prognóstico de neoplasias benignas e malignas (BELGE; MEYER; KLEMKE; BURCHARDT *et al.*, 2008; GUEIROS; GONDAK; JORGE JÚNIOR; COLETTA *et al.*, 2012; KATABI; GHOSSEIN; HO; DOGAN *et al.*, 2015).

2.2.1 CD1a, CD83, HLA-DR e Ki-67

As proteínas CD1 são encontradas na superfície de CDs, Células do Timo, Monócitos ativados e algumas Células B. São proteínas transmembrana, glicosiladas, codificadas no cromossomo 1 e agrupadas em cinco subconjuntos (CD1a-e). Uma de suas principais funções está relacionada com reações imunológicas frente a infecções virais e afecções neoplásicas (SCHMUTH; SIDOROFF; DANNER; TOPAR *et al.*, 2001).

O desencadeamento de um processo inflamatório resulta na liberação de mediadores químicos específicos que recrutam as Células de Langerhans (CLs), consideradas como um subtipo imaturo de CDs. Enquanto isso, as CLs locais iniciam o processo de maturação, no qual a partir de um estado imaturo – cuja superfície expressa elevados níveis de CD1a e langerinas e, baixos níveis de CD83 – passa a apresentar um fenótipo maduro, com níveis de CD1a e langerinas reduzidos e, aumento de CD83 (GUEIROS; GONDAK; JORGE JÚNIOR; COLETTA *et al.*, 2012).

É possível que as células imaturas sejam responsáveis pela regulação da cascata imune, uma vez que são encontradas em tecidos contendo processos inflamatórios; da mesma forma, a presença de células maduras nesses mesmos locais funcionaria como células apresentadoras de antígenos promovendo um fenômeno reativo inflamatório já conhecido. Assim, o aumento na densidade de células de Langerhans, principalmente imaturas, em processos inflamatórios na cavidade oral, está associado à severidade da resposta imune adaptativa (GUEIROS; GONDAK; JORGE JÚNIOR; COLETTA *et al.*, 2012).

As CDs imaturas, quando em contato com infecções virais, tais como o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e o Vírus da Herpes Simples (HSV), têm sua capacidade de maturação prejudicada, em decorrência da necessidade de entrada, propagação, sobrevivência e transmissão dos agentes virais. Assim, a imunossupressão a nível de CDs ocasiona a diminuição da expressão de CD1a e aumento de CD83 em tecidos epiteliais e subepiteliais orais (GONDAK; MAUAD; ALMEIDA; VARGAS, 2013).

A quantidade e distribuição de células CD1a+ em neoplasias consistem em importantes ferramentas para diagnóstico diferencial. Neste contexto, já foram empregadas análises IHQ para Células B de linfomas e pseudolinfomas dérmicos e foi encontrada uma acentuada redução de CD1a em células B malignas de linfomas comparados a pseudolinfomas e células T malignas de linfomas, sugerindo uma perda reacional antineoplásica de Células B (SCHMUTH; SIDOROFF; DANNER; TOPAR *et al.*, 2001).

Algumas dermatoses inflamatórias, tais como dermatite eczematosa, líquen plano, psoríase e doença do enxerto contra hospedeiro aguda e crônica, estão associadas à resposta imune mediada por células T. Em um estudo realizado para averiguar a distribuição de CD1a em amostras teciduais das dermatoses supracitadas, observaram um aumento na quantidade de CD1a em lesões de líquen plano e dermatite eczematosa; redução na quantidade de células em doença do enxerto contra hospedeiro aguda; e, não observaram diferença no aumento de CD1a em psoríase e doença do enxerto contra hospedeiro crônica, comparadas com tecidos saudáveis (DEGUCHI; AIBA; OHTANI; NAGURA *et al.*, 2002).

A glicoproteína E-caderina é uma molécula do componente epitelial, capaz de manter a integridade deste tecido, promover a morfogênese e a adesão intercelular, inclusive entre as CLs e queratinócitos. Assim, a redução da expressão de E-caderinas em tecidos neoplásicos de cabeça e pescoço resulta na agressividade e metástase neoplásica. No que se refere às GSm, a análise da presença e a relação entre CLs e a expressão de E-caderina demonstrou alta densidade de CD1a em AP e, baixa densidade em CME, sendo justificado pela habilidade das células neoplásicas de esquivar a resposta imune. Além disso, as E-caderinas parecem mediar a adesão celular em neoplasias de GSm, perdendo a capacidade de manter as células CD1a no epitélio glandular, prejudicando assim sua função local (DULTRA; BARROS; SCHAER-BARBOSA; FIGUEIREDO *et al.*, 2012).

CD83 representa um alvo promissor para imunoterapia devido à sua expressão em CDs maduras, a mais eficiente das células apresentadoras de antígenos. Com base em seu padrão de expressão restrito, estrutura e escassez de células T CD4+ em camundongos deficientes em CD83, várias funções

imunologicamente importantes para CD83 durante as respostas imunes foram propostas (CRAMER; TRUMPFHELLER; MEHLHOOP; MORÉ *et al.*, 2000; FUJIMOTO; TEDDER, 2006).

Com o intuito de investigar o padrão de expressão e a função de CD83 na resposta imunológica de células murinas, uma pesquisa sugeriu um importante papel na ativação de células T, em decorrência da expressão cinética e distribuição celular de CD83. Devido ao padrão de ligação com imunoglobulinas e da proximidade com vasos sanguíneos, as CD83 também podem estar envolvidas no direcionamento de células T para órgãos imunocompetentes como baço e linfonodos (CRAMER; TRUMPFHELLER; MEHLHOOP; MORÉ *et al.*, 2000).

Na condição de CDs maduras, as CD83 têm sua densidade populacional reduzida nas camadas epiteliais de carcinoma de células escamosas labiais, assim como células imaturas CD1a. Sugere-se que a depleção de CDs, decorrente da incidência de radiação ultravioleta em pacientes com câncer labial, possa estar relacionada às primeiras etapas do desenvolvimento neoplásico (GOMES; DE VASCONCELOS CARVALHO; FONSECA; GONDAK *et al.*, 2016).

Estes biomarcadores de CDs podem ser empregados em diagnósticos de doenças inflamatórias como Líquen Plano e Lesões Liquenóides orais, bem como em terapias de doenças autoimunes e lesões malignas. As células CD83 são fundamentais para a geração de células T CD4, além de potencializar a resposta imune antineoplásica. Quando em condições de imunossupressão, a expressão de CD83 em CDs é reduzida, como por exemplo, na presença do vírus HIV (FUJIMOTO; TEDDER, 2006; GUEIROS; GONDAK; JORGE JÚNIOR; COLETTA *et al.*, 2012).

Quando investigada a densidade de CDs CD83 em neoplasias gástricas e linfonodos regionais, foi observada uma redução populacional celular conforme o incremento da gravidade dos estágios neoplásicos, bem como um prognóstico desfavorável tendo em vista esta depleção celular. Os autores acreditam ser possível futuramente injetar CDs obtidas por meio de cultura diretamente nas

afecções neoplásicas como imunoterapia (KASHIMURA; SAZE; TERASHIMA; SOETA *et al.*, 2012).

A função do antígeno leucocitário humano (HLA) é reconhecer peptídeos e apresentá-los na superfície das células apresentadoras de antígenos. Existem duas classes de moléculas HLA: classe I (HLA-A, HLA-B e HLA-C) e classe II (HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP). No caso do HLA-DR, trata-se de um receptor de superfície celular MHC classe II, codificado pelo complexo HLA, relacionado ao antígeno D do cromossomo 6. Trata-se de um heterodímero constituído por uma cadeia alfa e uma cadeia beta, ambas ancoradas a membrana. Desempenha papel central no sistema imunológico por apresentar peptídeos derivados de proteínas extracelulares. As moléculas de classe II são expressas em células apresentadoras de antígenos, como células dendríticas e macrófagos. A cadeia alfa é de aproximadamente 35 kD (QUILO DALTON) e a cadeia beta 27 kD (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

As CDs desenvolvem suas habilidades de captura e processamento de antígenos durante o processo de maturação, aumentando a expressão superficial do MHC classe II. CDs imaturas apresentam estruturas endossomais abundantes ao contrário das CDs maduras, onde as moléculas do MHC classe II estão localizadas principalmente na membrana celular, fornecendo memória antigênica de longo prazo (VILLADANGOS; SCHNORRER; WILSON, 2005).

A expressão de moléculas HLA classe II não é exclusiva de células imunes, pois também já foram descritas em células tumorais. A perda da heterozigosidade do HLA está relacionada à evasão imune do tumor. A relevância clínica da expressão de HLA classe II em células neoplásicas pode estar associada a um resultado clínico favorável em câncer colorretal e metástases cerebrais; o mesmo não ocorre em melanoma ou sarcomas, onde tem sido associado a um mau resultado clínico. Por outro lado, os antígenos HLA I e II foram identificados em tumores de baixa mutação, como o carcinoma ovariano (ALGARRA; CABRERA; GARRIDO, 2000; ZEINER; ZINKE; KOWALEWSKI; BERNATZ *et al.*, 2018)

A expressão do HLA classe II varia entre os diferentes tipos de tumores, de acordo com sua origem e/ou fenótipo molecular. No caso do carcinoma ductal da

mama, mais de 80% das lesões não expressam essa molécula. Em contraste com carcinoma papilífero de tireoide e melanoma que apresentam 50% e 60% de expressão, respectivamente. Da mesma forma, tem sido observado que aqueles carcinomas espinocelulares de orofaringe associados ao HPV que apresentam alta expressão do HLA classe II, apresentam melhor evolução clínica (NÄSMAN; ANDERSSON; MARKLUND; TERTIPIS et al., 2013; SELIGER; KLOOR; FERRONE, 2017).

O papel da expressão do MHC II em células tumorais tem sido controverso, pois há evidências que indicam que sua expressão pode levar tanto a uma resposta imune antitumoral, ao causar apoptose das referidas células, quanto a apresentar funções pró-tumorais. No carcinoma existem inúmeras mutações e as mutações que ocorrem no HLA-DR são comuns, causando assim um mau prognóstico, mas tem-se verificado que o carcinoma do estômago representa uma exceção, onde os dados indicam que mutações específicas do MHC II estão associadas a um resultado mais favorável (YAVORSKI; BLANCK, 2017).

Um trabalho que avaliou a expressão do HLA classe I em 288 casos de NMGS, incluindo: CCA, CAME, cistadenocarcinoma, adenocarcinoma de células basais e ACP, associou uma alta expressão de HLA-A a tempos de sobrevida mais curtos (MÜLLER; AGAIMY; ZENK; ETTL et al., 2013)

Em relação ao antígeno Ki-67, também conhecido como MKI67, é uma proteína que está codificada no gene de mesmo nome. O gene Ki-67 está localizado no braço longo do cromossomo 10. Essa proteína está presente durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e durante toda a fase M do ciclo celular), mas ausente nas células em repouso ou não replicantes (TAKAGI; ONO; NATSUME; SAKAMOTO et al., 2018). Os anticorpos que detectam o antígeno Ki-67, portanto, reagem apenas com células em proliferação (LARSEN; BJØRNDAL; GODBALLE; KROGDAHL, 2012).

A grande maioria dos estudos que investigaram o significado prognóstico do Ki-67 mostraram que sua superexpressão se correlaciona com a sobrevida livre de metástase e a sobrevida global. Atualmente, o uso do Ki-67 como fator prognóstico

ou preditivo é controverso, principalmente pela falta de consenso sobre quais níveis de Ki-67 são considerados de pior prognóstico e por se basear em um método que gera muita variabilidade na interpretação entre laboratórios e observadores. Como acontece com todos os biomarcadores com valores contínuos, o valor que diferencia Ki-67 de tumores de alto e baixo grau é um tanto arbitrário. Foi sugerido que o valor de corte ideal para Ki-67 fosse 15%. No entanto, o uso rotineiro desse marcador na prática clínica não é recomendado devido à falta de reprodutibilidade adequada (COLLEMAN; TSONGALIS, 2009)

Em contrapartida, muitos estudos têm reconhecido seu valor como fator preditivo, demonstrando sua utilidade para mensurar a resposta a determinado tratamento adjuvante, além de níveis elevados de Ki-67 preverem melhor resposta ao tratamento quimioterápico. Quanto ao seu papel como fator prognóstico, altos níveis de Ki-67 estão associados a uma maior probabilidade de recidiva no carcinoma de mama em estágio inicial, independentemente do envolvimento dos linfonodos (DE AZAMBUJA; CARDOSO; DE CASTRO; COLOZZA et al., 2007). Em 2013, o Consenso Internacional de Especialistas de St. Gallen inclui o nível de expressão de Ki-67 como um marcador fenotípico para diferenciar entre os subtipos moleculares de carcinoma de mama, por exemplo, luminal A, tem uma baixa expressão Ki-67 ou menos de 20%, enquanto o luminal B apresenta valores elevados superiores a 20% (GOLDHIRSCH; WINER; COATES; GELBER et al., 2013).

Em epitélio oral sadio foi observado que a expressão de Ki-67 estava restrita às camadas basais; no caso de epitélios com diferentes graus de displasia, a coloração ocorreu nas camadas suprabasais e no carcinoma epidermoide localizou-se nas áreas periféricas e centrais das ilhas tumorais (TAKKEM; BARAKAT; ZAKARAIA; ZAID et al., 2018). Resultados semelhantes foram obtidos num estudo de 94 casos de displasias, onde a superexpressão do Ki-67 foi significativamente associada à recorrência e/ou transformação maligna do epitélio bucal (YAGYUU; OBAYASHI; UEYAMA; TAKANO et al., 2015).

Em relação às NGS, o Ki-67 é o marcador mais estudado para diferenciar neoplasias benignas de malignas e como fator prognóstico. A análise dos

marcadores Ki-67 e HER2/neu em 42 casos de CME obteve uma coloração forte para ambos os imunomarcadores em carcinomas de alto grau, enquanto carcinomas de baixo grau coraram fracamente ou negativamente; concluindo que a superexpressão de ambas as proteínas está associada a um tumor mais agressivo (NGUYEN; BLACK; HIER; CHAUVIN et al., 2003).

Em neoplasias benignas e malignas da GSM foi descrita pela primeira vez a expressão de Ki-67, PCNA e p53; mostrando que todos os AP foram negativos para Ki-67 e p53, mas 66% positivos para PCNA. O inverso ocorreu com o CME e CAC, que foram positivos para p53 em 53% e 20% e Ki-67 em 47% e 40%, respectivamente; enquanto todas as NMGS foram positivas para PCNA. O CME apresentara alta expressão desses imunomarcadores, uma vez que todos os tumores estudados com esse subtipo histológico eram de alto grau (ALVES; PIRES; DE ALMEIDA; LOPES et al., 2004)

Outra análise IHQ de 212 blocos de NMGS usando o marcador Ki-67 e p53 demonstrou que o CME e CCA apresentaram expressão inferior a 20% do Ki-67 e sobrevida superior a 5 anos. Já o CAC apresentou expressão de Ki-67 de 32% e menor sobrevida. Este estudo não avaliou ou correlacionou o grau histológico com a expressão dos marcadores. No caso do CAC, o valor preditivo do Ki-67 mostrou-se uma ferramenta confiável em termos de prognóstico a curto prazo (LUUKKAA; KLEMI; LEIVO; VAHLBERG et al., 2006)

Uma avaliação de 62 NMGS com o Ki-67 encontrou uma maior taxa de proliferação no CME, seguido do adenocarcinoma adenóide cístico e ACP, porém este estudo também não associou a expressão do Ki-67 ao grau histológico (DO PRADO; DA SILVA MACHADO; COLOMBO; CARVALHO, 2011). Um estudo em pacientes pediátricos que comparou a expressão de Ki-67 e MCM-3 em tumores benignos e malignos das glândulas salivares maiores mostrou uma maior expressão de MCM-3 em relação ao Ki-67. Eles concluíram que o MCM-3 poderia ser uma ferramenta alternativa ao Ki-67 para a avaliação da proliferação celular em vários tumores (ZIELIŃSKI; KOBOS; ZAKRZEWSKA, 2016).

2.2.2 PD-L1 E PD-L2

O sistema imunológico é uma ferramenta ideal para o tratamento do câncer devido a sua especificidade e plasticidade, com potencial para erradicar populações heterogêneas de células tumorais com toxicidade limitada ao tecido normal. A imunoterapia contra o câncer é regulada por vias denominadas “pontos de verificação imunológicos”. Em indivíduos saudáveis, essas vias conferem ao hospedeiro a plasticidade para montar uma resposta vigorosa aos antígenos, ao mesmo tempo em que limita a extensão e a duração da resposta, como um meio de prevenir a autoimunidade. A desregulação desses pontos de controle imunológico pode criar um ambiente permissivo para o desenvolvimento do câncer e pode ser utilizado por células cancerígenas e pelo microambiente tumoral, contribuindo assim para a tolerância imunológica e a evasão imune do tumor (PARDOLL, 2012).

Um ponto de verificação imunológico importante que regula negativamente as respostas imunes do hospedeiro é a morte celular programada 1 (PD-1). Em modelos animais de infecção viral crônica e em humanos infectados pelo HIV, as células T reativas ao vírus expostas cronicamente ao antígeno podem entrar em um estado de "exaustão" mediado até certo ponto pela expressão/ligação de PD-1 (DAY; KAUFMANN; KIEPIELA; BROWN *et al.*, 2006)

PD-1 possui dois ligantes, PD-L1 e PD-L2. PD-L1 e PD-L2 são expressos na superfície de células apresentadoras de antígenos (APCs) tais como macrófagos, células *natural killer* e CDs (FREEMAN; LONG; IWAI; BOURQUE *et al.*, 2000; LATCHMAN; WOOD; CHERNOVA; CHAUDHARY *et al.*, 2001) e também por células neoplásicas (KONISHI; YAMAZAKI; AZUMA; KINOSHITA *et al.*, 2004). Além disso, PD-L2 é expresso em células T ativadas (MESSAL; SERRIARI; PASTOR; NUNÈS *et al.*, 2011; TSENG; OTSUJI; GORSKI; HUANG *et al.*, 2001). A expressão de PD-L1 (B7-H1) e PD-L2 (B7-DC) pelas APCs regula a proliferação de células T, produção de citocinas e adesão celular (LATCHMAN; WOOD; CHERNOVA; CHAUDHARY *et al.*, 2001). Estas proteínas são reguladas positivamente em muitos tumores sólidos humanos, incluindo cânceres de cabeça e pescoço (LYFORD-PIKE; PENG; YOUNG; TAUBE *et al.*, 2013). Portanto, a via ativada PD1/PD-L1, PD-L2 permite que as células neoplásicas iludam o sistema de verificação imunológica (CHANG;

KIM; CHOI; CHO *et al.*, 2017; IWAI; ISHIDA; TANAKA; OKAZAKI *et al.*, 2002; KONISHI; YAMAZAKI; AZUMA; KINOSHITA *et al.*, 2004). Além disso, estudos pré-clínicos têm relatado uma maior predileção de PD-1 por PD-L2 do que por PD-L1 e uma expressão conjunta de PD-L1 e PD-L2 tem sido associada a um melhor bloqueio de PD-1 (GHIOOTTO; GAUTHIER; SERRIARI; PASTOR *et al.*, 2010).

A relevância do checkpoint PD-1:PD-L1 na imunidade ao câncer é destacado por relatórios que demonstram que o bloqueio de PD-1 ou PD-L1 por anticorpos monoclonais específicos pode reverter o quadro anérgico das células T tumor-específicas e, assim, aumentar a eficácia antitumoral imunidade (DONG; STROME; SALOMAO; TAMURA *et al.*, 2002). Estudos avaliando essa via em NGS são escassos. Em CAC, houve uma expressão aumentada de PD-L2 que poderia favorecer o escape tumoral e explicar o mau prognostico nestas neoplasias. Em CDS também foi relatado um prognostico desfavorável devido a uma alta expressão de PD-L1(SATO; AKIBA; KAWAHARA; NAITO *et al.*, 2018).

2.2.3 BCL-2 E BAX

Irregularidades nos mecanismos de morte celular programada ou apoptose contribuem para o desenvolvimento e progressão de carcinomas (ADAMS; CORY, 2007). A família BCL-2 é dividida em três grupos com base em sua função primária proteínas antiapoptóticas (BCL-2, BCL-XL, BCL-W, MCL-1, BFL-1/A1), pro-formadores de poros apoptóticos (BAX, BAK, BOK) e proteínas pró-apoptóticas BH3 (BAD, BID, BIK, BIM, BMF, HRK, NOXA, PUMA, etc.) (GOLDSTEIN; WATERHOUSE; JUIN; EVAN *et al.*, 2000; MCILWAIN; BERGER; MAK, 2015; TAIT; GREEN, 2010)

Os membros da família de genes do linfoma de células B2 (BCL-2) têm um papel central na regulação da morte celular programada, controlando os sinais intracelulares pró-apoptóticos e antiapoptóticos. No câncer, a evasão da apoptose por meio da desregulação de genes específicos da família BCL-2 é um evento recorrente; consequentemente, a inibição seletiva de proteínas específicas da família BCL-2 antiapoptóticas representa uma favorável oportunidade terapêutica (ASHKENAZI; FAIRBROTHER; LEVERSON; SOUERS, 2017)

A família de proteínas BCL-2 controla a morte celular principalmente por interações de ligação direta que regulam a permeabilização da membrana externa mitocondrial (MOMP) levando à liberação irreversível de proteínas do espaço intermembranar, ativação subsequente de caspase e apoptose (KALE; OSTERLUND; ANDREWS, 2018)

A expressão de BAX e BCL-2 tem sido associada com agressividade, sobrevida e progressão de neoplasias como câncer de próstata e mama, e algumas NGS (AZIMIAN; DAYYANI; TOOSSI; MAHMOUDI, 2018; GOMES; BERNARDES; DINIZ; DE MARCO *et al.*, 2012; LESSENE; CZABOTAR; COLMAN, 2008; MANJUNATHA; KUMAR; RAGHUNATH, 2011; RODRIGUEZ; WU; VOUTSINAS; FROMM *et al.*, 2020)

Este trabalho de tese pretende analisar algumas das principais vias e mecanismos que normalmente são utilizados pelo nosso sistema imunológico para manter uma homeostase, mas que em situações de carcinogêneses podem estar inibidos ou alterados em NGS.

3 JUSTIFICATIVA

Pesquisas voltadas para a compreensão dos processos de carcinogênese apontam que a resposta imunológica mediada por CDs, os checkpoints de proliferação celular, sinalizadores de apoptose assim como reguladores da inflamação podem estar comprometidos. Neste contexto, moduladores de morte celular programada têm sido associados com fenômenos de iniciação e progressão tumoral, além da regulação da resposta imune mediada por CDs. Como resultado destas descobertas, a estratégia anti-PD-L1/PD-L2 tem sido aplicada em diferentes terapias celulares para atuação em células da imunidade inata e adquirida, além de potenciais marcadores prognósticos e preditivos para pacientes portadores de câncer em cabeça e pescoço.

4 ARTIGO 1

TÍTULO: DIMINUIÇÃO DE CDS INTRATUMORAIS EM NEOPLASIAS MALIGNAS METASTÁTICAS DE GLÂNDULAS SALIVARES

Resumo

Introdução: As células dendríticas (CDs) representam um grupo de células apresentadoras de antígenos especializadas com papéis-chave na imunidade antitumoral.

Objetivo: Identificar e quantificar as CDs imaturas e maduras em neoplasias de glândulas salivares (NGS) e determinar sua correlação com achados clínico-patológicos.

Materiais e Métodos: Trinta e três neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) e vinte e dois adenomas pleomórficos (AP) foram analisados por IHQ para proteínas relacionadas ao antígeno leucocitário humano isotipo DR (HLA-DR), CD1a, CD83 e Ki-67. Células intra e peritumorais positivas foram quantificadas em todos os casos. Os prontuários clínicos e os laudos histopatológicos de todos os tumores foram avaliados.

Resultados: O grupo com NMGS apresentou menor densidade de células HLA-DR+ intratumorais do que o grupo com AP ($p = 0,001$). As NMGS metastáticas apresentaram menor quantificação de CD1a+ intratumorais do que as NMGS não metastáticas ($p = 0,001$). A proporção de células Ki-67-positivas foi significativamente maior em NMGS do que em AP ($p < 0,001$). No entanto, não foram encontradas diferenças nas células CD83+ intra e peritumorais entre as NGS benignas e malignas.

Conclusão: Esses resultados sugerem que a função imunoprotetora das CDs intratumorais poderia estar comprometida em NMGS. Os marcadores de CDs podem representar ferramentas úteis de previsão para metástases em NGS.

Relevância clínica: Este trabalho mostra que a diminuição da CDs intratumoral favorece a progressão das NGS e que a análise de CDs CD1a+ intratumorais pode prever metástase em NMGS.

Palavras-chave: Neoplasia de cabeça e pescoço. Neoplasia das glândulas salivares. Células dendríticas. antígeno CD83. antígeno CD1a. Antígeno HLA-DR1.

Introdução

As células dendríticas (CDs) são derivadas de precursores da medula óssea e desempenham um papel crucial na ativação da resposta imune e na vigilância do tumor. As CDs imaturas capturam antígenos no epitélio e os transportam para os linfonodos. Durante sua migração, as CDs maduras são recrutadas para a zona T dos órgãos linfoides e apresentam os antígenos aos linfócitos T [1].

As CDs infiltram diferentes neoplasias, incluindo neoplasias de glândulas salivares (NGS), influenciando o microambiente tumoral e as funções das células T antitumorais [2]. Uma relação direta entre a presença de CDs em vários tumores e o prognóstico tem sido relatada [3-5]. Embora as CDs maduras sejam escassas no estroma de vários tumores, uma alta população de CDs está associada a um melhor prognóstico [6].

As CDs, macrófagos e linfócitos no microambiente tumoral podem atuar como células pró-tumorais ou antitumorais em NGS e carcinoma epidermoide [7, 8]. A interação epitélio-mesenquimal é fundamental para o crescimento tumoral, e as CDs participam da regulação da resposta imune. Além disso, as células linfoides podem influenciar áreas com alto grau de malignidade, aumentando a taxa de proliferação celular em tumores da glândula parótida (GP) [9]. A ausência de CDs imaturas, como células de Langerhans (CLs), em neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS) indica falta de apresentação de antígenos, promovendo progressão tumoral [7]. Portanto, este estudo tem como objetivo investigar a infiltração de CDs em NGS com diferentes características clínicas.

Materiais e Métodos

Aprovação do comitê de ética

Este estudo foi realizado de acordo com a declaração de Helsinque pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (protocolo # 09840519.6.0000.0121) e da Universidade Autônoma da Baja Califórnia (UABC) (convênio 005/18). O consentimento informado foi obtido para experimentação com seres humanos.

Amostra

Trinta e três amostras de tecido de NMGS e 22 AP foram obtidos entre janeiro de 2006 e dezembro de 2020 provenientes do Hospital Geral Regional nº 1 (Tijuana, Baja California, México) e do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (Florianópolis, Santa Catarina, Brasil). Dados demográficos e clínicos foram obtidos dos prontuários clínicos e laudos histopatológicos, incluindo idade, sexo, localização, tamanho, diagnóstico histopatológico e classificação de metástases tumorais. Amostras de tecido foram fixadas em formol a 10% por mínimo de 24 h, e todos os fragmentos foram incluídos em blocos de parafina. Cortes dos blocos teciduais com 3 µm de espessura foram obtidos para análises histopatológicas e IHQ. Para esta última, os cortes foram montados em lâminas de vidro contendo 3-aminopropiltriethoxissileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA).

Análise histopatológica

Cada amostra foi analisada usando coloração de hematoxilina e eosina e com base nas características histopatológicas das NMGS e AP. A presença de invasão neural, invasão perivascular, necrose, componentes císticos, proliferação linfóide associada ao tumor (PLAT) e grau histopatológico também foram registrados. Os diagnósticos histopatológicos foram confirmados por dois patologistas bucais (R.G. e K.P.D), de acordo com a classificação de tumores de cabeça e pescoço da Organização Mundial da Saúde (OMS) (2017) [10].

Imuno-histoquímica

Os cortes teciduais foram desparafinizados com xilol, seguido de reidratação em concentrações decrescentes de álcool. Na sequência, atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela imersão das lâminas em dois banhos contendo peróxido de hidrogênio a 6% diluído em álcool metílico por 20 e depois 10 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em tampão citrato (pH 6,0) a 96°C por 40 minutos. As lâminas foram incubadas por 18 horas a 8 °C em uma câmara umidificada com os anticorpos monoclonais primários de camundongo contra antígeno leucocitário humano relacionado a isotipo DR (HLA-DR; TAL.1B5, 1:50; Dako, Califórnia, EUA), CD1a (010, 1:100; Dako, Califórnia, EUA) e CD83 (1H4b, 1:50; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, Reino Unido) para corar as CDs. Anticorpos HLA-DR e CD1a foram usados para coloração de CDs imaturas, enquanto CD83 foi usado para identificar as CDs maduras. A proliferação celular foi avaliada usando o anticorpo anti-Ki-67 (MIB-1, 1:150; Dako, Califórnia, EUA). Subsequentemente, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas por 60 min em temperatura ambiente com o anticorpo secundário usando o EnVision/Dual-Link System-HRP (K4065, Dako, EUA) e posteriormente reveladas usando um substrato cromogênico (3,3 diaminobenzidina, K3468; DAB, Califórnia, EUA). Controles negativos e positivos foram incluídos durante as reações imuno-histoquímicas de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise microscópica

Dez campos de cada lâmina foram capturados com ampliação de 400x em um microscópio óptico trinocular (Axiostar Plus; Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha) acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (14,3 MB; Opticam Camera, Seul, Coréia) e um microcomputador (AOC, Miami, EUA), onde as imagens foram armazenadas. O software ImageJ 1.53a (National Institutes of Health, Maryland, EUA) foi usado para quantificar células CD1a+, CD83+ e HLA-DR+ por área nos compartimentos intra e peritumoral (células/mm²). O índice de proliferação Ki-67 celular das seções tumorais foi calculado dividindo o número (de células Ki-67+ pelo número total de células contadas (1000 células por caso). O local de marcação

considerado positivo foi a membrana e/ou citoplasma para os anticorpos CD1a, CD83 e HLA-DR. Para Ki-67, a coloração nuclear marrom foi considerada positiva.

Análise estatística

As características clínico-patológicas foram analisadas por meio do teste t de Student, o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. As distribuições foram significativamente não normais ($p < 0,05$) para as variáveis IHQ (HLA-DR, CD1a, CD83 e Ki-67), de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para as análises quantitativas, seguidos pelo teste *post hoc* de Dunn. O teste de correlação de Spearman foi usado para avaliar o índice Ki-67 e os imunomarcadores. A análise estatística foi realizada por meio do software SPSS versão 23.0 (IBM, Nova York, Estados Unidos), e o nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

Resultados

População de pacientes

Trinta e três casos de NMGS e 22 casos de AP foram incluídos no grupo comparativo. A distribuição por sexo foi semelhante nos dois grupos ($p = 0,587$), com média de idade de 41,86 anos nas NMGS e 49,27 anos nos AP ($p = 0,090$). Embora a GP tenha sido o local mais frequente em ambos os grupos, uma maior proporção de NMGS foi identificada nas GSm do que nos AP. Os dados clínicos adicionais são mostrados na **Tabela 1**.

Tabela 1. Características clínicas dos pacientes com neoplasias de glândulas salivares.

Características	NMGS (n=33)	AP (n=22)	p-valor
Sexo (n [%])			
Masculino	15 (45,5)	11 (50,0)	,587 ^a
Feminino	18 (54,5)	11 (50,0)	
Idade, media ± DP (anos)	41,86 ± 15,22	49,27 ± 15,83	,090 ^b
Localização (n [%])			
Glândula parótida	22 (66,7)	16 (72,7)	,048 ^c
Glândula sublingual	2 (6,1)	0 (0,0)	
Glândula submandibular	1 (3,0)	5 (22,7)	
Glândula salivar menor	8 (24,2)	1 (4,6)	
Tamanho do tumor (cm), mediana (IIQ)	3,00 (4,50)	3,75 (3,00)	,931 ^d

NMGS, neoplasias malignas de glândula salivar; AP, adenomas pleomórficos; DP, desvio padrão IIQ, intervalo interquartil. ^ateste exato de Fisher; ^bteste t de Student; ^cteste qui-quadrado; ^dteste de Mann-Whitney.

Fonte: elaborada pelos autores

O diagnóstico histopatológico mais frequente nas NMGS foi o CAC, presente em 10 participantes de pesquisa (30,3%), seguido pelo CME, presente em 8 casos (24,3%) e CCA, que foi encontrado em 4 casos (12%). Três indivíduos (9,1%) tinham CAEXAP e 3 (9,1%) CS. Também, houve dois casos (6,1%) de CAME, dois (6,1%) de CLE e um (3%) de adenocarcinoma SOE. O grau histopatológico de CME mais frequente foi o intermediário, com quatro casos (50%), seguido de baixo e alto grau de malignidade (2/25% cada).

Seis (18,1%) dos 33 indivíduos com NMGS apresentaram metástases: quatro (66,6%) no pulmão, um (16,7%) nos linfonodos cervicais e um (16,7%) acometendo concomitantemente os linfonodos pulmonares e cervicais. Entre os 6 casos com metástase, 4 (66,6%) corresponderam a CAC, 1 (16,7%) a CME de grau intermediário e 1 (16,7%) a CAEXAP. Entre os 22 casos de AP, foram identificadas 12 neoplasias (54,5%) com subtipo misto (mixóide/condromixoide) e 4 (18,2%) com estroma mixóide. Seis casos de AP não apresentaram metaplasia (27,2%), e metade dos quais apresentou alta hiperplasia.

As neoplasias benignas e malignas apresentaram infiltrados inflamatórios mononuclear, principalmente do tipo linfocítico, localizados no estroma com distribuição focal. Em relação às características das NMGS, a invasão vascular (70%) foi maior do que a invasão perineural (48,5%), assim como uma baixa proporção de necrose (7/33, 21,2%).

Células CD1a+, CD83+ e HLA-DR+

Os antígenos CD1a e CD83 identificaram CDs imaturas e maduras, respectivamente. Embora não tenham sido identificadas diferenças significativas, as NMGS tenderam a ter uma menor quantificação de células CD1a+ e CD83+ intratumorais do que os AP ($p = 0,081$ e $0,070$, respectivamente). Também houve uma tendência de diminuição de células CD1a+ peritumorais nos AP quando comparado com as NMGS ($p = 0,072$). Interessantemente, as NMGS com metástase à distância tiveram menos células CD1a+ intratumorais do que NMGS sem metástase ($p = 0,001$). O CS e CAEXAP foram as NMGS que apresentaram a maior quantidade de CDs CD1a+ ($p=0.008$).

As NMGS apresentaram um número significativamente menor de células HLA-DR+ intratumorais do que o grupo AP ($p < 0,001$). Ainda, o número de células expressando HLA-DR nos compartimentos peritumorais foi semelhante entre os grupos ($p = 0,993$). Dados adicionais são apresentados nas **Tabelas 2 e 3**.

Tabela 2. Quantificação de células CD1a+, CD83+, HLA-DR+ (células/mm²) nos compartimentos intra e peritumoral de neoplasias de glândulas salivares e índice Ki-67

Anticorpo (localização)	NMGS (n=33)	AP (n=22)	p-valor*
	Mediana (IIQ)	Mediana (IIQ)	
CD1a (IT)	120,63 (206,35)	196,82 (160,32)	0,081
CD1a (PT)	50,79 (123,81)	0,0 (80,95)	0,072
CD83 (IT)	88,88 (79,37)	123,80 (88,89)	0,070
CD83 (PT)	19,04 (50,79)	0,0 (46,03)	0,399
HLA-DR (IT)	171,42 (88,89)	288,88 (166,67)	< 0,001
HLA-DR (PT)	38,09 (111,11)	25,39 (161,90)	0,993
Ki-67 (%)	5,92 (11,05)	1,43 (1,50)	< 0,001

NMGS, neoplasias malignas de glândula salivar; AP, adenomas pleomórficos; PT, peritumoral; IT, intratumoral; IIQ, intervalo interquartil; *Teste de Mann-Whitney.

Fonte: Elaborada pelos autores

Tabela 3. Quantificação de células CD1a+, CD83+, HLA-DR+ (células/mm²) nos compartimentos intra e peritumoral de tumores malignos de glândula salivar metastáticos e não metastáticos.

Anticorpo (localização)	M0 (n=27)	M1 (n=6)	p-valor*
	Mediana (IIQ)	Mediana (IIQ)	
CD1a (IT)	165,07 (177,78)	3,17 (55,56)	0,001
CD1a (PT)	57,14 (126,98)	0,00 (34,92)	0,080
HLA-DR (IT)	165,07 (82,54)	225,39 (112,70)	0,120
HLA-DR (PT)	38,09 (101,59)	0,00 (214,29)	0,768
CD83 (IT)	88,88 (76,19)	95,23 (126,98)	0,665
CD83 (PT)	6,34 (50,79)	31,74 (28,57)	0,281
Ki-67 índice	5,92 (12,36)	8,02 (16,07)	0,768

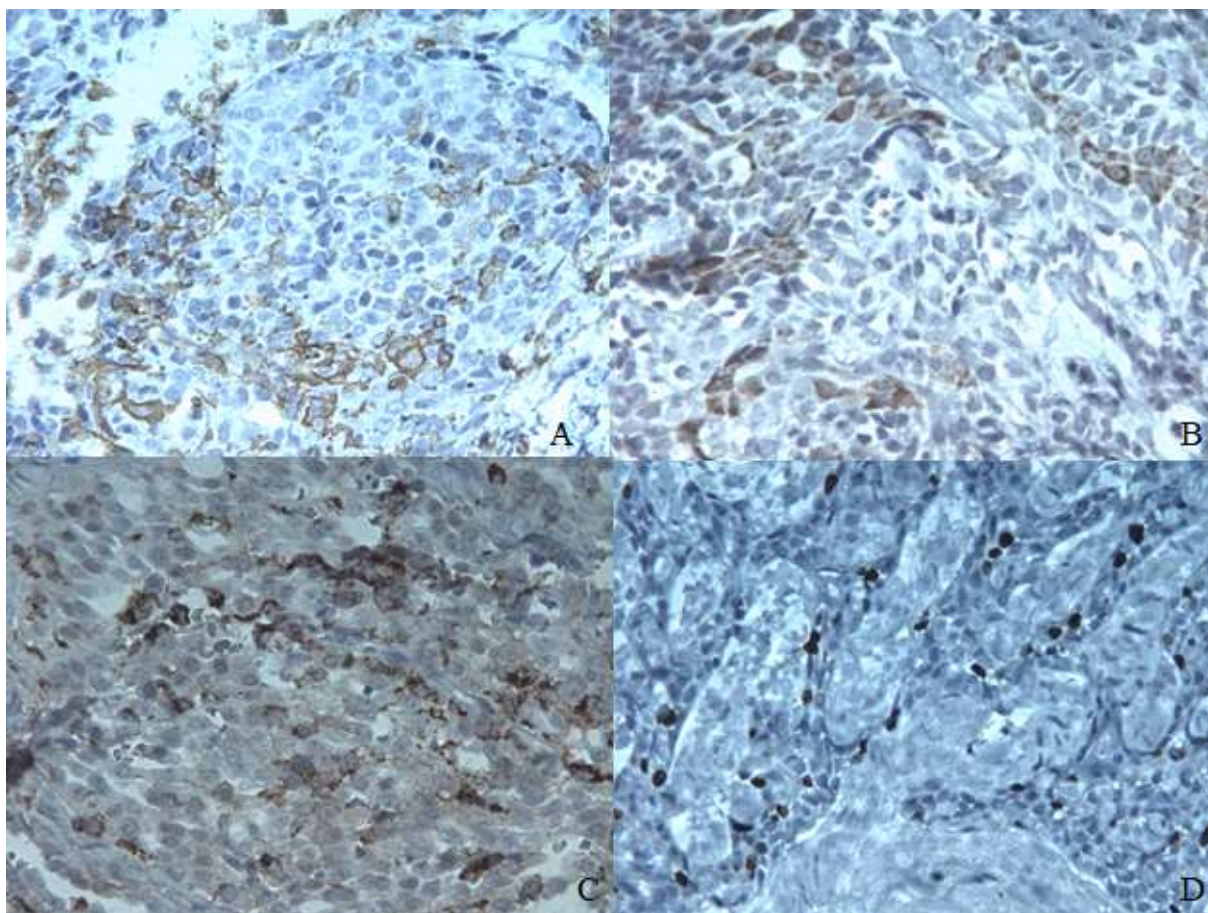
M0: sem metástase a distância; M1: metástase a distância; IT: intratumoral; PT: peritumoral; *Teste de Mann-Whitney.

Fonte: Elaborada pelos autores

Proliferação Celular

A imunoexpressão do Ki-67 foi significativamente maior nas NMGS do que nos AP ($p < 0,001$). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os diferentes tipos histológicos de NMGS. Não houve correlação entre o índice Ki-67 e a imunoexpressão dos marcadores CD1a, CD83 e HLA-DR ($p > 0,052$). Amostras histológicas representativas são apresentadas na **Figura 1**.

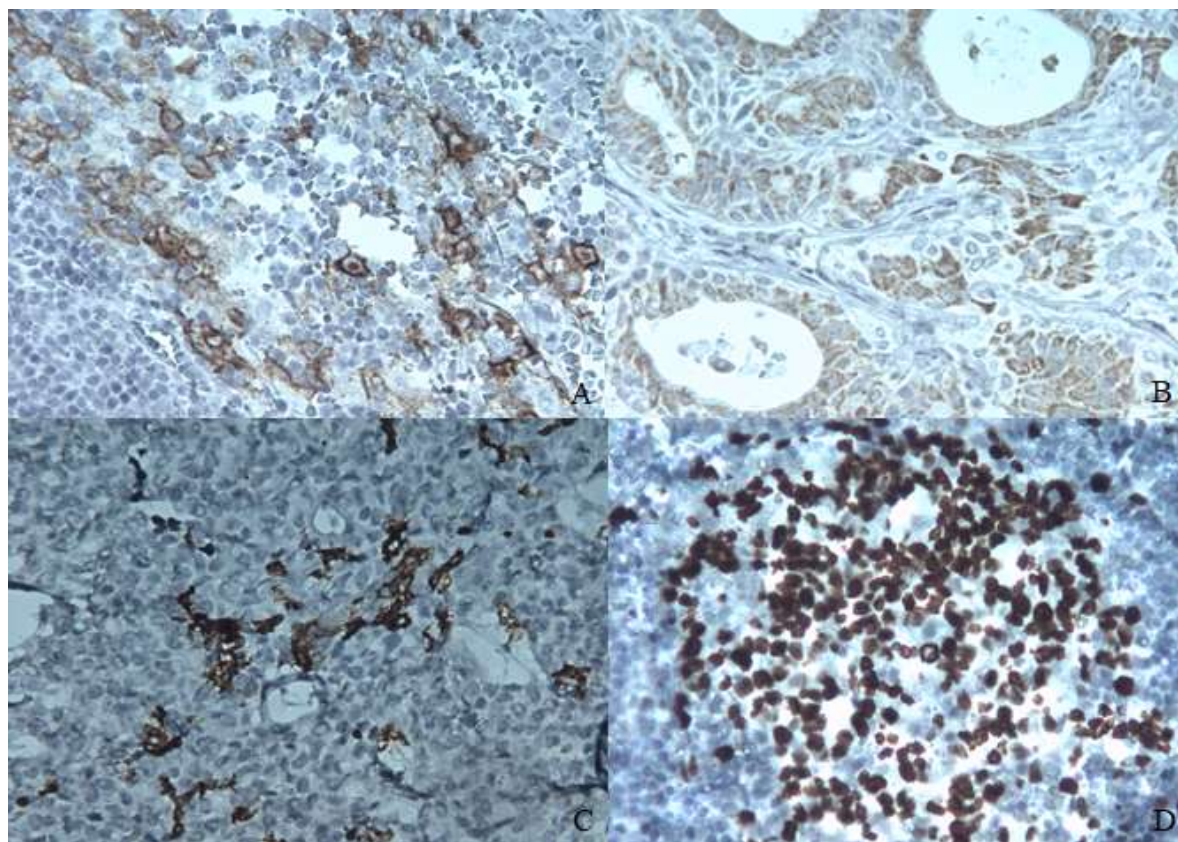
Figura 1. Imunoexpressão dos anticorpos CD1a, CD83, HLA-DR e Ki-67 em adenomas pleomórficos.



Imunoexpressão de membrana e citoplasmática de CD1a (A), CD83 (B), HLA-DR (C). Imunoexpressão nuclear de Ki-67 (D) (40x).

Fonte: elaborado pelos autores

Figura 2. Imunoexpressão dos anticorpos CD1a, CD83, HLA-DR e Ki-67 em neoplasias malignas de glândula salivar.



Imunoexpressão de membrana e citoplasmática de CD1a (A), CD83 (B) e HLA-DR (C). Imunoexpressão nuclear de Ki-67 (D) (40x).

Fonte: elaborado pelos autores

Discussão

O presente estudo observou um papel significativo das CDs no comportamento das NGS. A quantificação de CDs CD1a⁺ em NMGS tem um impacto notável no prognóstico. Nossos resultados mostraram que pacientes com menor número de células CD1a⁺ intratumorais apresentaram maior risco de metástase. Além disso, a quantificação de células HLA-DR⁺ intratumorais e o índice de proliferação tumoral Ki-67 podem ser ferramentas adicional para diferenciar NGS benignas e malignas. Acidificação, acúmulo de lactato e lipídios, privação de triptofano e hiperglicólise são algumas das alterações que comprometem a atividade imune das CDs em muitos tumores, resultando em escape imune tumoral [11]. Essas condições podem ter diferentes implicações clínicas, como maior chance de metástase em NMGS.

Este trabalho confirmou infiltrados inflamatórios como uma característica frequente, predominantemente do tipo linfocítico. A PLAT é encontrada com mais frequência em neoplasias malignas, uma vez que o metabolismo epitelial contribui para o acúmulo de tecido linfóide, produzindo antígenos que provocam uma resposta linfocitária exagerada [12]. Além disso, a presença de PLAT em NMGS em estágios iniciais está associada a um melhor prognóstico e a uma maior taxa de sobrevida [9, 13].

A presença, número e grau de maturação de CDs intra e peritumorais são características críticas para a regulação do crescimento das NMGS. No compartimento intratumoral houve uma tendência dos AP apresentarem maior quantificação de CDs CD1a+ imaturas do que as NMGS ($p = 0,081$). Dutra e cols. demonstraram uma proporção significativamente maior de CDs CD1a intratumorais em AP do que NMGS ($p = 0,001$) [7]. NMGS expressam substâncias inibitórias, como o ligante de morte celular programada 1, que diminui o número de CDs, facilitando a proliferação tumoral e a metástase [14, 15].

Nesta pesquisa, a CS e CAEXAP foram as NMGS que apresentaram a maior quantidade de CDs CD1a+. Devido à Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS de 2017, alguns casos previamente relatados como adenocarcinomas ou CCA foram reclassificados como CS, inviabilizando a comparação com nossos casos. Também a pequena amostra destas NMGS em nosso estudo tornou difícil fazer comparações com estudos anteriores. No entanto, as entidades mencionadas são neoplasias que compartilham a capacidade de produzir metástases à distância, o que explicaria parcialmente a perda da capacidade de maturação das CDs e a consequente falha imunológica [10].

No nosso estudo, os AP apresentaram maior quantidade de CDs maduras intratumorais. Em carcinoma epidermóide de cavidade oral foi relatada uma menor imunoexpressão de CDs CD83+, e em NMGS, um estudo observou uma menor imunoexpressão de CDs CD83+ em CAC [16, 17]. Esses resultados sugerem que a perda de CDs maduras possa estar associado com a progressão dos tumores. De acordo com alguns pesquisadores, o antígeno CD83 também pode ter propriedades

imunossupressoras quando expresso pelas células cancerosas, facilitando o crescimento tumoral [18].

O número médio de células expressando HLA-DR intratumoral foi menor em NMGS do que em AP ($p < 0,001$). Em linfoma gástrico não-Hodgkin, uma expressão negativa de HLA-DR esteve relacionada com uma pior sobrevida [19]. A baixa expressão de moléculas HLA classe I em células tumorais poderia interferir diretamente na disseminação metastática [20]. A baixa expressão tumoral de HLA-DR tem sido associada à evasão tumoral do sistema imunológico devido a três possíveis mecanismos: 1) alterações oncogênicas associadas a vírus que produzem alterações fenotípicas no HLA-DR, 2) ausência de um receptor específico nas células NK que impossibilita sua interação com diferentes moléculas HLA, e 3) heterogeneidade na população celular em tumores com múltiplas variantes e com diferentes fenótipos HLA [21]. Esses mecanismos são raros em tumores benignos e altamente eficientes em malignidades [22].

A imunoexpressão do Ki-67 esteve presente em NMGS e AP, com mediana de 5,9 em NMGS e 1,4 em AP, onde CAEXAP apresentou uma das maiores medianas para proliferação celular (12,0). Esses dados são comparáveis aos de um estudo prévio brasileiro, no qual a expressão de Ki-67 foi significativamente maior em áreas carcinomatosas de CAEXAP do que em AP ($p < 0,001$), confirmando seu valor como marcador de proliferação celular [23]. Resultados semelhantes foram obtidos por Faur *et al.* (2015), que estudaram 40 casos de NGS, onde 72% dos casos apresentaram imunoexpressão de Ki-67, com CAEXAP apresentando maior positividade para este imunomarcador, corroborando o presente estudo [24]. Um estudo mais recente também relatou um maior índice de expressão de Ki-67 em neoplasias malignas em comparação com neoplasias benignas de glândula salivar [25]. Em contraste, um estudo dinamarquês relatou o CAEXAP com valores medianos mais baixos de coloração Ki-67 do que CAC, adenocarcinoma SOE e carcinoma de células escamosas (28, 47 e 78, respectivamente) [26]. Além disso, em um estudo italiano, a imunoexpressão do Ki-67 foi observada apenas em 9 dos 21 casos de CAC [27]. A variabilidade dos resultados em relação à imunoexpressão

do Ki-67 pode ser uma evidência de que a diminuição da taxa de proliferação celular nem sempre está relacionada a um tumor de baixo grau [28].

Segundo alguns autores, valores elevados de Ki-67 sugerem agressividade tumoral e prognóstico desfavorável [28, 29]. A superexpressão de Ki-67 suporta o modelo de carcinogênese, pois mostra perda de controle da proliferação celular devido ao acúmulo de alterações genéticas [30]. Portanto, este marcador pode ser útil como ferramenta diagnóstica adjuvante, especialmente para NGS que apresentam variações histopatológicas complexas [31]. No presente estudo também não encontramos correlação entre o índice Ki-67 e a quantificação de CDs maduras e imaturas em NGS.

O desenvolvimento e a progressão do câncer são controlados por um ecossistema altamente complexo composto por células imunes adaptativas e inatas. A interação dessas células imunes com o tumor tem sido associada a diferentes estágios da tumorigênese, como instabilidade genômica, indução de proliferação de células cancerígenas, angiogênese e metástase [16, 32-34]. Assim, o conhecimento da participação das CDs em diferentes estágios de maturação em NGS pode contribuir como uma importante ferramenta prognóstica e um possível alvo para terapias antineoplásicas.

Conclusão

As CDs intratumorais podem representar uma importante linha de defesa contra a infiltração de NMGS. Nossos dados sugerem que a identificação e quantificação de CDs no compartimento intratumoral das NGS pode ser útil para distinguir entidades benignas de malignas assim como avaliar o risco de disseminação metastática.

Referências

1. Devi, K.S. and N. Anandasabapathy, *The origin of DCs and capacity for immunologic tolerance in central and peripheral tissues*. Semin Immunopathol, 2017. **39**(2): p. 137-152.
2. Tang, M., J. Diao, and M.S. Cattral, *Molecular mechanisms involved in dendritic cell dysfunction in cancer*. Cell Mol Life Sci, 2017. **74**(5): p. 761-776.
3. Broz, M.L., et al., *Dissecting the Tumor Myeloid Compartment Reveals Rare Activating Antigen-Presenting Cells Critical for T Cell Immunity*. Cancer Cell, 2014. **26**(6): p. 938.
4. Truxova, I., et al., *Mature dendritic cells correlate with favorable immune infiltrate and improved prognosis in ovarian carcinoma patients*. J Immunother Cancer, 2018. **6**(1): p. 139.
5. Michea, P., et al., *Adjustment of dendritic cells to the breast-cancer microenvironment is subset specific*. Nat Immunol, 2018. **19**(8): p. 885-897.
6. Reichert, T.E., et al., *The number of intratumoral dendritic cells and zeta-chain expression in T cells as prognostic and survival biomarkers in patients with oral carcinoma*. Cancer, 2001. **91**(11): p. 2136-47.
7. Dutra, F.K., et al., *Immunohistochemical assessment of CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in minor salivary gland tumors*. J Oral Pathol Med, 2012. **41**(1): p. 47-53.
8. Jardim, J.F., et al., *A decreased peritumoral CD1a+ cell number predicts a worse prognosis in oral squamous cell carcinoma*. Histopathology, 2018. **72**(6): p. 905-913.
9. Velicković, L.J., et al., *Stromal reaction and prognosis in acinic cell carcinoma of the salivary gland*. Vojnosanit Pregl, 2013. **70**(12): p. 1155-8.
10. El-Naggar, A., et al., *WHO Classification of Head and neck tumours*. 4th ed ed. 2017.
11. Peng, X., et al., *Metabolism of Dendritic Cells in Tumor Microenvironment: For Immunotherapy*. Front Immunol, 2021. **12**: p. 613492.
12. Auclair, P.L., *Tumor-associated lymphoid proliferation in the parotid gland. A potential diagnostic pitfall*. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1994. **77**(1): p. 19-26.
13. Ellis, G.L., *Lymphoid lesions of salivary glands: malignant and benign*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2007. **12**(7): p. E479-85.
14. Harada, K., T. Ferdous, and Y. Ueyama, *PD-L1 expression in malignant salivary gland tumors*. BMC Cancer, 2018. **18**(1).

15. Soma, L., V.A. LiVolsi, and Z.W. Baloch, *Dendritic interstitial and myofibroblastic cells at the border of salivary gland tumors*. Arch Pathol Lab Med, 2001. **125**(2): p. 232-6.
16. Mosconi, C., et al., *Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands*. Oral Oncol, 2019. **88**: p. 95-101.
17. Costa, N.L., et al., *Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2016. **45**(6): p. 418-24.
18. Baleeiro, R.B., et al., *Expression of a dendritic cell maturation marker CD83 on tumor cells from lung cancer patients and several human tumor cell lines: is there a biological meaning behind it?* Cancer Immunology, Immunotherapy, 2007. **57**(2): p. 265-270.
19. Darom, A., et al., *HLA-DR antigen and bax protein expression in patients with primary non-Hodgkin's gastric lymphoma*. Hybrid Hybridomics, 2004. **23**(2): p. 87-92.
20. Ruiz-Cabello, F. and F. Garrido, *HLA and cancer: from research to clinical impact*. Immunol Today, 1998. **19**(12): p. 539-42.
21. Lei, W.-Y., et al., *Total HLA Class I Antigen Loss with the Downregulation of Antigen-Processing Machinery Components in Two Newly Established Sarcomatoid Hepatocellular Carcinoma Cell Lines*. Journal of Immunology Research, 2018. **2018**: p. 1-12.
22. Mariano, F.V., et al., *Cellular Proliferation Index between Carcinoma Ex-Pleomorphic Adenoma and Pleomorphic Adenoma*. Brazilian Dental Journal, 2015. **26**(4): p. 416-421.
23. Faur, A.C., et al., *Ki-67 and p53 immunostaining assessment of proliferative activity in salivary tumors*. Rom J Morphol Embryol, 2015. **56**(4): p. 1429-39.
24. Bussari, S., et al., *Immunohistochemical Detection of Proliferative Marker Ki-67 in Benign and Malignant Salivary Gland Tumors*. J Contemp Dent Pract, 2018. **19**(4): p. 375-383.
25. Bjørndal, K., et al., *Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA)*. Oral Oncol, 2011. **47**(7): p. 677-82.
26. Carlinfante, G., et al., *P53, bcl-2 and Ki-67 expression in adenoid cystic carcinoma of the palate. A clinico-pathologic study of 21 cases with long-term follow-up*. Pathol Res Pract, 2005. **200**(11-12): p. 791-9.
27. Larsen, S.R., et al., *Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas*. J Oral Pathol Med, 2012. **41**(8): p. 598-602.

28. Vacchi-Suzzi, M., et al., *Ki-67 proliferation rate as a prognostic marker in major salivary gland carcinomas*. Ann Otol Rhinol Laryngol, 2010. **119**(10): p. 677-83.
29. Jiang, Y.-H., et al., *The prognostic significance of p63 and Ki-67 expression in myoepithelial carcinoma*. Head & Neck Oncology, 2012. **4**(1): p. 9.
30. Díaz, K.P., et al., *Fatty acid synthase and Ki-67 immunoexpression can be useful for the identification of malignant component in carcinoma ex-pleomorphic adenoma*. J Oral Pathol Med, 2019. **48**(3): p. 232-238.
31. Lavareze, L., et al., *Salivary gland cancer in the setting of tumor microenvironment: Translational routes for therapy*. Crit Rev Oncol Hematol, 2022. **171**: p. 103605.
32. Egal, E.S.A., et al., *Tumor microenvironment in salivary gland carcinomas: An orchestrated state of chaos*. Oral Oncol, 2022. **127**: p. 105777.
33. Gonzalez, H., C. Hagerling, and Z. Werb, *Roles of the immune system in cancer: from tumor initiation to metastatic progression*. Genes Dev, 2018. **32**(19-20): p. 1267-1284.

5 ARTIGO 2

Título: PD-L2 como marcador prognóstico de metástase em tumores malignos de glândulas salivares.

Resumo

Introdução: Os ligantes de morte celular programada 1 (PD-L1) e 2 (PD-L2) têm sido investigados como essenciais para a agressividade biológica em malignidades humanas.

Objetivos: O presente estudo teve como objetivo comparar a imunexpressão de PD-L1 e PD-L2 em neoplasias de glândulas salivares (NGS) benignas e malignas.

Materiais e Métodos: Quarenta e três neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS), 61 adenomas pleomórficos (AP) e cinco amostras de glândulas salivares normais (GSN) foram analisadas por IHQ para os anticorpos anti-PD-L1 e anti-PD-L2. Foram analisadas associações entre parâmetros clínico-patológicos e expressões PD-L1/PD-L2. O H-score também foi avaliado multiplicando-se a intensidade da imunocoloração pela porcentagem de células positivas.

Resultados: Nossos resultados sugeriram que uma menor imunomarcagem de PD-L2 em NMGS está associada a um menor risco de metástase à distância ($p = 0,018$). Nenhuma associação significativa foi encontrada entre o perfil de imunomarcagem de PD-L1 e as características clínicas.

Conclusões: PD-L2 pode ter um valor prognóstico significativo na avaliação de metástases em NGS.

Palavras-chave: Neoplasias das Glândulas Salivares; Inibidores de Checkpoint Imunológico; Antígeno B7-H1; Antígeno B7-DC; Proteína 2 Ligante de Morte Celular Programada 1; Proteína 1 Ligante de Morte Celular Programada 1

Introdução

As neoplasias malignas das glândulas salivares (NMGS) representam 0,5% de todos os cânceres e menos de 8% dos carcinomas de cabeça e pescoço em todo o mundo [1, 2]. De acordo com a Organização Mundial da Saúde, as NMGS apresentam mais de 20 subtipos histopatológicos com significativa heterogeneidade [3]. Devido aos comportamentos biológicos complexos desses tumores, o curso clínico é variável e muitas vezes imprevisível. As NMGS frequentemente têm recorrência local e metástases a distância [4]. As lesões localizadas são tratadas cirurgicamente [5], e algumas vezes com rádio e/ou quimioterapia adjuvantes, e apresentam alta taxa de recorrência pós-operatória em 5 anos [6].

A terapia alvo molecular tem sido relatada em muitos cânceres, baseadas na inibição do Antígeno 4 do Linfócito T Citotóxico (CTLA-4) e ligantes da molécula PD-1 e PD-2 [7, 8]. As expressões de ligantes de morte celular programada 1 (PD-L1) e 2 (PD-L2) por células tumorais resultam em exaustão de células T e interferência com o microambiente tumoral [8]. Além disso, os inibidores do checkpoint imunológico das células apresentadoras de antígeno, PD-L1 e PD-L2, regulam a produção de citocinas e a adesão celular. Portanto, as vias PD1/PD-L1 e PD-L2 ativadas permitem que as células neoplásicas evadam o sistema imunológico [9-11].

A expressão de PD-L1 e PD-L2 tem sido associada a prognósticos e diferentes comportamentos biológicos em tumores de cabeça e pescoço [12-14]. No entanto, a relação entre a expressão concomitante de PD-L1 e PD-L2 em NGS e o comportamento clínico não é muito clara [9, 15]. O presente estudo teve como objetivo investigar a associação entre os achados clínico-patológicos das NGS e a expressão de PD-L1 e PD-L2.

Materiais e métodos

De acordo com a declaração de Helsinki, este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina (#09840519.6.0000.0121) e da Universidade Autônoma da Baja Califórnia da Universidade Autônoma da Baja Califórnia (Convênio 005/18). Quarenta e três casos representativos de NMGS, 61 AP e 5 de GSN foram obtidos entre janeiro de 2006 e

dezembro de 2020 no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) e na Universidade Autônoma da Baja Califórnia-Hospital General Regional #1 del Instituto Mexicano del Seguro Social (UABC-HGR #1 IMSS). Os relatórios médicos e anatomopatológicos de todos os participantes da pesquisa foram analisados. Todas as lâminas foram examinadas por dois patologistas experientes (K.P.D. e R.G.).

Imuno-histoquímica

Foram usados cortes de tecido de 3 µm de espessura fixados em formalina e incluídos em parafina, montados em lâminas de vidro contendo 3-aminopropiltriethoxissileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os cortes foram desparafinizados com xilol, seguido de reidratação em concentrações decrescentes de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela subsequente imersão das lâminas em dois banhos contendo peróxido de hidrogênio a 6% diluído em álcool metílico por 20 e depois 10 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em tampão citrato (pH 6,0) a 96°C por 40 minutos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários contra PD-L1 (coelho monoclonal, clone 28-8, 1:200; Abcam, Cambridge, Reino Unido) e PD-L2 (coelho policlonal, 1:100; Abcam, Cambridge, Reino Unido) durante 18 horas a 8 °C em uma câmara umidificada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas por 60 min em temperatura ambiente com um anticorpo secundário utilizando o EnVision/Dual Link System-HRP (K4065, Dako, EUA) e reveladas com um substrato cromogênico (K3468, DAB, Califórnia, EUA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris. Controles negativos e positivos foram incluídos durante as reações imuno-histoquímicas de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise imuno-histoquímica

A intensidade de coloração foi classificada de 0 a 3 (0, negativo; 1, fraco; 2, moderado; 3, forte) e a porcentagem de células coradas positivamente foi atribuída de 0 a 3 (0 = negativo; 1 = <25%; 2 = 25-50% e 3 = > 50%) por dois examinadores calibrados e cegos (R.G. e A.G.G.C). O H-score também foi calculado para avaliar a

expressão da proteína neoplásica em relação a intensidade da imunomarcação e porcentagem de células positivas [9].

Análise estatística

O teste Qui-quadrado foi realizado para comparar as características IHQ, clínicas e histopatológicas das NGS. O software IBM SPSS Statistics for Windows, versão 23.0 (IBM Corporation, Armonk, NY, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas. Um valor de $P < 0,05$ (5%) foi o limiar de significância estatística.

Resultados

Características dos participantes de pesquisa

O grupo de NMGS foi composto por 21 homens (48, 8%) e 22 mulheres (51,1%) com idade média de 48,0 anos (variando de 21 a 85 anos). Entre as 43 NMGS, o CAC foi o subtipo mais comum (15 casos, 43,88%), seguido por 12 casos (27,90%) de CME, 4 casos (9,30%) CCA, 4 casos (9,30%) de CAEXAP, 4 casos (9,30%) de CS, 2 casos (4,65%) de CAME e 2 (4,65%) de CLE. O grau histopatológico de CME mais frequente foi o intermediário com 6 casos (50%), seguido de baixo grau com 5 casos (41,6%) e alto grau com 1 caso (8,3%). A GP foi o local de tumor primário mais comum (22 pacientes, 51,16%), seguido pelas GSm (18 pacientes, 41,86%), dois pacientes (4,65%) na GSM e um paciente (2,32%) em GSL.

Seis (13,9%) dos 43 indivíduos com NMGS apresentaram metástases: 4 (9,3%) no pulmão, 1 (2,3%) nos linfonodos cervicais e 1 (2,3%) acometendo concomitantemente os linfonodos pulmonares e cervicais. Entre os 6 casos com metástase, 4 (66,6%) corresponderam a CAC, 1(16,6%) a CME de grau intermediário e 1(16,6%) a CAEXAP.

No grupo de AP, 37,5% eram do sexo masculino e 62,5% do sexo feminino, com idade média de 40,8 anos (variando de 12-74). A GP foi o local mais frequente (34 pacientes, 55,73%), seguido por GSm (19 pacientes, 31,14%) e GSM (5 pacientes, 8,19%). O grupo de GSN envolveu três homens (60%) e duas mulheres

(40%) com idade média de 47,2 anos (variando de 21-68). Todos os cinco casos estavam em GSm. Achados clínico-patológicos adicionais se apresentam na **Tabela 4**.

Tabela 4. Correlação entre a porcentagem de células positivas PD-L1/PD-L2 e as características clínico-patológicas de todos os grupos.

		Total	PD-L1				p*	Total	PD-L2				p*
		(n)	0%	-25%	25-50%	+50%		(n)	0%	-25%	25-50%	+50%	
Diagnóstico													
	NMGS	43	32 (74,4)	8 (18,6)	2 (4,7)	1 (2,3)	,704	43	26 (60,4)	14 (32,6)	2 (4,7)	1 (2,3)	,424
	AP	61	48 (78,7)	9 (14,8)	3 (4,9)	1 (1,6)		61	32 (52,4)	22 (36,1)	3 (4,9)	4 (6,6)	
	GSN	4	2 (50)	1 (25)	1 (25)	0		5	1 (20)	3 (60)	1 (20)	0	
Sexo													
	Masculino	44	31 (70,4)	9 (20,4)	3 (6,8)	1 (2,3)	,601	45	22 (48,9)	19 (42,2)	2 (4,4)	2 (4,4)	,664
	Feminino	59	48 (81,3)	7 (11,9)	3 (5,1)	1 (1,7)		59	35 (59,3)	18 (30,5)	3 (5,1)	3 (5,1)	
Idade													
	≥60	84	67 (79,7)	13 (15,5)	3 (3,6)	1 (1,2)	,128	84	48 (57,1)	29 (34,5)	3 (3,6)	4 (4,8)	,314
	<60	24	15 (62,5)	5 (20,8)	3 (12,5)	1 (4,2)		25	11 (44)	10 (40)	3 (12)	1 (4)	
Localização													
	Glândula parótida	56	42 (75)	10 (17,9)	4 (7,1)	0	,246	56	31 (55,4)	21 (37,5)	4 (7,1)	0	,135
	Glândula Submandibular	7	5 (71,4)	2 (28,6)	0	0		7	6 (85,7)	1 (14,3)	0	0	
	Glândula Sublingual	1	0	1 (100)	0	0		1	0	1 (100)	0	0	
	Glândula salivar menor	41	33 (80,5)	4 (9,7)	2 (4,9)	2 (4,9)		42	20 (47,6)	15 (35,7)	2 (4,8)	5 (11,9)	

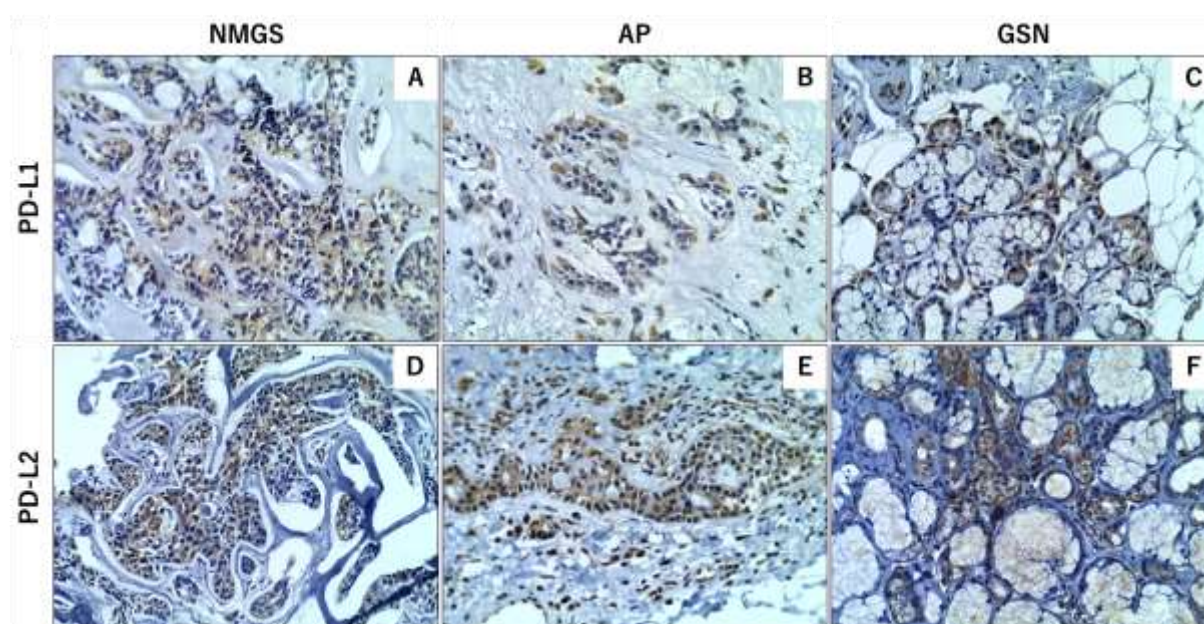
Abreviaturas: NMGS, neoplasias malignas das glândulas salivares; AP, adenomas pleomórficos; GSN, glândula salivar normal. * Teste do qui-quadrado.

Fonte: Elaborada pelos autores

Expressões PD-L1 e PD-L2

O padrão de marcação observado nos antígenos PD-L1&PD-L2 utilizados foi nuclear e citoplasmático em NMGS e AP. As células imunomarcadas eram principalmente células tumorais. Em alguns CCA, CME e CS, células inflamatórias como linfócitos e macrófagos também foram coradas. Nas GSN, o citoplasma das células acinares e ductais foi corado para ambas as proteínas (**Figura 3**).

Figura 3. Imunomarcção dos anticorpos PD-L1 e PD-L2.



Coloração citoplasmática e nuclear de PD-L1 e PD-L2 em células tumorais de neoplasias malignas de glândulas salivares. (A, D); componentes epiteliais e mioepiteliais de adenomas pleomórficos (B, E); células acinares e ductais de glândulas salivares normais (C, F). Ampliação original x400.

Fonte: Elaborada pelos autores

A intensidade de coloração e o H-score não apresentaram resultados estatisticamente significativos entre as neoplasias benignas e malignas. No entanto, menor imunomarcção de PD-L2 (0-25%) foi mais associado a tumores não metastáticos ($p=0,018$) (**Tabela 5**).

Tabela 5. Correlação entre metástase/risco e porcentagem de células PD-L1/PD-L2 positivas no grupo de neoplasias malignas de glândulas salivares.

Parâmetro	Total (n)	PD-L1				P*	Total (n)	PD-L2				P*
		0%	-25%	25-50%	+50%			0%	-25%	25-50%	+50%	
Metástase												
M0	27	19	5 (18,5)	2 (7,4)	1 (3,7)	,757	27	15	11	0	1 (3,7)	,018*
M1	6	(70,4)	2 (33,3)	0	0		6	(55,6)	(40,7)	2 (33,3)	0	
		4 (66,6)						3 (50)	1 (16,7)			
Risco												
BR	30	22	6 (20,0)	1 (3,3)	1 (3,3)	,878	30	19	9 (30)	1 (3,3)	1 (3,3)	,785
RI	6	(73,3)	1 (16,7)	0	0		6	(63,3)	2 (33,3)	1 (16,7)	0	
AR	7	5 (83,3)	1 (14,3)	1 (14,3)	0		7	3 (50,0)	3 (42,9)	0	0	
		5 (71,4)						4 (57,1)				

BR, baixo risco; RI, risco intermediário; AR, Alto risco; M0: Sem metástase à distância; M1: metástase à distância. *Teste do qui-quadrado.

Fonte: Elaborada pelos autores

Não foi encontrada associação significativa entre outros parâmetros clínicos (sexo, idade, localização) e perfil de imunomarcacão PD-L1/PD-L2. Os dados estão descritos nas **Tabelas 4 e 5**.

Discussão

O estudo atual sugere que o aumento da expressão de PD-L2 em NMGS está associado a um maior risco de metástase. Esses achados corroboram com outros trabalhos que encontraram uma associação entre a superexpressão de PD-L2, metástases e menor tempo de sobrevida livre de doença em NMGS [9, 16]. Em adição, a alta expressão de PD-L2 após a cirurgia pode promover metástase tumoral e prever um prognóstico ruim em pacientes com cânceres sólidos, particularmente no carcinoma hepatocelular [17, 18]. Em dois estudos com apenas CAC em glândulas salivares, um mau prognóstico dessas neoplasias foi relacionado ao aumento da expressão de PD-L2 [19, 20]. Além disso, o estágio TNM elevado e o aumento da invasão celular no câncer colorretal foram relacionados à forte expressão de PD-L2. Apenas um estudo com casos de carcinoma de ducto salivar não encontrou relação entre expressão de PD-L2 e prognóstico [21].

Neste trabalho, a expressão de PD-L1 não apresentou resultados estatisticamente significativos em relação às características clínicas, incluindo metástase à distância. No entanto, em algumas NGS de alto grau, a expressão de PD-L1 em células tumorais foi significativamente associada ao estágio do tumor [22]. Uma revisão sistemática (SR) com NGS mostrou que a expressão positiva de PD-L1 foi significativamente associada a participantes de pesquisa do sexo masculino, idade avançada, estágio do tumor, metástase em linfonodo, alto grau patológico, exceto ao CAC, que apresentou baixa ou nenhuma expressão de PD-L1 [23]. Outro estudo com NMGS mostrou alta expressão de PD-L1 na periferia do tumor, significativamente correlacionada com a presença de metástases linfonodais e estágio do tumor primário [24].

Um efeito terapêutico potencial tem sido associado com pacientes portadores de carcinoma de ducto salivar e carcinoma de GP com expressão positiva de PD-L1 [25, 26]. No entanto, uma RS em carcinoma de células escamosas de cabeça e

pescoço desencorajou a previsão de sobrevida usando a expressão de PD-L1 nesses tumores [27]. Em outros estudos, devido à sua baixa expressão, PD-L1 não foi um biomarcador valioso em CAC para prever respostas a imunoterapia [19, 20]. A maior recorrência de NMGS em estágio inicial foi associada à negatividade de PD-L1 [28]. Por outro lado, a expressão positiva de PD-L1 tem sido associada a uma melhor sobrevida global no câncer de mama [29].

Esses resultados divergentes podem ser explicados pela alta variabilidade dos subtipos de NGS analisados em todos os trabalhos, visto que essas neoplasias são muito discrepantes em seu comportamento histopatológico e clínico. Acrescido a isto, o tipo e concentração dos clones para avaliação de PD-L1&PD-L2 variou em outros trabalhos assim como às metodologias de análise desses anticorpos. Alguns estudos apontaram a afinidade de alguns tumores pelo ligante PD-L2 em vez do ligante PD-L1 e anticorpos não padronizados, além de critérios de corte também podem explicar essas discrepâncias (GHIOTTO; GAUTHIER; SERRIARI; PASTOR *et al.*, 2010).

Alguns estudos clínicos têm mostrado a eficácia e segurança de inibidores de *checkpoint* imunológico como pembrolizumab e nivolumab em NGS positivos para PD-L1 [31-34]. Embora o bloqueio de PD-L1 tenha se mostrado útil em certas NGS, o PD-L2 pode ser outra estratégia na terapia-alvo, por participar das respostas imunes de bloqueio de células T contra células cancerígenas em NGS [9, 16, 19, 35].

O tratamento individualizado para pacientes com expressões positivas de PD-L1 ou PD-L2 pode ser uma alternativa ao aprofundamento da terapia em NGS. Ainda são necessárias mais investigações com foco na expressão de PD-L2 para comprovar sua eficácia como preditor prognóstico e alvo para imunoterapia oncológica.

Conclusão

Nossos resultados indicam que a expressão de PD-L2 pode ajudar a prever o risco de metástase em NMGS, podendo ser, portanto, um potencial alvo terapêutico para esses tumores.

Referências

1. Tamaki, T., et al., *The burden of rare cancer in Japan: application of the RARECARE definition*. Cancer Epidemiol, 2014. **38**(5): p. 490-5.
2. Szewczyk, M., et al., *Management of clinically negative neck in salivary gland cancers - elective neck dissection, irradiation, or surveillance?* Contemp Oncol (Pozn), 2019. **23**(3): p. 169-173.
3. El-Naggar, A., et al., *WHO Classification of Head and neck tumours*. 4th ed ed. 2017.
4. Hosni, A., et al., *Outcomes and prognostic factors for major salivary gland carcinoma following postoperative radiotherapy*. Oral Oncol, 2016. **54**: p. 75-80.
5. Lewis, A.G., T. Tong, and E. Maghami, *Diagnosis and Management of Malignant Salivary Gland Tumors of the Parotid Gland*. Otolaryngol Clin North Am, 2016. **49**(2): p. 343-80.
6. Guntinas-Lichius, O., et al., *Prognostic role of intraparotid lymph node metastasis in primary parotid cancer: Systematic review*. Head Neck, 2021. **43**(3): p. 997-1008.
7. Baudino, T.A., *Targeted Cancer Therapy: The Next Generation of Cancer Treatment*. Curr Drug Discov Technol, 2015. **12**(1): p. 3-20.
8. Kesar, N., et al., *Prognostic impact of CD8-positive tumour-infiltrating lymphocytes and PD-L1 expression in salivary gland cancer*. Oral Oncol, 2020. **111**: p. 104931.
9. Chang, H., et al., *Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors*. Onco Targets Ther, 2017. **10**: p. 2983-2992.
10. Iwai, Y., et al., *Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(19): p. 12293-7.
11. Konishi, J., et al., *B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(15): p. 5094-100.
12. Chen, L., et al., *B7-H1 expression associates with tumor invasion and predicts patient's survival in human esophageal cancer*. Int J Clin Exp Pathol, 2014. **7**(9): p. 6015-23.
13. Hino, R., et al., *Tumor cell expression of programmed cell death-1 ligand 1 is a prognostic factor for malignant melanoma*. Cancer, 2010. **116**(7): p. 1757-66.
14. Muenst, S., et al., *Expression of programmed death ligand 1 (PD-L1) is associated with poor prognosis in human breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2014. **146**(1): p. 15-24.

15. Mukaigawa, T., et al., *Programmed death ligand-1 expression is associated with poor disease free survival in salivary gland carcinomas*. J Surg Oncol, 2016. **114**(1): p. 36-43.
16. Nakano, T., et al., *Prognostic value of programmed death ligand-1 and ligand-2 co-expression in salivary gland carcinomas*. Oral Oncol, 2019. **90**: p. 30-37.
17. Jung, H.I., et al., *Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma*. Cancer Res Treat, 2017. **49**(1): p. 246-254.
18. Yang, H., et al., *Correlation Between PD-L2 Expression and Clinical Outcome in Solid Cancer Patients: A Meta-Analysis*. Front Oncol, 2019. **9**: p. 47.
19. Mosconi, C., et al., *Immune microenvironment and evasion mechanisms in adenoid cystic carcinomas of salivary glands*. Oral Oncol, 2019. **88**: p. 95-101.
20. Chen, W., et al., *Assessment Of Tumour Infiltrating Lymphocytes And Pd-l1 Expression In Adenoid Cystic Carcinoma Of The Salivary Gland*. Clin Invest Med, 2021. **44**(1): p. E38-41.
21. Sato, F., et al., *The expression of programmed death ligand-1 could be related with unfavorable prognosis in salivary duct carcinoma*. J Oral Pathol Med, 2018. **47**(7): p. 683-690.
22. Fang, Q., et al., *Incidence and Prognostic Significance of PD-L1 Expression in High-Grade Salivary Gland Carcinoma*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 701181.
23. Wu, L., et al., *Prognostic role of PD-L1 expression in patients with salivary gland carcinoma: A systematic review and meta-analysis*. PLoS One, 2022. **17**(7): p. e0272080.
24. Kuchar, M., et al., *The Periphery of Salivary Gland Carcinoma Tumors Reveals a PD-L1/PD-1 Biomarker Niche for the Evaluation of Disease Severity and Tumor-Immune System Interplay*. Biomedicines, 2021. **9**(2).
25. Hashimoto, K., et al., *Treatment Efficacy of PD-1 Inhibitor Therapy in Patients With Recurrent and/or Metastatic Salivary Gland Carcinoma*. Anticancer Res, 2022. **42**(2): p. 981-989.
26. Higashino, M., et al., *Programmed death ligand-1 expression is associated with stage and histological grade of parotid carcinoma*. Acta Otolaryngol, 2020. **140**(2): p. 175-180.
27. Yang, W.F., et al., *The prognostic role of PD-L1 expression for survival in head and neck squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis*. Oral Oncol, 2018. **86**: p. 81-90.
28. Szewczyk, M., et al., *Prognostic markers in salivary gland cancer and their impact on survival*. Head Neck, 2019. **41**(9): p. 3338-3347.

29. Baptista, M.Z., et al., *Prognostic significance of PD-L1 and PD-L2 in breast cancer*. Hum Pathol, 2016. **47**(1): p. 78-84.
30. Ghiotto, M., et al., *PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1*. Int Immunol, 2010. **22**(8): p. 651-60.
31. Niwa, K., et al., *Multicentre, retrospective study of the efficacy and safety of nivolumab for recurrent and metastatic salivary gland carcinoma*. Sci Rep, 2020. **10**(1): p. 16988.
32. Cohen, R.B., et al., *Pembrolizumab for the Treatment of Advanced Salivary Gland Carcinoma: Findings of the Phase 1b KEYNOTE-028 Study*. Am J Clin Oncol, 2018. **41**(11): p. 1083-1088.
33. Rodriguez, C.P., et al., *A Phase II Trial of Pembrolizumab and Vorinostat in Recurrent Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Salivary Gland Cancer*. Clin Cancer Res, 2020. **26**(4): p. 837-845.
34. Hanai, N., et al., *Effectiveness and safety of nivolumab in patients with head and neck cancer in Japanese real-world clinical practice: a multicenter retrospective clinical study*. Int J Clin Oncol, 2021. **26**(3): p. 494-506.
35. Sridharan, V., et al., *Immune Profiling of Adenoid Cystic Carcinoma: PD-L2 Expression and Associations with Tumor-Infiltrating Lymphocytes*. Cancer Immunol Res, 2016. **4**(8): p. 679-87.

6 ARTIGO 3

Título: Diminuição da expressão de BAX e BCL-2 em neoplasias malignas de glândulas salivares.

Resumo

Introdução: Vários fatores contribuem para a formação e progressão das neoplasias, incluindo os mecanismos de inibição da via intrínseca de morte celular programada, que geralmente é regulada por proteínas pró e antiapoptóticas como BAX e BCL-2.

Objetivos. Este estudo teve como objetivo avaliar e comparar a imunoexpressão de BCL-2 e BAX em neoplasias malignas de glândulas salivares (NMGS), 61 adenomas pleomórficos (AP) e 5 amostras de glândulas salivares normais (GSN).

Materiais e Métodos: O perfil apoptótico de 43 NMGS, 61 AP e 5 amostras de GSN foram analisados por IHQ para as proteínas BAX e BCL-2. A associação do diagnóstico com características clínicas e histopatológicas também foi investigada.

Resultados: A expressão de BAX foi menor em NMGS do que AP ($p < 0,05$) e GSN ($p = 0,03$). A expressão de BCL-2 também foi menor em NMGS em comparação com AP ($p = 0,02$). A expressão de BAX ou BCL-2 não teve significância estatística em relação aos parâmetros clínicos analisados.

Conclusões: Fatores apoptóticos podem representar biomarcadores eficazes de diferenciação entre NGS benignas e malignas.

Palavras-chave: Neoplasias das Glândulas Salivares; Adenoma pleomórfico; Imuno-histoquímica; Apoptose; Proteína Bax; Gene Bcl-2.

Introdução

Entre os tumores de cabeça e pescoço, apenas menos de 5% são NGS [1]. A variedade histológica e o comportamento biológico podem tornar seu diagnóstico e classificação desafiadores [2]. Variáveis clínicas, incluindo estágio, idade e margens da lesão livres ou comprometidas, são prognósticos significativos para NGS [3].

Embora a classificação do tumor seja relevante, esta não é um indicador prognóstico independente [4]. A IHQ e os biomarcadores moleculares têm sido ferramentas valiosas para diferenciar e encontrar as alterações genômicas dessas neoplasias e utilizadas como potenciais alvos de terapia [1,5].

Nos últimos anos, o conhecimento em torno da apoptose levou ao entendimento de que a desregulação da morte celular programada contribui para o desenvolvimento do câncer, enquadrando esse mecanismo como um alvo benéfico para fins terapêuticos [6]. BCL-2 e genes relacionados desempenham um papel essencial na regulação de apoptose, atuando como iniciadores (e.g. BIM, BID e PUMA), inibidores (e.g. BCL-2, BCL-XL, BCL-w, MCL1 e A1) ou promotores (e.g. BAK e BAX) de apoptose [7]. Assim, a interação de proteínas anti e pró-apoptóticas determina a sobrevivência ou a morte celular [8].

A razão BCL-2/BAX tem sido usada para prever a presença ou ausência de atividade apoptótica. A imunoexpressão dessas duas oncoproteínas tem sido associada à progressão, agressividade e sobrevida em participantes de pesquisa com câncer de mama, algumas NGS e câncer de próstata [8-14]. Vários medicamentos foram testados para BCL-2 e outras proteínas antiapoptóticas mostrando resultados promissores, e uma melhor compreensão do funcionamento da família BCL-2 como quimioterápicos [15,16].

Este trabalho teve como objetivo avaliar a expressão IHQ dos marcadores BCL-2 e BAX em NGS benignas e malignas correlacionando com os parâmetros clínicos.

Materiais e métodos

Este estudo foi aprovado de acordo com a declaração de Helsinki pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Santa Catarina e da Universidade Autônoma da Baja Califórnia (#09840519.6.0000.0121). Quarenta e três casos representativos de NMGS, sessenta e um AP e cinco de GSN foram obtidos entre janeiro de 2006 e dezembro de 2019 no Laboratório de Patologia Oral da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC) e da UABC-HGR #1 IMSS. Os relatórios médicos e anatomopatológicos de todos os participantes de pesquisa

foram analisados e coletadas informações de localização, sexo, idade, estratificação de risco (baixo, intermediário e alto) e metástase (M0, M1). Todas as lâminas foram examinadas por dois patologistas especialistas (K.P.D. e R.G).

Imuno-histoquímica

A IHQ foi realizada usando cortes de 3 µm de espessura de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina, montados em lâminas de vidro contendo 3-aminopropiltriethoxissileno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Os cortes foram desparafinizados com xilol, seguido de reidratação em concentrações decrescentes de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada pela subsequente imersão das lâminas em dois banhos contendo peróxido de hidrogênio a 6% diluído em álcool metílico por 20 e depois 10 minutos em temperatura ambiente. A recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em tampão citrato (pH 6,0) a 96°C por 40 minutos. As lâminas foram incubadas com os anticorpos monoclonais primários de camundongo contra BAX (1:30; sc-7480, Santa Cruz, EUA) e BCL-2 (1:50, sc-7382, Santa Cruz, EUA) por 18 horas a 8 °C em uma câmara umidificada. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) e incubadas por 60 min em temperatura ambiente com um anticorpo secundário usando o EnVision/Dual-Link System-HRP (K4065, Dako, Califórnia, EUA) e desenvolvidas com um substrato cromogênico (K3468, DAB, Califórnia, EUA). As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris. Controles negativos e positivos foram incluídos durante as reações imuno-histoquímicas de acordo com as recomendações do fabricante.

Análise imuno-histoquímica

Para a análise da coloração BAX e BCL-2, cinco campos de cada lâmina foram capturados com aumento de 400x por microscópio óptico trinocular (Axiostar plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital 14,3 MB; Opticam Camera, Seul, Coréia) e um microcomputador (AOC, Miami, EUA), onde foram armazenadas as imagens. Mil células por neoplasia foram contadas, e a imunorreatividade foi avaliada e registrada como uma

porcentagem de células neoplásicas positivas sobre o número total de células neoplásicas na mesma área.

Os casos também foram classificados qualitativamente como positividade fraca (+) quando houve <5% de células positivas, positividade moderada (++) quando houve entre 5-50% de células positivas e positividade forte (+++) quando houve >50% de células positivas [11].

Razão BCL-2/BAX

Em cada caso, a razão antiapoptótica (AI) foi calculado dividindo a porcentagem de células BCL-2 (+) pela porcentagem de células BAX (+). Amostras com AI superior a um foram consideradas como tendo maior atividade antiapoptótica do que amostras exibindo AI inferior a 1 (GOMES; BERNARDES; DINIZ; DE MARCO *et al.*, 2012).

Análise estatística

Testes não paramétricos foram realizados na comparação das variáveis devido à distribuição não normal dos dados. Os valores da imunoexpressão foram expressos como mediana e intervalos interquartis. A análise quantitativa e do IA que apresentaram as proteínas BAX e BCL-2 foi realizada pelo teste de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis seguido de um teste post hoc de Dunn quando necessário. Para avaliação qualitativa dos marcadores de IHQ, foi executado o teste Qui-quadrado. Um valor de $p < 0,05$ (5%) foi considerado estatisticamente significativo. O software estatístico SPSS versão 23.0 foi utilizado para as análises.

Resultados

População de participantes de pesquisa

O grupo de NMGS foi composto por 21 homens (48,8%) e 22 mulheres (51,1%) com idade média de 48,0 anos (variação de 21-85). Em relação ao grupo de AP, 37,5% eram do sexo masculino e 62,5% do sexo feminino, com média de idade de 40,8 anos (variação 12-74). O grupo de GSN envolveu três homens (60%) e duas mulheres (40%) com idade média de 47,2 anos (variação de 21-68).

Entre as 43 NMGS, 15 casos (43,88%) eram de CAC, 12 casos (27,90%) de CME, 4 casos de CCA, 4 casos de CAEXAP e 4 casos de CS (9,30% respectivamente). Dois casos de CAME e 2 casos de CLE (4,65% cada). O grau histopatológico de CME mais frequente foi o intermediário com 6 casos (50%), seguido de baixo grau com 5 casos (41,6%) e alto grau com 1 caso (8,3%).

Seis dos 43 indivíduos (13,9%) com NMGS apresentaram metástases: 4 (9,3%) no pulmão, 1 (2,3%) nos linfonodos cervicais e 1 (2,3%) acometendo concomitantemente os linfonodos pulmonares e cervicais. Entre os 6 casos com metástases, 4 (66,6%) corresponderam a CAC, 1 (16,6%) a CME de grau intermediário e 1 (16,6%) a CAEXAP. Achados clínico-patológicos adicionais se encontram na **Tabela 6**.

Tabela 6. Imunoexpressão de BAX e BCL-2 comparada com achados clínico-patológicos em 109 pacientes com tumores de glândulas salivares.

Características	Total (n)	BAX (%)	p-valor	BCL-2 (%)	p-valor	Razão BCL2/BAX	p-valor
Sexo							
Masculino	50	54,08 (48,7)	,124 ^a	32,33 (37,6)	,179 ^a	0,77(0,62)	,388 ^a
Feminino	59	41,01 (41,3)		24,91 (35,1)		0,61(1,27)	
Idade							
<60	84	41,42 (45,9)	,054 ^a	27,11 (34,1)	,149 ^a	0,72 (0,73)	,859 ^a
>60	25	52,55 (40,4)		33,69 (40,7)		0,79 (0,57)	
Diagnóstico							
CME	12	48,64 (50,3)	,005 ^b	25,51 (40,3)	,105 ^b	0,39 (0,63)	,229 ^b
CAC	15	40,60 (46,9)		26,12 (37,3)		0,81 (1,32)	
CCA	4	40,38 (31,8)		5,55 (35,8)		0,23 (0,73)	
CAEXAP	4	07,76 (9,6)		13,36 (17,6)		1,59 (1,2)	
CLE	2	0,46 (0,9)		2,16 (4,2)		1,00 (0,0)	
CAME	2	17,97 (34,5)		16,19 (31,9)		0,95 (0,1)	
CS	4	25,09 (45,5)		18,85 (48,5)		0,66 (0,55)	
AP	61	52,55 (30,0)		33,33 (35,7)		0,69 (0,69)	
GSN	5	62,72 (38,7)		38,71 (47,9)		0,78 (0,98)	
Lesão							
NMGS	43	35,95 (50,1)	,12 ^b	20,81 (38,7)	,031 ^b	0,74 (0,90)	,948 ^b
AP	61	52,55 (30,0)		33,33 (25,7)		0,69 (0,69)	
GSN	5	62,72 (38,7)		38,71 (47,9)		0,78 (0,98)	
Localizações							
Glândula parótida	59	41,92 (46,5)	,723 ^b	28,22 (40,7)	,635 ^b	0,80 (1,09)	,256 ^b
Glândula Submandibular	7	57,11 (56,1)		28,43 (97,7)		0,47 (1,57)	
Glândula Sublingual	1	32,88 (0,0)		57,40 (0,0)		1,75 (0,0)	
Glândula salivar menor	42	50,36 (39,4)		29,11 (31,0)		0,61 (0,52)	

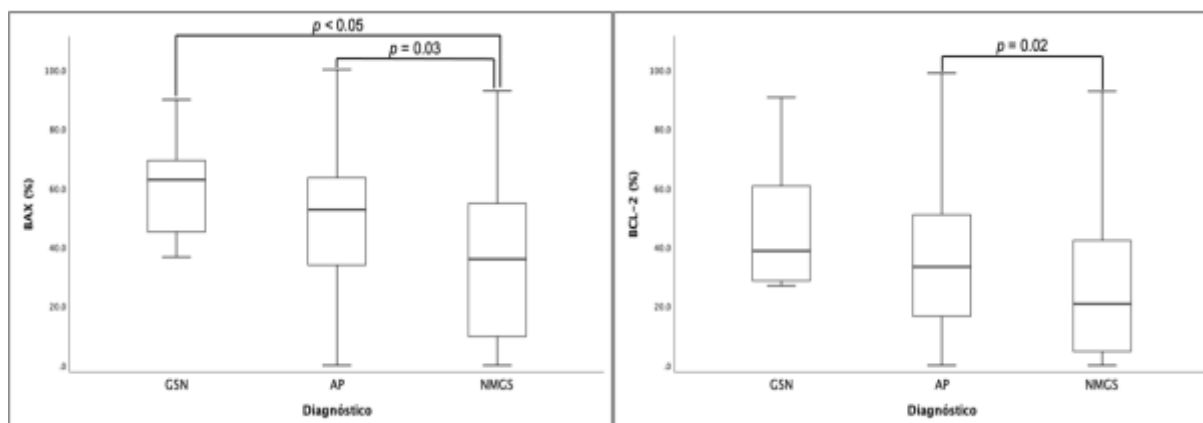
Abreviaturas: CME, carcinoma mucoepidermóide; CAC, carcinoma adenoide cístico; CCA, carcinoma de células acinares; CAEXAP, carcinoma ex adenoma pleomórfico; CLE, carcinoma linfoepitelial; CAME, carcinoma mioepitelial; CS, carcinoma secretor; AP, adenoma pleomórfico; GSN, glândula salivar normal; NMGS, neoplasia maligna das glândulas salivares. ^aTeste de Mann-Whitney. ^bTeste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como mediana (intervalo interquartil).

Fonte: elaborado pelos autores

Imunoexpressões de BAX e BCL-2

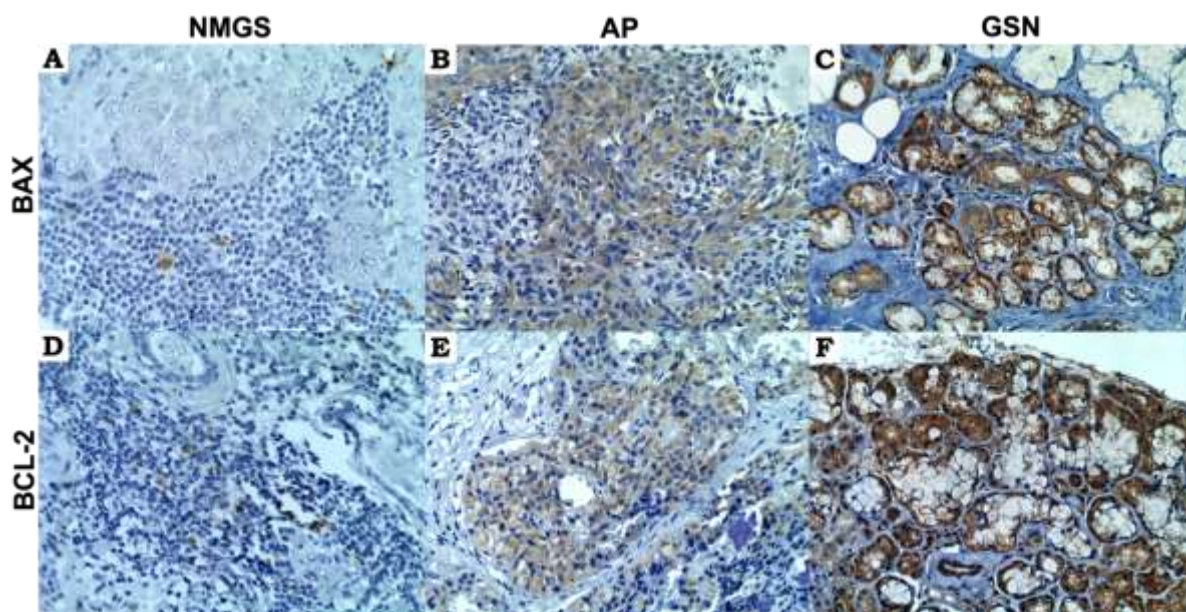
A expressão de BAX foi menor em NMGS do que em AP ($p < 0,05$) e GSN ($p = 0,03$). A expressão de BCL-2 também foi menor em NMGS em comparação com AP ($p = 0,02$). Ao comparar as NMGS por subtipo histológico, também encontramos resultados estatisticamente significativos (**Figura 4**). Houve menor quantificação de células BAX+ em CLE em relação a AP, CME e GSN ($p < 0,05$) e em CAEXAP quando comparado a CAC, AP, CME e GSN ($p < 0,05$) (**Figura 5**). Por fim, houve menor imunomarcação para os casos de CAME quando comparados com GSN ($p = 0,04$).

Figura 4. Porcentagem de marcação BAX e BCL-2 em neoplasias malignas de glândulas salivares, adenomas pleomórficos e glândulas salivares normais.



Fonte: elaborado pelos autores

Figura 5. Expressão imuno-histoquímica dos anticorpos BAX e BCL-2.



(A) Carcinoma de células acinares mostrando baixa coloração citoplasmática de BAX nas células tumorais mucosas. (B, E) Adenoma pleomórfico mostrando intensa coloração citoplasmática positiva de BAX e BCL-2 nas células neoplásicas com diferenciação epitelial. (D) Carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário expressando coloração citoplasmática fraca de BCL-2 nas células neoplásicas. (C, F) Glândula salivar normal mostrando intensa coloração citoplasmática de BAX e BCL-2 nas células dos acinos mucosos e do epitélio ductal.

Fonte: elaborado pelos autores

A razão antiapoptótica (IA) não mostrou associação com malignidade e não foi associado a nenhum dos parâmetros clínicos investigados. A estratificação de risco e a metástase foram comparadas com a expressão de BAX e BCL-2 sem resultados estatisticamente significantes (**Tabelas 7 e 8**).

Tabela 7. Expressão de BAX e BCL-2 comparada com estratificação de risco e metástase em tumores malignos de glândulas salivares.

Parâmetro	BAX	p-valor	BCL-2	p-valor	Razão BCL-2/BAX	p-valor
Metástase						
M0	38,48 (37,9)	,733 ^a	14.35 (42.9)	,982 ^a	0,90 (1,02)	,980 ^a
M1	22,16 (45,7)		24.45 (36.1)		0,85 (1,97)	
Risco						
BR	40,60 (46,1)	,730 ^b	25.61 (42.0)	,347 ^b	0,85 (0,79)	,061 ^b
RI	30,15 (36,1)		11.70 (26.6)		0,54 (2,84)	
AR	06,50 (12,0)		12.36 (22.8)		1,59 (3,29)	

Abreviaturas: BR, baixo risco; RI, risco intermediário; AR, Alto risco; M0, sem metástase à distância; M1, metástase à distância. ^aTeste de Mann-Whitney. ^bTeste de Kruskal-Wallis. Os resultados foram expressos como mediana (intervalo interquartil).

Fonte: elaborada pelos autores

Tabela 8. Análise qualitativa da imunorreatividade de BCL-2 e BAX em tumores de glândulas salivares.

	Total	BCL-2			p*	BAX			p*
		+	++	+++		+	++	+++	
CME	12	2	7	3	,290	0	6	6	,014
CAC	15	2	10	3		1	9	5	
CCA	4	2	2	0		1	3	0	
CAEXAP	4	1	3	0		1	3	0	
CLE	1	1	0	0		1	0	0	
CAME	2	1	1	0		1	1	0	
CS	4	1	2	1		0	3	1	
AP	61	5	39	17		4	23	34	
GSN	5	0	3	2		0	2	3	

Abreviaturas: CME, carcinoma mucoepidermóide; CAC, carcinoma adenoide cístico; CCA, carcinoma de células acinares; CAEXAP, carcinoma ex adenoma pleomórfico; CLE, carcinoma linfoepitelial; CAME, carcinoma mioepitelial; CS, carcinoma secretor; AP, adenoma pleomórfico; GSN, glândula salivar normal.

*Teste qui-quadrado.

Fonte: elaborada pelos autores

Análise qualitativa para BAX e BCL-2

Entre as NMGS, 59,5% dos casos apresentaram positividade fraca (+) para BCL-2 e positividade moderada (++) para BAX. Os AP apresentaram 63,9% de positividade moderada (++) para BCL-2 e 55,7% de positividade forte (+++) para BAX. Nas GSN, 60% dos casos conferiram positividade moderada (++) para BCL-2 e 40% para BAX. Não houve diferença significativa entre a expressão de BCL-2 e BAX

e as informações clínico-patológicas (**Tabela 6**).

Discussão

A homeostase tecidual é regulada pela estabilidade entre moléculas anti e pró-apoptóticas, e seu desequilíbrio tem sido relacionado à progressão de algumas neoplasias [6]. Neste trabalho, objetivamos investigar as alterações da apoptose pela detecção dos antígenos BAX e BCL-2 por IHQ em NGS benignas e malignas e correlacionar com parâmetros clínicos como idade, sexo, localização, risco e metástase. Uma influência de oncoproteínas anti e pró-apoptóticas foi observada em NMGS. A expressão de BAX e BCL-2 foi menor em NMGS do que AP ($p < 0,05$). Uma imunorreatividade de BCL-2 mais fraca em NMGS em comparação com neoplasias benignas também tem sido relatada previamente, implicando que a regulação negativa de sua expressão pode contribuir para uma maior taxa de apoptose [17].

Em CME de GSm, uma diminuição da expressão de BCL-2 foi encontrada em neoplasias de grau II e III do que em tumores de grau I [18]. Outro estudo relatou que a expressão de BCL-2 foi mais comumente encontrada em CME de baixo grau do que em CME de alto grau [19]. No entanto, um perfil antiapoptótico foi relacionado a uma amostra menor de neoplasias salivares com sobre-expressão significativa do gene BCL-2 em tumores malignos [14]. Além disso, uma expressão significativa para BCL-2 e agonista de morte celular (BAD) associada a BCL-2 foi mostrada em CAC [20]. Enquanto os APs revelaram alta expressão para a proteína BCL-2 e expressão significativamente menor para a proteína BAX [21].

Morfologicamente, nossos casos de CME de baixo grau mostraram marcação mais significativa de BCL-2 e BAX no citoplasma de células mucosas e claras do que tumores sólidos. Da mesma forma, alguns autores encontraram uma positividade mais forte de BCL-2 na periferia dos ninhos de tumores de CME cístico e sólido, sugerindo uma associação com células mioepiteliais [11]. Outra pesquisa mostrou imunorreatividade de BCL-2 e BAX no citoplasma das células colunares, intermediárias ou epidermóides do CME, enquanto as células mucosas e células claras foram negativas. A marcação foi mais forte na periferia das ilhas tumorais nos padrões cístico e sólido [18].

No CAC, as células neoplásicas das estruturas tubulares e cribriformes apresentaram maior marcação, sendo observada invasão perineural tanto para BAX quanto para BCL-2. Assim como no presente estudo, Soini *et al.* (1998) observaram coloração positiva de BCL-2 de tecido linfático e nervos em CAC, e para BAX, especialmente em linfócitos, fibroblastos e células endoteliais em áreas tumorais de todas as NMGS [17].

As células neoplásicas em um estudo de câncer de mama apresentaram uma menor expressão de BAX, sugerindo que as células tumorais estariam evitando apoptose [22]. Diferentemente disso, pesquisas sobre câncer de próstata relataram aumento dos níveis de proteína BAX e BCL-2 nesses pacientes [23], e com tumores astrocíticos humanos, observou-se uma tendência ao aumento dos níveis de BAX e BCL-2 de acordo com a gradação das neoplasias [24].

Acreditamos que nossos resultados podem estar relacionados à heterogeneidade do grupo de NMGS. Apesar de todas as neoplasias apresentadas nesta pesquisa ocorrerem em glândulas salivares, o comportamento, grau histológico e diferenciação são variáveis. Além disso, BCL-2 e BAX não são as únicas proteínas que atuam na via intrínseca da apoptose, portanto, estudos envolvendo essas outras proteínas antiapoptóticas (Bcl-xL, Mcl-1, Bcl-w e BFL-1/A1) e proapoptóticas (Bak) devem ser realizados [25].

Alguns estudos de neoplasias malignas de outras regiões relatam que o aumento dos níveis de BCL-2 corresponde a menores níveis de BAX [26, 27]. Neste contexto, ensaio clínico demonstrou resultados positivos na inibição de BCL-2 [7]. No entanto, a resistência do câncer à Qxt também tem sido relacionada, e estratégias para suprimir um conjunto de proteínas da família BCL-2 estão sendo desenvolvidas. Na leucemia mielóide aguda, a inibição de BCL-2 direciona proteínas pró-apoptóticas sequestradas para MCL-1 e combinações *in vivo* de antagonistas de BCL-2 e MCL-1 são mais eficazes quando concomitantes em vez de sequenciais [28]. No câncer de ovário epitelial, *in vivo* e *in vitro*, um agente chamado songorine (antagonista do receptor GABAA com propriedades anti-inflamatórias, regenerativas e moduladoras do sistema nervoso central) suprime o crescimento celular e a metástase [29, 30].

No presente trabalho, a razão antiapoptótica (IA) BCL-2/BAX não se correlacionou com malignidade ou outros parâmetros investigados. Em contraste, Gomes et al. (2012) indicaram maior IA em NGS do que GSN, propondo um comportamento antiapoptótico predominante em células neoplásicas que conduzem ao crescimento tumoral [14]. Embora nossa metodologia de IA tenha sido baseada neste estudo, nossos resultados foram distintos. Essas divergências podem estar relacionadas aos subtipos histológicos de NGS incluídos no presente estudo.

Uma má resposta à radioterapia tem sido associada a uma razão BCL-2/BAX mais alta no câncer de próstata [31]. Uma relação entre anormalidades na expressão dos níveis de BCL-2 e BAX foi estabelecida com um aumento da falha da Rxt de grupo de pacientes tratados para carcinoma de próstata [32]. Para outros pesquisadores, a razão BAX/BCL-2 não foi preditivo de radiosensibilidade no câncer de pâncreas [33].

No corrente estudo, analisamos as proteínas BCL-2 e BAX qualitativa e qualitativamente. Além disso, a literatura demonstra grande divergência metodológica na determinação da razão BCL-2/BAX. Alguns trabalhos estudaram os antígenos qualitativamente [11, 13, 17, 19, 24]; enquanto outros pesquisadores quantificaram e compararam células positivas e negativas [21, 24, 34] ou mesmo casos positivos/negativos organizados [19]. Também, alguns estudos analisaram a razão BAX/BCL-2 [11, 35] ou o índice BCL-2/BAX [14, 36]. Este estudo também não encontrou relação significativa entre os imunomarcadores BCL-2 e BAX com a metástase e a graduação das NMGS. Em participantes de pesquisa com câncer colorretal, essa correlação também não foi encontrada [27]. A baixa expressão de BAX e alta de BCL-2 no colangiocarcinoma intra-hepático foi relacionada à baixa sobrevida global e alta taxa de recorrência, mas não metástase [26]. No entanto, no carcinoma hepatocelular, uma associação significativa foi encontrada para a superexpressão de BCL-2 com o estadiamento TNM e a graduação do tumor [37].

Dado o impacto dos marcadores apoptóticos no prognóstico e sobrevida de uma série de tumores, novas modalidades terapêuticas em NGS poderiam ser melhor estudadas tendo como alvo esses fatores relacionados à apoptose.

Conclusão

Este trabalho mostrou um desequilíbrio na regulação de moléculas pró e antiapoptóticas. No entanto, não pudemos verificar se essa desregulação está relacionada à resistência à morte celular das NMGS. Os biomarcadores BAX e BCL-2 podem representar uma importante ferramenta de distinção entre neoplasias malignas e benignas de glândulas salivares. Estudos futuros envolvendo outras proteínas ou vias da família BCL-2 são recomendados para entender melhor a interação entre os mecanismos de apoptose e a progressão das NGS.

Referências

1. Di Villeneuve, L., et al., *Salivary Gland Carcinoma: Novel Targets to Overcome Treatment Resistance in Advanced Disease*. Front Oncol, 2020. **10**: p. 580141.
2. Pinheiro, J., et al., *Histological Subtypes and Clinical Behavior Evaluation of Salivary Gland Tumors*. Acta Med Port, 2018. **31**(11): p. 641-647.
3. Seethala, R.R., *Histologic grading and prognostic biomarkers in salivary gland carcinomas*. Adv Anat Pathol, 2011. **18**(1): p. 29-45.
4. Speight, P.M. and A.W. Barrett, *Salivary gland tumours*. Oral Dis, 2002. **8**(5): p. 229-40.
5. Skálová, A., et al., *The Role of Molecular Testing in the Differential Diagnosis of Salivary Gland Carcinomas*. Am J Surg Pathol, 2018. **42**(2): p. e11-e27.
6. Adams, J.M. and S. Cory, *The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy*. Oncogene, 2007. **26**(9): p. 1324-37.
7. Zhang, X., et al., *Targeting anti-apoptotic BCL-2 family proteins for cancer treatment*. Future Med Chem, 2020. **12**(7): p. 563-565.
8. Lessene, G., P.E. Czabotar, and P.M. Colman, *BCL-2 family antagonists for cancer therapy*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(12): p. 989-1000.
9. Schnoell, J., et al., *Expression of inhibitors of apoptosis proteins in salivary gland adenoid cystic carcinoma: XIAP is an independent marker of impaired cause-specific survival*. Clin Otolaryngol, 2020. **45**(3): p. 364-369.
10. Azimian, H., et al., *expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy*. Iran J Basic Med Sci, 2018. **21**(3): p. 325-332.
11. Goulart-Filho, J.A.V., et al., *Role of apoptotic, autophagic and senescence pathways in minor salivary gland adenoid cystic carcinoma*. Diagn Pathol, 2019. **14**(1): p. 14.

12. Obtulovicova, K., et al., *Recurrent salivary pleomorphic adenoma shows increased immunohistologic expression of bcl-2 oncoprotein*. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub, 2015. **159**(3): p. 460-5.
13. Manjunatha, B.S., G.S. Kumar, and V. Raghunath, *Immunohistochemical expression of Bcl-2 in benign and malignant salivary gland tumors*. Med Oral Patol Oral Cir Bucal, 2011. **16**(4): p. e503-7.
14. Gomes, C.C., et al., *Anti-apoptotic gene transcription signature of salivary gland neoplasms*. BMC Cancer, 2012. **12**: p. 61.
15. Davids, M.S. and A. Letai, *Targeting the B-cell lymphoma/leukemia 2 family in cancer*. J Clin Oncol, 2012. **30**(25): p. 3127-35.
16. Massihnia, D., et al., *Phospho-Akt overexpression is prognostic and can be used to tailor the synergistic interaction of Akt inhibitors with gemcitabine in pancreatic cancer*. J Hematol Oncol, 2017. **10**(1): p. 9.
17. Soini, Y., U. Törmänen, and P. Pääkkö, *Apoptosis is inversely related to bcl-2 but not to bax expression in salivary gland tumours*. Histopathology, 1998. **32**(1): p. 28-34.
18. Yin, H.F., N. Okada, and M. Takagi, *Apoptosis and apoptotic-related factors in mucoepidermoid carcinoma of the oral minor salivary glands*. Pathol Int, 2000. **50**(8): p. 603-9.
19. Janjua, O.S., et al., *Bcl-2 protein expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: a single institution experience*. Hematol Oncol Stem Cell Ther, 2012. **5**(2): p. 96-100.
20. Zhu, X., et al., *Expression of PIM-1 in salivary gland adenoid cystic carcinoma: Association with tumor progression and patients' prognosis*. Oncol Lett, 2018. **15**(1): p. 1149-1156.
21. Ferreira, J.C., et al., *Pleomorphic adenoma of oral minor salivary glands: An investigation of its neoplastic potential based on apoptosis, mucosecretory activity and cellular proliferation*. Arch Oral Biol, 2014. **59**(6): p. 578-85.
22. Pluta, P., et al., *Significance of Bax expression in breast cancer patients*. Pol Przegl Chir, 2011. **83**(10): p. 549-53.
23. Royuela, M., et al., *IL-2, its receptors, and bcl-2 and bax genes in normal, hyperplastic and carcinomatous human prostates: immunohistochemical comparative analysis*. Growth Factors, 2000. **18**(2): p. 135-46.
24. Faria, G., et al. *Expression of BCL-2 and BAX proteins in human astrocytic tumors*. 2006. **42**, 271-278 DOI: <https://doi.org/10.1590/S1676-24442006000400008> .
25. Kashyap, D., V.K. Garg, and N. Goel, *Intrinsic and extrinsic pathways of apoptosis: Role in cancer development and prognosis*. Adv Protein Chem Struct Biol, 2021. **125**: p. 73-120.

26. Kang, Q., et al., *Characterization and prognostic significance of mortalin, Bcl-2 and Bax in intrahepatic cholangiocarcinoma*. *Oncol Lett*, 2018. **15**(2): p. 2161-2168.
27. Yang, X.G., et al., *[Expression and clinicopathological significance of*. *Zhongguo Xue Xi Chong Bing Fang Zhi Za Zhi*, 2021. **33**(2): p. 148-153.
28. Bhatt, S., et al., *Reduced Mitochondrial Apoptotic Priming Drives Resistance to BH3 Mimetics in Acute Myeloid Leukemia*. *Cancer Cell*, 2020. **38**(6): p. 872-890.e6.
29. Zhang, H., et al., *Songorine suppresses cell growth and metastasis in epithelial ovarian cancer via the Bcl-2/Bax and GSK3 β / β -catenin signaling pathways*. *Oncol Rep*, 2019. **41**(5): p. 3069-3079.
30. Khan, H., et al., *Therapeutic potential of songorine, a diterpenoid alkaloid of the genus Aconitum*. *Eur J Med Chem*, 2018. **153**: p. 29-33.
31. Mackey, T.J., et al., *bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with prostate cancer*. *Urology*, 1998. **52**(6): p. 1085-90.
32. Pollack, A., et al., *Molecular markers of outcome after radiotherapy in patients with prostate carcinoma: Ki-67, bcl-2, bax, and bcl-x*. *Cancer*, 2003. **97**(7): p. 1630-8.
33. Lee, J.U., et al., *Role of Bcl-2 family proteins (Bax, Bcl-2 and Bcl-X) on cellular susceptibility to radiation in pancreatic cancer cells*. *Eur J Cancer*, 1999. **35**(9): p. 1374-80.
34. Gordón-Núñez, M.A., et al. ***Inmunohistochemical Expression of PCNA, p53 and bcl-2 in Pleomorphic Adenomas***. 2008. **26**, 567-572 DOI: <http://dx.doi.org/10.4067/S0717-95022008000300010>
35. Salakou, S., et al., *Increased Bax/Bcl-2 ratio up-regulates caspase-3 and increases apoptosis in the thymus of patients with myasthenia gravis*. *In Vivo*, 2007. **21**(1): p. 123-32.
36. Scopa, C.D., et al., *bcl-2/bax ratio as a predictive marker for therapeutic response to radiotherapy in patients with rectal cancer*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2001. **9**(4): p. 329-34.
37. Hosseini-Khah, Z., et al., *SOX2 and Bcl-2 as a Novel Prognostic Value in in Hepatocellular Carcinoma Progression*. *Curr Oncol*, 28, n. 4, p. 3015-3029, 08 09 2021.

7 CONCLUSÕES

- A função imunoprotetora das CDs intratumorais está comprometida em NMGS;
- Marcadores de CDs podem representar ferramentas úteis de previsão para metástases em NGS;
- PD-L2 pode ter um valor prognóstico significativo na avaliação de metástases em NGS;
- Fatores apoptóticos podem representar biomarcadores eficazes de diferenciação entre NGS benignas e malignas.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. S.-E. *In: Immunología celular y molecular*. Madrid, España: Saunders- Elsevier., 2007. p. 68-80.
- ADAMS, J. M.; CORY, S. The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene*, 26, n. 9, p. 1324-1337, Feb 26 2007.
- AL-QAHTANI, K. H.; TUNIO, M. A.; BAYOUMI, Y.; GURUSAMY, V. M. *et al.* Clinicopathological features and treatment outcomes of the rare, salivary duct carcinoma of parotid gland. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 45, n. 1, p. 32, May 2016.
- AL-ZAHER, N.; OBEID, A.; AL-SALAM, S.; AL-KAYYALI, B. S. Acinic cell carcinoma of the salivary glands: a literature review. *Hematol Oncol Stem Cell Ther*, 2, n. 1, p. 259-264, 2009.
- ALGARRA, I.; CABRERA, T.; GARRIDO, F. The HLA crossroad in tumor immunology. *Hum Immunol*, 61, n. 1, p. 65-73, Jan 2000.
- ALVES, F. A.; PIRES, F. R.; DE ALMEIDA, O. P.; LOPES, M. A. *et al.* PCNA, Ki-67 and p53 expressions in submandibular salivary gland tumours. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 33, n. 6, p. 593-597, Sep 2004.
- ARAYA, J.; MARTINEZ, R.; NIKLANDER, S.; MARSHALL, M. *et al.* Incidence and prevalence of salivary gland tumours in Valparaíso, Chile. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 20, n. 5, p. e532-539, Sep 01 2015.
- ASHKENAZI, A.; FAIRBROTHER, W. J.; LEVERSON, J. D.; SOUERS, A. J. From basic apoptosis discoveries to advanced selective BCL-2 family inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 16, n. 4, p. 273-284, Apr 2017.
- AZIMIAN, H.; DAYYANI, M.; TOOSSI, M. T. B.; MAHMOUDI, M. expression ratio in prediction of response to breast cancer radiotherapy. *Iran J Basic Med Sci*, 21, n. 3, p. 325-332, Mar 2018.
- BANSAL, A.; KAUR, M.; DALAL, V.; SIRAJ, F. Papillary Pattern in Acinic Cell Carcinoma of Parotid Gland: A Potential Diagnostic Pitfall on FNAC. *J Cytol*, 35, n. 1, p. 57-59, 2018.
- BELGE, G.; MEYER, A.; KLEMKE, M.; BURCHARDT, K. *et al.* Upregulation of HMGA2 in thyroid carcinomas: a novel molecular marker to distinguish between benign and malignant follicular neoplasias. *Genes Chromosomes Cancer*, 47, n. 1, p. 56-63, Jan 2008.
- BJØRNDAL, K.; KROGDAHL, A.; THERKILDSEN, M. H.; OVERGAARD, J. *et al.* Salivary gland carcinoma in Denmark 1990-2005: a national study of incidence, site and histology. Results of the Danish Head and Neck Cancer Group (DAHANCA). *Oral Oncol*, 47, n. 7, p. 677-682, Jul 2011.

BOROVEC, J.; CEGAN, M.; MALA, K.; HARMASH, N. *et al.* Histopathological case report of high grade salivary duct carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol*, 53, n. 4, p. 342-345, 2015.

CANTÙ, G. Adenoid cystic carcinoma. An indolent but aggressive tumour. Part A: from aetiopathogenesis to diagnosis. *Acta Otorhinolaryngol Ital*, 41, n. 3, p. 206-214, Jun 2021.

CARLSON, E. R.; SCHLIEVE, T. Salivary Gland Malignancies. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*, 31, n. 1, p. 125-144, Feb 2019.

CAVALIERE, M.; DE LUCA, P.; SCARPA, A.; SAVIGNANO, L. *et al.* Acinic cell carcinoma of the parotid gland: from pathogenesis to management: a literature review. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 277, n. 10, p. 2673-2679, Oct 2020.

CHANDRASEKAR, C.; SALATI, N.; RAO, L.; RADHAKRISHNAN, R. Salivary duct carcinoma in the mandibular anterior region: The role of immunohistochemical markers in its definitive diagnosis. *J Oral Maxillofac Pathol*, 20, n. 3, p. 505-509, 2016 Sep-Dec 2016.

CHANG, H.; KIM, J. S.; CHOI, Y. J.; CHO, J. G. *et al.* Overexpression of PD-L2 is associated with shorter relapse-free survival in patients with malignant salivary gland tumors. *Onco Targets Ther*, 10, p. 2983-2992, 2017.

COCA-PELAZ, A.; RODRIGO, J. P.; BRADLEY, P. J.; VANDER POORTEN, V. *et al.* Adenoid cystic carcinoma of the head and neck--An update. *Oral Oncol*, 51, n. 7, p. 652-661, Jul 2015.

COLLEMAN, W.; TSONGALIS, G. The molecular basis of human disease. *In: Molecular pathology*. Hong Kong, China.: Elsevier., 2009. p. 456-530.

CONSORTIUM, A. P. G. AACR Project GENIE: Powering Precision Medicine through an International Consortium. *Cancer Discov*, 7, n. 8, p. 818-831, Aug 2017.

CRAMER, S. O.; TRUMPFHELLER, C.; MEHLHOOP, U.; MORE, S. *et al.* Activation-induced expression of murine CD83 on T cells and identification of a specific CD83 ligand on murine B cells. *Int Immunol*, 12, n. 9, p. 1347-1351, Sep 2000.

DA CRUZ PEREZ, D. E.; DE ABREU ALVES, F.; NOBUKO NISHIMOTO, I.; DE ALMEIDA, O. P. *et al.* Prognostic factors in head and neck adenoid cystic carcinoma. *Oral Oncol*, 42, n. 2, p. 139-146, Feb 2006.

DALGIC, A.; KARAKOC, O.; AYDIN, U.; HIDIR, Y. *et al.* Minor salivary gland neoplasms. *J Craniofac Surg*, 25, n. 3, p. e289-291, May 2014.

DAMJANOV, I.; SKENDERI, F.; VRANIC, S. Mammary Analogue Secretory Carcinoma (MASC) of the salivary gland: A new tumor entity. *Bosn J Basic Med Sci*, 16, n. 3, p. 237-238, Aug 2016.

DANTAS, A. N.; MORAIS, E. F.; MACEDO, R. A.; TINÔCO, J. M. *et al.* Clinicopathological characteristics and perineural invasion in adenoid cystic carcinoma: a systematic review. *Braz J Otorhinolaryngol*, 81, n. 3, p. 329-335, 2015.

DAY, C. L.; KAUFMANN, D. E.; KIEPIELA, P.; BROWN, J. A. *et al.* PD-1 expression on HIV-specific T cells is associated with T-cell exhaustion and disease progression. *Nature*, 443, n. 7109, p. 350-354, Sep 21 2006.

DE AZAMBUJA, E.; CARDOSO, F.; DE CASTRO, G.; COLOZZA, M. *et al.* Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer*, 96, n. 10, p. 1504-1513, May 21 2007.

DE BRITO, B. S.; GASPAR, N. G.; EGAL, E. S.; SANCHEZ-ROMERO, C. *et al.* PLAG1 expression is maintained in recurrent pleomorphic adenoma. *Virchows Arch*, Jul 2016.

DEGUCHI, M.; AIBA, S.; OHTANI, H.; NAGURA, H. *et al.* Comparison of the distribution and numbers of antigen-presenting cells among T-lymphocyte-mediated dermatoses: CD1a+, factor XIIIa+, and CD68+ cells in eczematous dermatitis, psoriasis, lichen planus and graft-versus-host disease. *Arch Dermatol Res*, 294, n. 7, p. 297-302, Oct 2002.

DELGADO, R.; VUITCH, F.; ALBORES-SAAVEDRA, J. Salivary duct carcinoma. *Cancer*, 72, n. 5, p. 1503-1512, Sep 1993.

DO PRADO, R. F.; DA SILVA MACHADO, A. L.; COLOMBO, C. E.; CARVALHO, Y. R. Immunohistochemical study of the expression of fatty acid synthase and Ki-67 in salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*, 40, n. 6, p. 467-475, Jul 2011.

DONG, H.; STROME, S. E.; SALOMAO, D. R.; TAMURA, H. *et al.* Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nat Med*, 8, n. 8, p. 793-800, Aug 2002.

DONG, Y.; SUN, Q.; ZHANG, X. PD-1 and its ligands are important immune checkpoints in cancer. *Oncotarget*, 8, n. 2, p. 2171-2186, Jan 10 2017.

DULTRA, F. K.; BARROS, A. C.; SCHAER-BARBOSA, H.; FIGUEIREDO, A. L. *et al.* Immunohistochemical assessment of CD1a-positive Langerhans cells and their relationship with E-cadherin in minor salivary gland tumors. *J Oral Pathol Med*, 41, n. 1, p. 47-53, Jan 2012.

EL-NAGGAR, A.; CHAN, J.; GRANDIS, J.; TAKATA, T. *et al.* WHO Classification of Head and neck tumours. 4th ed ed. 2017.

ENESCU, A.; ENESCU, A.; BĂLĂȘOIU, M.; CIOLOFAN, M. S. *et al.* Histopathological study of pleomorphic adenoma of salivary glands. *Rom J Morphol Embryol*, 55, n. 3 Suppl, p. 1149-1153, 2014.

EROVIC, B. M.; SHAH, M. D.; BRUCH, G.; JOHNSTON, M. *et al.* Outcome analysis of 215 patients with parotid gland tumors: a retrospective cohort analysis. *J Otolaryngol Head Neck Surg*, 44, p. 43, 2015.

FOSS, R. D.; ELLIS, G. L.; AUCLAIR, P. L. Salivary gland cystadenocarcinomas. A clinicopathologic study of 57 cases. *Am J Surg Pathol*, 20, n. 12, p. 1440-1447, Dec 1996.

FREEMAN, G. J.; LONG, A. J.; IWAI, Y.; BOURQUE, K. *et al.* Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*, 192, n. 7, p. 1027-1034, Oct 2000.

FRIERSON, H. F.; EL-NAGGAR, A. K.; WELSH, J. B.; SAPINOSO, L. M. *et al.* Large scale molecular analysis identifies genes with altered expression in salivary adenoid cystic carcinoma. *Am J Pathol*, 161, n. 4, p. 1315-1323, Oct 2002.

FUJIMOTO, Y.; TEDDER, T. F. CD83: a regulatory molecule of the immune system with great potential for therapeutic application. *J Med Dent Sci*, 53, n. 2, p. 85-91, Jun 2006.

GHIOTTO, M.; GAUTHIER, L.; SERRIARI, N.; PASTOR, S. *et al.* PD-L1 and PD-L2 differ in their molecular mechanisms of interaction with PD-1. *Int Immunol*, 22, n. 8, p. 651-660, Aug 2010.

GOLDHIRSCH, A.; WINER, E. P.; COATES, A. S.; GELBER, R. D. *et al.* Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol*, 24, n. 9, p. 2206-2223, Sep 2013.

GOLDSTEIN, J. C.; WATERHOUSE, N. J.; JUIN, P.; EVAN, G. I. *et al.* The coordinate release of cytochrome c during apoptosis is rapid, complete and kinetically invariant. *Nat Cell Biol*, 2, n. 3, p. 156-162, Mar 2000.

GOMES, C. C.; BERNARDES, V. F.; DINIZ, M. G.; DE MARCO, L. *et al.* Anti-apoptotic gene transcription signature of salivary gland neoplasms. *BMC Cancer*, 12, p. 61, Feb 2012.

GOMES, J. O.; DE VASCONCELOS CARVALHO, M.; FONSECA, F. P.; GONDAK, R. O. *et al.* CD1a⁺ and CD83⁺ Langerhans cells are reduced in lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 45, n. 6, p. 433-439, Jul 2016.

GOMEZ, D. R.; KATABI, N.; ZHUNG, J.; WOLDEN, S. L. *et al.* Clinical and pathologic prognostic features in acinic cell carcinoma of the parotid gland. *Cancer*, 115, n. 10, p. 2128-2137, May 15 2009.

GONDAK, R. O.; MAUAD, T.; ALMEIDA, O. P.; VARGAS, P. A. Reduced number of CD1a⁺ and CD83⁺ interstitial dendritic cells in herpetic lesions (HSV-1⁺) of the tongue in patients with advanced-stage AIDS. *Histopathology*, 63, n. 4, p. 595-598, Oct 2013.

GOULART-FILHO, J. A. V.; MONTALLI, V. A. M.; PASSADOR-SANTOS, F.; DE ARAÚJO, N. S. *et al.* Role of apoptotic, autophagic and senescence pathways in minor salivary gland adenoid cystic carcinoma. *Diagn Pathol*, 14, n. 1, p. 14, Feb 2019.

GUEIROS, L. A.; GONDAK, R.; JORGE JÚNIOR, J.; COLETTA, R. D. *et al.* Increased number of Langerhans cells in oral lichen planus and oral lichenoid lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*, 113, n. 5, p. 661-666, May 2012.

GUZZO, M.; LOCATI, L. D.; PROTT, F. J.; GATTA, G. *et al.* Major and minor salivary gland tumors. *Crit Rev Oncol Hematol*, 74, n. 2, p. 134-148, May 2010.

HAFED, L.; FARAG, H.; SHAKER, O.; EL-ROUBY, D. Is human papilloma virus associated with salivary gland neoplasms? An in situ-hybridization study. *Arch Oral Biol*, 57, n. 9, p. 1194-1199, Sep 2012.

HO, A. S.; OCHOA, A.; JAYAKUMARAN, G.; ZEHIR, A. *et al.* Genetic hallmarks of recurrent/metastatic adenoid cystic carcinoma. *J Clin Invest*, 129, n. 10, p. 4276-4289, Oct 01 2019.

HÜHNS, M.; SIMM, G.; ERBERSDOBLER, A.; ZIMPFER, A. HPV Infection, but Not EBV or HHV-8 Infection, Is Associated with Salivary Gland Tumours. *Biomed Res Int*, 2015, p. 829349, 2015.

IHRLER, S.; BLASENBREU-VOGT, S.; SENDELHOFERT, A.; LANG, S. *et al.* Differential diagnosis of salivary acinic cell carcinoma and adenocarcinoma (NOS). A comparison of (immuno-)histochemical markers. *Pathol Res Pract*, 198, n. 12, p. 777-783, 2002.

IWAI, Y.; ISHIDA, M.; TANAKA, Y.; OKAZAKI, T. *et al.* Involvement of PD-L1 on tumor cells in the escape from host immune system and tumor immunotherapy by PD-L1 blockade. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, n. 19, p. 12293-12297, Sep 2002.

JUNG, H. I.; JEONG, D.; JI, S.; AHN, T. S. *et al.* Overexpression of PD-L1 and PD-L2 Is Associated with Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res Treat*, 49, n. 1, p. 246-254, Jan 2017.

KALE, J.; OSTERLUND, E. J.; ANDREWS, D. W. BCL-2 family proteins: changing partners in the dance towards death. *Cell Death Differ*, 25, n. 1, p. 65-80, 01 2018.

KASHIMURA, S.; SAZE, Z.; TERASHIMA, M.; SOETA, N. *et al.* CD83(+) dendritic cells and Foxp3(+) regulatory T cells in primary lesions and regional lymph nodes are inversely correlated with prognosis of gastric cancer. *Gastric Cancer*, 15, n. 2, p. 144-153, Apr 2012.

KATABI, N.; GHOSSEIN, R.; HO, A.; DOGAN, S. *et al.* Consistent PLAG1 and HMGA2 abnormalities distinguish carcinoma ex-pleomorphic adenoma from its de novo counterparts. *Hum Pathol*, 46, n. 1, p. 26-33, Jan 2015.

KATABI, N.; GOMEZ, D.; KLIMSTRA, D. S.; CARLSON, D. L. *et al.* Prognostic factors of recurrence in salivary carcinoma ex pleomorphic adenoma, with emphasis on the carcinoma histologic subtype: a clinicopathologic study of 43 cases. *Hum Pathol*, 41, n. 7, p. 927-934, Jul 2010.

KAYA, E. A.; TAYLOR, Z. C.; MITCHELL, B. J.; GUSS, Z. D. *et al.* Clinicopathologic Features and Survival Trends for Acinic Cell Carcinoma of the Major Salivary Glands: A Surveillance, Epidemiology, and End Results Population Analysis. *World J Oncol*, 11, n. 5, p. 188-196, Oct 2020.

KHELFA, Y.; MANSOUR, M.; ABDEL-AZIZ, Y.; RAUFI, A. *et al.* Relapsed Acinic Cell Carcinoma of the Parotid Gland With Diffuse Distant Metastasis: Case Report With Literature Review. *J Investig Med High Impact Case Rep*, 4, n. 4, p. 2324709616674742, 2016.

KIMPLE, A. J.; AUSTIN, G. K.; SHAH, R. N.; WELCH, C. M. *et al.* Polymorphous low-grade adenocarcinoma: a case series and determination of recurrence. *Laryngoscope*, 124, n. 12, p. 2714-2719, Dec 2014.

KLEMKE, M.; MÜLLER, M. H.; WOSNIOK, W.; MARKOWSKI, D. N. *et al.* Correlated expression of HMGA2 and PLAG1 in thyroid tumors, uterine leiomyomas and experimental models. *PLoS One*, 9, n. 2, p. e88126, 2014.

KONISHI, J.; YAMAZAKI, K.; AZUMA, M.; KINOSHITA, I. *et al.* B7-H1 expression on non-small cell lung cancer cells and its relationship with tumor-infiltrating lymphocytes and their PD-1 expression. *Clin Cancer Res*, 10, n. 15, p. 5094-5100, Aug 2004.

LARSEN, S. R.; BJØRNDAL, K.; GODBALLE, C.; KROGDAHL, A. Prognostic significance of Ki-67 in salivary gland carcinomas. *J Oral Pathol Med*, 41, n. 8, p. 598-602, Sep 2012.

LATCHMAN, Y.; WOOD, C. R.; CHERNOVA, T.; CHAUDHARY, D. *et al.* PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation. *Nat Immunol*, 2, n. 3, p. 261-268, Mar 2001.

LAWAL, A. O.; ADISA, A. O.; KOLUDE, B.; ADEYEMI, B. F. Malignant salivary gland tumours of the head and neck region: a single institutions review. *Pan Afr Med J*, 20, p. 121, 2015.

LESSENE, G.; CZABOTAR, P. E.; COLMAN, P. M. BCL-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov*, 7, n. 12, p. 989-1000, Dec 2008.

LINGAM, R. K.; DAGHIR, A. A.; NIGAR, E.; ABBAS, S. A. *et al.* Pleomorphic adenoma (benign mixed tumour) of the salivary glands: its diverse clinical, radiological, and histopathological presentation. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 49, n. 1, p. 14-20, Jan 2011.

LOPES, M. A.; DA CRUZ PEREZ, D. E.; DE ABREU ALVES, F.; DE ALMEIDA, O. P. *et al.* Clinicopathologic and immunohistochemical study of intraoral mucoepidermoid carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 134, n. 4, p. 622-626, Apr 2006.

LOPES, M. L.; BARROSO, K. M.; HENRIQUES, Á.; DOS SANTOS, J. N. *et al.* Pleomorphic adenomas of the salivary glands: retrospective multicentric study of 130 cases with emphasis on histopathological features. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, Aug 2016.

LUUKKAA, H.; KLEMI, P.; LEIVO, I.; VAHLBERG, T. *et al.* Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. *Acta Oncol*, 45, n. 6, p. 669-675, 2006.

LYFORD-PIKE, S.; PENG, S.; YOUNG, G. D.; TAUBE, J. M. *et al.* Evidence for a role of the PD-1:PD-L1 pathway in immune resistance of HPV-associated head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res*, 73, n. 6, p. 1733-1741, Mar 2013.

MAMLOUK, M. D.; ROSBE, K. W.; GLASTONBURY, C. M. Paediatric parotid neoplasms: a 10 year retrospective imaging and pathology review of these rare tumours. *Clin Radiol*, 70, n. 3, p. 270-277, Mar 2015.

MANJUNATHA, B. S.; KUMAR, G. S.; RAGHUNATH, V. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in benign and malignant salivary gland tumors. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 16, n. 4, p. e503-507, Jul 2011.

MCILWAIN, D. R.; BERGER, T.; MAK, T. W. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 7, n. 4, Apr 01 2015.

MESSAL, N.; SERRIARI, N. E.; PASTOR, S.; NUNÈS, J. A. *et al.* PD-L2 is expressed on activated human T cells and regulates their function. *Mol Immunol*, 48, n. 15-16, p. 2214-2219, Sep 2011.

MIRANDA VIANA, A. E. C.; RIBEIRO, D. C.; FLORÊNCIO, T. N.; SANTOS, V. T. *et al.* Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a role in the control of apoptosis? *Acta Histochem*, 115, n. 6, p. 564-568, Jul 2013.

MÜLLER, M.; AGAIMY, A.; ZENK, J.; ETTL, T. *et al.* The prognostic impact of human leukocyte antigen (HLA) class I antigen abnormalities in salivary gland cancer. A clinicopathological study of 288 cases. *Histopathology*, 62, n. 6, p. 847-859, May 2013.

NAKANO, T.; TAKIZAWA, K.; UEZATO, A.; TAGUCHI, K. *et al.* Prognostic value of programmed death ligand-1 and ligand-2 co-expression in salivary gland carcinomas. *Oral Oncol*, 90, p. 30-37, 03 2019.

NEVILLE, B.; DAMM, D.; ALLEN, C.; CHI, A. Oral and maxillofacial pathology: Salivary Gland Tumors. 4^a ed. USA: Saunders, 2016. 928 p. 9781455770526.

NGUYEN, L. H.; BLACK, M. J.; HIER, M.; CHAUVIN, P. *et al.* HER2/neu and Ki-67 as prognostic indicators in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. *J Otolaryngol*, 32, n. 5, p. 328-331, Oct 2003.

NIKITAKIS, N. G.; TOSIOS, K. I.; PAPANIKOLAOU, V. S.; RIVERA, H. *et al.* Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. *Mod Pathol*, 17, n. 4, p. 407-415, Apr 2004.

NÄSMAN, A.; ANDERSSON, E.; MARKLUND, L.; TERTIPIS, N. *et al.* HLA class I and II expression in oropharyngeal squamous cell carcinoma in relation to tumor HPV status and clinical outcome. *PLoS One*, 8, n. 10, p. e77025, 2013.

PARDOLL, D. M. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer*, 12, n. 4, p. 252-264, Mar 22 2012.

PASSADOR-SANTOS, F.; GRÖNROOS, M.; IRISH, J.; GILBERT, R. *et al.* Clinicopathological characteristics and cell cycle proteins as potential prognostic factors in myoepithelial carcinoma of salivary glands. *Virchows Arch*, 468, n. 3, p. 305-312, Mar 2016.

PATEL, T. D.; VAZQUEZ, A.; DUBAL, P. M.; BAREDES, S. *et al.* Sinonasal neuroendocrine carcinoma: a population-based analysis of incidence and survival. *Int Forum Allergy Rhinol*, 5, n. 5, p. 448-453, May 2015.

PERAZA, A.; GÓMEZ, R.; BELTRAN, J.; AMARISTA, F. J. Mucoepidermoid carcinoma. An update and review of the literature. *J Stomatol Oral Maxillofac Surg*, 121, n. 6, p. 713-720, Dec 2020.

PINKSTON, J. A.; COLE, P. Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population-based study. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 120, n. 6, p. 834-840, Jun 1999.

QANNAM, A.; BELLO, I. O. Comparison of histological grading methods in mucoepidermoid carcinoma of minor salivary glands. *Indian J Pathol Microbiol*, 59, n. 4, p. 457-462, 2016.

RADOÏ, L.; BARUL, C.; MENVIELLE, G.; CARTON, M. *et al.* Risk factors for salivary gland cancers in France: Results from a case-control study, the ICARE study. *Oral Oncol*, 80, p. 56-63, 05 2018.

RAYESS, H. M.; DEZUBE, A.; BAWAB, I.; RAZA, S. N. *et al.* Tumor Differentiation as a Prognostic Factor for Major Salivary Gland Malignancies. *Otolaryngol Head Neck Surg*, 157, n. 3, p. 454-461, Sep 2017.

REINHEIMER, A.; VIEIRA, D. S.; CORDEIRO, M. M.; RIVERO, E. R. Retrospective study of 124 cases of salivary gland tumors and literature review. *J Clin Exp Dent*, 11, n. 11, p. e1025-e1032, Nov 2019.

RODRIGUEZ, C. P.; WU, Q. V.; VOUTSINAS, J.; FROMM, J. R. *et al.* A Phase II Trial of Pembrolizumab and Vorinostat in Recurrent Metastatic Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Salivary Gland Cancer. *Clin Cancer Res*, 26, n. 4, p. 837-845, 02 15 2020.

ROH, J. L.; CHOI, S. H.; LEE, S. W.; CHO, K. J. *et al.* Carcinomas arising in the submandibular gland: high propensity for systemic failure. *J Surg Oncol*, 97, n. 6, p. 533-537, May 01 2008.

SATO, F.; AKIBA, J.; KAWAHARA, A.; NAITO, Y. *et al.* The expression of programmed death ligand-1 could be related with unfavorable prognosis in salivary duct carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 47, n. 7, p. 683-690, Aug 2018.

SCHMUTH, M.; SIDOROFF, A.; DANNER, B.; TOPAR, G. *et al.* Reduced number of CD1a+ cells in cutaneous B-cell lymphoma. *Am J Clin Pathol*, 116, n. 1, p. 72-78, Jul 2001.

SELIGER, B.; KLOOR, M.; FERRONE, S. HLA class II antigen-processing pathway in tumors: Molecular defects and clinical relevance. *Oncoimmunology*, 6, n. 2, p. e1171447, 2017.

SHETTY, A.; GEETHAMANI, V. Role of fine-needle aspiration cytology in the diagnosis of major salivary gland tumors: A study with histological and clinical correlation. *J Oral Maxillofac Pathol*, 20, n. 2, p. 224-229, 2016 May-Aug 2016.

SIMARD, E. P.; TORRE, L. A.; JEMAL, A. International trends in head and neck cancer incidence rates: differences by country, sex and anatomic site. *Oral Oncol*, 50, n. 5, p. 387-403, May 2014.

SOWA, P.; MISIOLEK, M.; ORECKA, B.; CZECIOR, E. *et al.* Serum levels of selected adipocytokines in benign and malignant parotid gland tumor patients. *Cytokine*, 106, p. 40-44, Jun 2018.

SPAFFORD, P. D.; MINTZ, D. R.; HAY, J. Acinic cell carcinoma of the parotid gland: review and management. *J Otolaryngol*, 20, n. 4, p. 262-266, Aug 1991.

SPEIGHT, P. M.; BARRETT, A. W. Prognostic factors in malignant tumours of the salivary glands. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 47, n. 8, p. 587-593, Dec 2009.

SPIRO, R. H.; HUVOS, A. G.; STRONG, E. W. Adenocarcinoma of salivary origin. Clinicopathologic study of 204 patients. *Am J Surg*, 144, n. 4, p. 423-431, Oct 1982.

STANKOVIC, B.; BJØRHOVDE, H. A. K.; SKARSHAUG, R.; AAMODT, H. *et al.* Immune Cell Composition in Human Non-small Cell Lung Cancer. *Front Immunol*, 9, p. 3101, 2018.

STENMAN, G.; FEHR, A.; SKÁLOVÁ, A.; VANDER POORTEN, V. *et al.* Chromosome Translocations, Gene Fusions, and Their Molecular Consequences in Pleomorphic Salivary Gland Adenomas. *Biomedicines*, 10, n. 8, Aug 14 2022.

TAIT, S. W.; GREEN, D. R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 11, n. 9, p. 621-632, Sep 2010.

TAKAGI, M.; ONO, T.; NATSUME, T.; SAKAMOTO, C. *et al.* Ki-67 and condensins support the integrity of mitotic chromosomes through distinct mechanisms. *J Cell Sci*, 131, n. 6, Mar 22 2018.

TAKKEM, A.; BARAKAT, C.; ZAKARAIA, S.; ZAID, K. *et al.* Ki-67 Prognostic Value in Different Histological Grades of Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Asian Pac J Cancer Prev*, 19, n. 11, p. 3279-3286, Nov 29 2018.

TANG, Q. L.; FAN, S.; LI, H. G.; CHEN, W. L. *et al.* Expression of Cyr61 in primary salivary adenoid cystic carcinoma and its relation to Ki-67 and prognosis. *Oral Oncol*, 47, n. 5, p. 365-370, May 2011.

TCHEKMEDYIAN, V. Salivary Gland Cancers. *Hematol Oncol Clin North Am*, 35, n. 5, p. 973-990, 10 2021.

TO, V. S.; CHAN, J. Y.; TSANG, R. K.; WEI, W. I. Review of salivary gland neoplasms. *ISRN Otolaryngol*, 2012, p. 872982, 2012.

TRIANTAFILLIDOU, 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*, 12, n. 4, p. 364-370, Jul 2006.

TSENG, S. Y.; OTSUJI, M.; GORSKI, K.; HUANG, X. *et al.* B7-DC, a new dendritic cell molecule with potent costimulatory properties for T cells. *J Exp Med*, 193, n. 7, p. 839-846, Apr 2001.

VANDER POORTEN, V.; TRIANTAFYLLOU, A.; THOMPSON, L. D.; BISHOP, J. *et al.* Salivary acinic cell carcinoma: reappraisal and update. *Eur Arch Otorhinolaryngol*, 273, n. 11, p. 3511-3531, Nov 2016.

VASCONCELOS, A. C.; NÖR, F.; MEURER, L.; SALVADORI, G. *et al.* Clinicopathological analysis of salivary gland tumors over a 15-year period. *Braz Oral Res*, 30, 2016.

VILLADANGOS, J. A.; SCHNORRER, P.; WILSON, N. S. Control of MHC class II antigen presentation in dendritic cells: a balance between creative and destructive forces. *Immunol Rev*, 207, p. 191-205, Oct 2005.

WAHLBERG, P.; ANDERSON, H.; BIÖRKLUND, A.; MÖLLER, T. *et al.* Carcinoma of the parotid and submandibular glands--a study of survival in 2465 patients. *Oral Oncol*, 38, n. 7, p. 706-713, Oct 2002.

WALDRON, C. A.; EL-MOFTY, S. K.; GNEPP, D. R. Tumors of the intraoral minor salivary glands: a demographic and histologic study of 426 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 66, n. 3, p. 323-333, Sep 1988.

WANG, A.; WANG, H. Y.; LIU, Y.; ZHAO, M. C. *et al.* The prognostic value of PD-L1 expression for non-small cell lung cancer patients: a meta-analysis. *Eur J Surg Oncol*, 41, n. 4, p. 450-456, Apr 2015.

WANG, X. D.; MENG, L. J.; HOU, T. T.; HUANG, S. H. Tumours of the salivary glands in northeastern China: a retrospective study of 2508 patients. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 53, n. 2, p. 132-137, Feb 2015.

XU, B.; ANEJA, A.; GHOSSEIN, R.; KATABI, N. Predictors of Outcome in the Phenotypic Spectrum of Polymorphous Low-grade Adenocarcinoma (PLGA) and Cribriform Adenocarcinoma of Salivary Gland (CASG): A Retrospective Study of 69 Patients. *Am J Surg Pathol*, 40, n. 11, p. 1526-1537, 11 2016.

YAGYUU, T.; OBAYASHI, C.; UEYAMA, Y.; TAKANO, M. *et al.* Multivariate analyses of Ki-67, cytokeratin 13 and cytokeratin 17 in diagnosis and prognosis of oral precancerous lesions. *J Oral Pathol Med*, 44, n. 7, p. 523-531, Aug 2015.

YAVORSKI, J. M.; BLANCK, G. MHC class II associated stomach cancer mutations correlate with lack of subsequent tumor development. *Mol Clin Oncol*, 7, n. 6, p. 1119-1121, Dec 2017.

YIH, W. Y.; KRATOCHVIL, F. J.; STEWART, J. C. Intraoral minor salivary gland neoplasms: review of 213 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 63, n. 6, p. 805-810, Jun 2005.

ZEINER, P. S.; ZINKE, J.; KOWALEWSKI, D. J.; BERNATZ, S. *et al.* CD74 regulates complexity of tumor cell HLA class II peptidome in brain metastasis and is a positive prognostic marker for patient survival. *Acta Neuropathol Commun*, 6, n. 1, p. 18, Mar 01 2018.

ZHANG, X.; LIU, X.; ZHOU, D.; ZHENG, G. Targeting anti-apoptotic BCL-2 family proteins for cancer treatment. *Future Med Chem*, 12, n. 7, p. 563-565, 04 2020.

ZIELIŃSKI, R.; KOBOS, J.; ZAKRZEWSKA, A. Comparison between immunohistochemical expression of Ki-67 and MCM-3 in major salivary gland epithelial tumors in children and adolescents. Preliminary study. *Pol J Pathol*, 67, n. 4, p. 351-356, 2016.

APÊNDICE 1 - Metodologia expandida

Aspectos éticos

A presente pesquisa foi aprovada pelos Comitês de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC) sob o número de registro CAAE: 09840519.6.0000.0121 e da Universidade Autônoma de Baja California protocolo (005/2018) de acordo com a declaração de Helsinki (ver em anexo).

Delineamento do estudo

O estudo realizado foi de natureza básica, observacional, analítico e transversal. Os resultados foram avaliados de forma quantitativa e qualitativa.

Amostra

As amostras de tecido foram adquiridas dos laboratórios de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC, Brasil) e do Departamento de Patologia do Hospital Geral do Instituto Mexicano do Seguro Social (México) obtidas através de convênio com a Universidade Autônoma de Baja California.

A amostra foi composta por um total de 109 biópsias incisionais ou peças cirúrgicas de participantes de pesquisa, sendo 43 casos de neoplasia maligna de glândula salivar (MSGN) (Tabela 1), 61 casos de neoplasia benigna de glândula salivar (adenoma pleomórfico) e 5 casos de tecido glandular sadio (NSG) como grupo controle. As biópsias para o grupo de tecido glandular normal foram obtidas da periferia das mucocelos ou diagnóstico impreciso para a síndrome de Sjögren. Também foram obtidos os dados clínicos dos participantes de pesquisa, como sexo, idade, localização anatômica da lesão e doenças de base por intermédio da consulta de prontuários médicos e laudos anatomopatológicos.

Tabela 9. Neoplasias malignas de glândula salivar (tipo de neoplasia e quantidade de casos obtidos por cada universidade).

Neoplasia	N.º de casos (México)	N.º de casos (Brasil)
CAC	10	5
CCA	4	-
CME	8	4
CAEXAP	2	2
CLE	2	-
CAME	2	-
CS	4	-
Total	32	11

Fonte: Elaborado pelos autores

Crítérios de Inclusão

- Casos diagnosticados histopatologicamente como AP ou NMGS.
- Os participantes de pesquisa incluídos neste estudo tinham idades entre 18 e 90 anos.
- Os blocos de parafina foram avaliados quanto à quantidade e a qualidade de fixação do material para possibilitar a obtenção de no mínimo 2 lâminas de 5 µm de espessura e 4 lâminas silanizadas de 3 µm de espessura.

Crítérios de Exclusão

- Participantes de pesquisa menores de 18 anos de idade.
- Espécimes em que não foi possível a execução de todas as etapas referente à preparação histológica e à técnica de imuno-histoquímica (IHQ);

Análise histopatológica

Com o objetivo de se confirmar o diagnóstico de neoplasia benigna ou maligna de glândula salivar foram realizados cortes de 5 µm de espessura dos tecidos incluídos em parafina e as lâminas obtidas foram coradas pelo método de hematoxilina e eosina (H&E). Seguindo os critérios diagnósticos da OMS (2017), a análise foi realizada de forma simultânea por dois examinadores (RG e AG) utilizando microscópio multiobservador.

Reações imuno-histoquímicas

As reações IHQ permitirão verificar a expressão das proteínas CD1a, CD83, HLA-DR, Ki-67, PD-L1, PD-L2, BCL-2 E BAX.

Para IH foram montadas secções histológicas de 3 µm de espessura em lâminas de vidro preparadas com 3-aminopropiltietoxisilano (Sigma Chemical Co.,

St. Louis, MO, EUA). Em seguida, as lâminas foram colocadas em uma estufa a 50-100 °C por 1 hora e após 10 min fora da estufa, os cortes teciduais prontos para começar a reação, foram colocadas numa cuba de vidro contendo xilol durante a noite. No dia seguinte, um segundo banho com xilol foi feito nas lâminas durante 20 minutos a temperatura ambiente (TA). Após as lâminas foram hidratadas em solução com concentrações decrescentes de etanol (3x100%, 95% e 85%), e lavadas duas vezes com água destilada. A atividade endógena da peroxidase foi bloqueada usando álcool metílico e peróxido de hidrogênio (H₂O₂) de 20 volumes em ambiente escuro com 20 minutos de incubação e uma segunda incubação de 10 minutos. Lavagens de 5 minutos com solução salina tamponada com fosfato (PBS) (pH 7,4) e água destilada foram aplicadas.

A recuperação antigênica foi realizada por imersão das lâminas em solução de tampão citrato ao 10% diluído com água destilada num banho-maria a 96 °C por 40 minutos. Depois disso, a cuba contendo as lâminas foi retirada do banho-maria e mantida a TA por 30 minutos. Os cortes foram lavados duas vezes com PBS durante 5 minutos. O bloqueio das ligações não específicas foi feito incubando as lâminas em solução contendo 100ml de PBS e 5g de leite em pó por 40 minutos. Após este tempo, as lâminas foram lavadas novamente duas vezes com PBS por 5 minutos antes da incubação do anticorpo primário.

As seções foram incubadas com os anticorpos primários diluídos em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4 °C. Os dados técnicos dos anticorpos primários, especificações e fabricantes estão descritos no Quadro 1.

Quadro 1. Descrição dos anticorpos primários utilizados.

Anticorpo	Clone	Origem	Diluição	Fabricante	Controle positivo	Tipo de marcação
CD1a	010	Monoclonal de camundongo	1:100	Dako	Células de timo	Membrana e citoplasma
CD83	1H4b	Monoclonal de camundongo	1:20	Novocastra	Tonsila	Membrana e citoplasma
HLA-DR	TAL 1B5	Monoclonal de camundongo	1:50	Dako	Tonsila	Membrana e citoplasma
KI-67	MIB-1	Monoclonal de camundongo	1:150	Dako	Cólon câncer	Nuclear
PD-L1	28-8	Monoclonal de coelho	1:200	Abcam	Tonsila	Membrana e Endomembrana
PD-L2	polyclonal	Policlonal de coelho	1:100	Abcam	Câncer de tireoide	Membrana e Endomembrana
BCL-2	C-2	Monoclonal de camundongo	1:50	Santa Cruz	Cólon	Membrana e citoplasma
BAX	B-9	Monoclonal de camundongo	1:30	Santa Cruz	Glândula salivar	Membrana e citoplasma

Fonte: Elaborado pelos autores

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram lavadas em PBS (2 vezes) e incubadas com o anticorpo secundário EnVision Dual Link System-HRP (Dako, California, EUA) durante 60 minutos a 37 °C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS (2 vezes). A seguir, a reação antígeno/anticorpo foi feita usando o substrato de cromôgeno (DAB, Dako, California, USA) que consiste em adicionar 1 gota (ou 20 µL) do cromôgeno por mL de tampão. Com 50-100 µL (dependendo do tamanho da amostra) desta solução foram colocados acima do tecido durante 4 minutos em cada lâmina. Após os 4 minutos, as lâminas foram colocadas em água destinada e quando todas as lâminas foram tratadas, foi feita uma segunda lavagem com água destilada por 5 minutos.

A contra-coloração foi feita com hematoxilina de Harris por 3 minutos e em seguida as lâminas foram lavadas com água corrente por 5 minutos. A remoção do pigmento fórmico foi feita com 3 imersões rápidas na solução aquosa de hidróxido

de amônio a 1% e após as lâminas foram lavadas com água corrente por 2 minutos. A desidratação dos tecidos foi feita com concentrações crescentes de etanol (85%, 95% e 100%) A diafanização foi feita com 2 imersões de 20 minutos com xilol. Finalmente, a montagem das lâminas foi feita com Entellan®. Um controle negativo foi incluído em cada reação IH, omitindo o anticorpo primário. Na padronização dos anticorpos foi utilizado um controle positivo de acordo com as recomendações do fabricante. Os controles positivos estão especificados na tabela 3.

Avaliação da imunorreatividade

As lâminas foram analisadas por um examinador calibrado e cego. Um teste de Kappa intraexaminador foi feito antes das análises ($K_p > 0,78$).

Análise para os anticorpos anti-CD1a e anti-CD83

Dez campos de área intratumoral e peritumoral de cada lâmina foram capturados, de acordo com as áreas de maior marcação celular ou “hotspots” numa magnificação de 400x em microscópio óptico trinocular (Axiostar plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de captura de imagens digitais (A620, Cannon, Lake Success, NY, EUA) e um microcomputador (AOC, Miami, EUA), onde as imagens foram armazenadas. A quantificação de CDs CD1a+ e CD83+ por mm² de tecido neoplásico (um mínimo de 1 mm² de área de tecido) foi feita em cada lâmina histológica com auxílio do software Image J 1.51k (Maryland, EUA). Após a determinação da média de CDs/mm² e desvio padrão (DP), os diferentes grupos foram comparados estatisticamente, e os dados clínicos foram correlacionados.

Análise para os anticorpos anti- PD-L1 e anti-PD-L2

A intensidade de coloração foi classificada de 0 a 3 (0, negativo; 1, fraco; 2, moderado; 3, forte) e a porcentagem de células coradas positivamente foi atribuída de 0 a 3 (0 = negativo; 1 = <25%; 2 = 25-50% e 3 = > 50%) por dois examinadores calibrados e cegos (R.G. e A.G.G.C). O H-score também foi calculado para avaliar a expressão da proteína neoplásica em relação a intensidade da imunomarcacão e porcentagem de células positivas (CHANG; KIM; CHOI; CHO *et al.*, 2017; MIRANDA VIANA; RIBEIRO; FLORÊNCIO; SANTOS *et al.*, 2013).

Análise para os anticorpos anti-BCL-2 e anti- BAX

Para a análise da coloração BAX e BCL-2, cinco campos de cada lâmina foram capturados com aumento de 400x por microscópio óptico trinocular (Axiostar plus, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), acoplado a um sistema de aquisição de imagem digital (A620, Canon, Lake Success, NY, EUA) e um microcomputador (AOC, Miami, EUA), onde foram armazenadas as imagens. Mil células por neoplasia foram contadas, e a imunorreatividade foi avaliada e registrada como uma porcentagem de células neoplásicas positivas sobre o número total de células neoplásicas na mesma área.

Os casos também foram classificados qualitativamente com uma pontuação de 0 (<5% de células positivas), 1 (5-50% de células positivas) e 2 (>50% de células positivas) (GOULART-FILHO; MONTALLI; PASSADOR-SANTOS; DE ARAÚJO *et al.*, 2019).

Razão BCL-2/BAX

Em cada caso, a razão antiapoptótica (AI) foi calculado dividindo a porcentagem de células BCL-2 (+) pela porcentagem de células BAX (+). Amostras com AI superior a um foram consideradas como tendo maior atividade antiapoptótica do que amostras exibindo AI inferior a 1 (GOMES; BERNARDES; DINIZ; DE MARCO *et al.*, 2012).

Estratificação de risco

As neoplasias malignas foram classificadas pelas características histopatológicas em baixo risco (BR), risco intermediário (RI) e alto risco (AR) segundo características histopatológicas seguindo as metodologias de outros autores e a estratificação de risco da OMS (Quadro 2).

Quadro 2. Referências para a estratificação de risco das neoplasias
malignas de glândula salivar.

NMGS	Referências	PMID
CME	BRANDWEIN; IVANOV; WALLACE; HILLE <i>et al.</i> , 2001	11420454
CAC	SZANTO; LUNA; TORTOLEDO; WHITE, 1984	6088017
CCA	SEETHALA, 2009	20596994
CAEXAP	SEETHALA, 2009	20596994
CLE	SEETHALA, 2011	21169736
CAME	SEETHALA, 2011	21169736
CS	XU; VISWANATHAN; UMRAU; AL-AMERI <i>et al.</i> , 2022	35974431

Abreviaturas: NMGS, neoplasias malignas de glândulas salivares; CME, carcinoma mucoepidermoide; CAC, carcinoma adenoide cístico; CCA, carcinoma de células acinares; CAEXAP, carcinoma ex adenoma pleomórfico; CLE, carcinoma linfoepitelial; CAME, carcinoma mioepitelial; CS, carcinoma secretor.

Fonte: elaborado pelos autores

Análise estatística

As distribuições das amostras foram significativamente não normais ($p < 0,05$) para as variáveis IHQ, de acordo com o teste de Shapiro-Wilk. Os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram utilizados para as análises quantitativas assim como para a análise do IA que apresentaram as proteínas BAX e BCL-2, seguidos pelo teste post hoc de Dunn quando relevante. O teste de correlação de Spearman foi usado para avaliar o índice Ki-67 e os imunomarcadores CD1a, CD83 e HLA-DR. As características clínico-patológicas foram analisadas por meio do teste t de Student, o teste do qui-quadrado e o teste exato de Fisher. A análise estatística foi realizada por meio do software IBM SPSS Statistics for Windows, versão 23.0 (IBM, Nova York, Estados Unidos), e o nível de significância estatística foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

ANEXO A – Aprobación do comitê de ética (México)



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA
ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD, VALLE DE LAS PALMAS
COMITÉ DE ÉTICA EN INVESTIGACIÓN



Asunto: Dictamen de protocolos presentados al
Comité de Ética en Investigación

Dra. Katya Pulido Díaz
PRESENTE

Por medio del presente y en respuesta a la revisión realizada el 18 de enero de 2019, basada en los elementos presentados al Comité de Ética en Investigación de la Escuela de Ciencias de la Salud, Valle de las Palmas, se comunica que el protocolo de investigación titulado **"Inmunomarcaje de células dendríticas en neoplasias malignas de glándulas salivales"** con registro 005/2018, versión 1, con fecha de recepción el 12 de diciembre de 2018 y con sede en la Escuela de Ciencias de la Salud Unidad Valle de las Palmas, UABC y el HGR #1 del IMSS, se encuentra **APROBADO**, por cumplir con los requisitos establecidos.

Por tal motivo se le solicita que envíe su **carta compromiso en físico con fecha y firma** en la que incluya el compromiso de entregar:

1. Protocolo en físico o digital en donde se presenten los investigadores responsables actuales del proyecto de investigación.
2. Reporte(s) de avances o en su caso, la terminación o cancelación del protocolo. Terminación o suspensión prematura del estudio, las razones y los resultados obtenidos al completar el estudio.
3. Notificación de enmiendas al protocolo, tales como material de reclutamiento e información para los potenciales participantes en la investigación, formato de consentimiento informado o enmiendas que eventualmente pudiera afectar los derechos, la seguridad o el bienestar de los participantes en la investigación.
4. Reporte de eventos adversos serios e inesperados relacionados con la conducción del estudio o circunstancias imprevistas. Así como cualquier situación o nuevo conocimiento que mostrara un mayor riesgo para los participantes.
5. Resumen final de los resultados del estudio e informar sobre la publicación del mismo.

El oficio de aprobación se entregará posterior a la recepción de la información solicitada.

Este documento tiene vigencia de un año a partir de la fecha de emisión. Se extiende el presente el 23 de enero de 2019.

ATENTAMENTE
Integrantes del Comité

 Nydia Alejandra Castillo Martínez Presidente	 José Román Chávez Méndez Secretario
 María Lusa García Gomar Vocal	 Gilberto Quiñonez Palacio Vocal
 Nereyda Cruz Zúñiga Vocal	 ESCUELA DE CIENCIAS DE LA SALUD VALLE DE LAS PALMAS

ANEXO B – Aprovação do comitê de ética UFSC

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DOS MARCADORES MOLECULARES PLAG-1, HMGA-2, CD1a, CD83, PD-L1, PD-L2, BCL-2 e BAX EM TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

Pesquisador: Rogério de Oliveira Gondak

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 09840519.6.0000.0121

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.254.600

Apresentação do Projeto:

Título da Pesquisa:

ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA DOS MARCADORES MOLECULARES PLAG-1, HMGA-2, CD1a, CD83, PD-L1, PD-L2, BCL-2 e BAX EM TUMORES DE GLÂNDULAS SALIVARES

Instituição Proponente:

Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal:

Pesquisador

Apresentação do Projeto:

Pesquisador principal / orientador:

Prof. Dr. Rogério Gondak

Tipo de estudo:

Programa de Pós-Graduação / Doutorado em Odontologia

Aluno: Ana Guadalupe Gama Cuellar

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vítor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANÓPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.254.000

Serão realizadas análises histopatológicas e reações imunoistoquímicas contra os anticorpos PLAG-1, HMGA-2, CD1a e CD83, PD-L1, PD-L2, BCL-2 e BAX em amostras de tumores benignos (40 casos) e malignos de glândulas salivares (40 casos), obtidos do laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC, Brasil).

Os pacientes incluídos neste estudo terão idade entre 18 e 90 anos e os respectivos blocos de tecidos emblocados em parafina serão avaliados quanto à quantidade e a qualidade de fixação do material e deverá possibilitar a obtenção de no mínimo 2 lâminas histológicas de 5 m de espessura e 4 lâminas silanizadas de 3 m de espessura.

Local do estudo:

Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina

Número de participantes:

80 amostras

Objetivo da Pesquisa:

OBJETIVO GERAL

O objetivo deste projeto será avaliar a expressão imunoistoquímica dos marcadores PLAG-1, HMGA-2, CD1a, CD83, PD-L1, PD-L2, BCL-2 e BAX em tumores benignos e malignos de glândulas salivares.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos deste projeto compreendem:

Realizar uma busca retrospectiva de dados clínicos (idade, sexo e localização anatômica) de pacientes diagnosticados com

tumores benignos e malignos de glândulas salivares

Revisar todas as lâminas histológicas obtidas dos pacientes com a finalidade de diagnóstico ou tratamento da doença de acordo

com os critérios da OMS (2017);

Avaliar a expressão imunoistoquímica dos anticorpos anti-

PLAG-1, anti-HMGA-2, anti-PD-L1, anti-PD-L2, anti-BCL-2 e anti-BAX nos tumores benignos e malignos de glândulas salivares;

Quantificar, por meio de análise histomorfométrica, as CDs imaturas e maduras, imunomarcadas respectivamente pelos anticorpos anti-CD1a e anti-CD83, nos tumores benignos e malignos de glândulas salivares;

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.254.600

Correlacionar os achados clínicos-patológicos dos tumores de glândulas salivares com a imunomarcagem por PLAG-1, HMGA-2, PDL-1, PDL-2, CD1a e CD83.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O desconforto ou risco possível é o compartilhamento de informações pessoais. No entanto, ressalto que identidade do participante envolvido, bem como todos os dados ou informações fornecidas serão consideradas confidenciais e mantidas em sigilo.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para os sujeitos participantes desta pesquisa. Os benefícios esperados estão relacionados ao melhor entendimento do papel das células dendríticas e imunomarcadores no desenvolvimento de lesões benignas e malignas de glândulas salivares.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Análises histopatológicas e reações imunoistoquímicas em amostras de tumores benignos (40 casos) e malignos de glândulas salivares (40 casos) de peças pré coletadas do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (LPB-UFSC, Brasil).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Cronograma:

Apresentado e adequado

Orçamento:

Apresentado

Folha de rosto:

Assinada pelo pesquisador responsável Prof. Dr. Rogério Gondak do Departamento de Patologia da UFSC e pela Profa. Elena Riet Correa Rivero, Coordenadora do Programa de Pós Graduação em Odontologia da UFSC.

Declaração das Instituições envolvidas:

Carta de anuência assinada pela Supervisora do Laboratório de Patologia Bucal da UFSC Profa. Elena Riet Correa Rivero.

Informações básicas do projeto:

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401	
Bairro: Trindade	CEP: 88.040-400
UF: SC	Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094	E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC**



Continuação do Parecer: 3.254.600

Apresentada

TCLE:

Apresentado e adequado.

Termos de fácil entendimento.

Endereço do CEPISH apresentado.

Endereço dos pesquisadores apresentado.

Recomendações:

Não se aplica

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não se aplica

Considerações Finais a critério do CEP:

Não se aplica

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1313716.pdf	13/03/2019 16:36:17		Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_Infra.pdf	13/03/2019 16:35:32	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	13/03/2019 16:31:22	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Ana_CEP.pdf	13/03/2019 16:31:13	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito
Folha de Rosto	Folha_rosto_Ana.pdf	13/03/2019 16:30:33	Rogério de Oliveira Gondak	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep_propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 3.254.600

FLORIANOPOLIS, 09 de Abril de 2019

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R. Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br