

**APOPTOSE NAS GLÂNDULAS SALIVARES
HUMANAS: AVALIAÇÃO DE MARCADORES
DURANTE O PROCESSO DE MORFOGÊNESE
DA GLÂNDULA**

AGATHA NAGLI DE MELLO GOMES

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do título de Mestre
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

**Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo**

Co-Orientadora: Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Gomes, Agatha Nagli de Mello

Apoptose nas glândulas salivares humanas: avaliação de marcadores durante o processo de morfogênese da glândula /
Agatha Nagli de Mello Gomes - São Paulo; 2017.

63p.

Dissertação de (Mestrado) - Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. Apoptose/Apoptosis. 2. Glândulas Salivares/Salivary Glands. 3. Morfogênese/Morphogenesis. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Organogênese/Organogenesis.

DEDICATÓRIA

À minha orientadora Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camillo

Pela oportunidade de realizar o presente trabalho sob sua orientação, pelos ensinamentos e amadurecimento acadêmico. Sou grata pela paciência e atenção em todos os momentos que precisei de ajuda. Obrigada por me aconselhar e indicar os melhores caminhos para o meu aperfeiçoamento profissional.

À minha co-orientadora Dra. Silvia Vanessa Lourenço

Pela gentileza em compartilhar seus conhecimentos e ser cuidadosa ao analisar nossos resultados. Obrigada pelas sugestões ao longo do desenvolvimento deste trabalho de maneira objetiva e incentivadora.

À minha família

Por acreditar no meu potencial e pelo incentivo aos estudos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai Pedro, por me dar suporte, segurança e apoio em todas as minhas decisões. Apesar das nossas diferenças, serei eternamente grata por todos os “puxões de orelha” e conselhos incansáveis para eu ser forte na busca dos meus objetivos. Obrigada por se esforçar em querer me ajudar e tentar ao máximo compreender minhas escolhas sejam elas quais forem.

À minha mãe Efigênia, que sempre me apoiou nas minhas decisões e foi compreensiva nos momentos de ausência. Obrigada por me ajudar a ser mais independente e por me motivar a superar todas as minhas dificuldades.

À Carmelita, minha irmã do coração, por ser meu porto seguro! Palavras não conseguem descrever o mais belo sentimento que tenho por você. Obrigada por estar sempre ao meu lado a cada passo da minha vida e me amparar nos momentos de angústia; por ser meu ombro amigo em que eu posso confiar e acreditar que dias melhores virão; por me incentivar a nunca desistir dos meus sonhos e me encorajar até mesmo nos momentos mais difíceis. Obrigada pela família linda: Gabriel, Daniel e Edivaldo.

À minha “segunda família”, meus amigos, que deixaram os meus dias mais felizes e descontraídos. Sem dúvidas foram as melhores companhias, os melhores sorrisos e as melhores aventuras. Obrigada por compartilharem e fazerem parte desses momentos tão importantes para mim, em especial: Irina, Mayara, Elen, Monize, Mariana, Matheus e Fábio.

Ao nosso grupo da Patologia Investigativa e agregados: Helen, Mérin, Beatriz, Elisângela, Renata, Gabriela, Laiane, Maria Luíza, Flávia e Julio, por todas as conversas e risadas. Obrigada Kátia por ser prestativa, me ajudar sempre quando precisei e partilhar dos seus conhecimentos.

À Fundação Antônio Prudente e ao CIPE, por toda infraestrutura para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço também aos professores e funcionários que foram sempre muito atenciosos. Em especial: Severino, Carlinhos, Ivan, Fátima, Aurinete, Marina, Ana, Luciana, Suely e Karla.

À FAPESP (processo 11/02051-6) e ao CNPq, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Gomes ANM. **Apoptose nas glândulas salivares humanas: avaliação de marcadores durante o processo de morfogênese da glândula.** São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

As glândulas salivares são estruturas formadas por um sistema de ductos e ácinos responsáveis por secretar saliva. Originadas pelo mecanismo de morfogênese, apresentam cinco estágios de diferenciação: pré-botão, botão inicial, pseudoglandular, canalicular e botão terminal. A compreensão da morfogênese das glândulas salivares é importante para o esclarecimento dos mecanismos de tumorigênese e os componentes das neoplasias derivadas dessas glândulas. Estudos demonstram que o processo de apoptose desempenha um papel importante na formação do lúmen durante a organogênese, sendo assim, este estudo propõe a avaliação da expressão das proteínas envolvidas no mecanismo de morte e proliferação celular durante o desenvolvimento das glândulas salivares por meio da técnica de imunistoquímica destacando os marcadores BCL2, Survivina, Ki-67, PAR4, FAS, FASL, PHLDA1, Caspase-3 clivada, SPARC e MUC1. Adicionalmente foram avaliados alguns espécimes para as proteínas Caspase-3 total e Caspase-7. Para tanto foram selecionados 50 espécimes de glândulas salivares dissecadas de fetos humanos em diferentes estágios gestacionais, provenientes de abortos espontâneos, e coletados de diferentes locais da cavidade oral. Também foram incluídas 10 amostras de glândulas salivares adultas histologicamente normais provenientes de margens cirúrgicas para comparação com a expressão na glândula em desenvolvimento. As proteínas SPARC e Caspase-3 clivada não foram expressas no parênquima glandular. A proteína MUC1 foi positiva em padrão citoplasmático a partir da fase pseudoglandular nas regiões de abertura luminal primitiva. PHLDA1 foi observada principalmente no citoplasma e raras células com positividade nuclear em quase todas as fases do desenvolvimento, exceto no botão

terminal. As proteínas FAS e FASL foram expressas, simultaneamente, com padrão de membrana em raras células durante o desenvolvimento glandular. PAR4 apresentou positividade em todas as fases, exceto nas porções pré-acinares. A Survivina apresentou padrão citoplasmático nas fases mais precoces e ao longo do desenvolvimento, nas estruturas mais diferenciadas, a marcação foi predominantemente nuclear. A proteína BCL2 foi expressa em raras células e ausente nos ductos intercalares e ácinos. A proteína Ki-67 foi expressa com padrão nuclear principalmente na fase pseudoglandular. Nossos resultados sugerem que proteínas associadas ao mecanismo de regulação da apoptose possam desempenhar um papel relevante durante as fases mais iniciais da morfogênese glandular.

SUMMARY

Gomes ANM. **[Apoptosis in human salivary glands: evaluation of markers during the gland morphogenesis]**. São Paulo; 2017. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Salivary glands are structures formed by a system of ducts and acini responsible for secreting saliva. Salivary glands morphogenesis is divided into five differentiation stages: pre-bud, initial bud, pseudoglandular, canalicular and terminal bud. Understanding the morphogenesis of the salivary glands is important to clarify the mechanisms of tumorigenesis and the components of tumors originated in these glands. Studies show that the process of apoptosis plays an important role in the formation of the lumen during organogenesis. Therefore, in this study the expression of proteins involved in the mechanism of cell death and cellular proliferation was investigated during the development of salivary glands by immunohistochemistry using the markers BCL2, Survivin, Ki-67, PAR4, FAS, FASL, PHLDA1, cleaved Caspase-3, SPARC and MUC1. Additionally, some specimens were evaluated for total Caspase-3 and Caspase-7 proteins. For this purpose, 50 specimens of salivary glands dissected from fetuses in different gestational stages, from miscarriages, and collected from different sites of the oral cavity were selected. We also included 10 specimens of histologically normal adult salivary glands from surgical margins to compare with the expression during gland development. SPARC and cleaved Caspase-3 were not expressed in the glandular parenchyma. MUC1 protein was positive from the pseudoglandular stage in a cytoplasmic pattern in regions of early luminal opening. PHLDA1 was observed mainly in cytoplasmic pattern and rare nuclear positivity in all development phases, except in terminal bud. FAS and FASL protein were expressed, simultaneously, with membrane pattern in rare cells during glandular development. PAR4 showed positivity in all phases, except pre-acinar areas.

Survivin presented cytoplasmic pattern in the early phases and during the development into more differentiated structures, the pattern was predominantly nuclear. BCL2 protein was expressed in rare cells and absent at the intercalated ducts and acini. Ki-67 protein was expressed with nuclear pattern mainly at the pseudoglandular stage. Our results suggest that proteins associated with the regulation of apoptosis may play an important role during the early phases of salivary gland morphogenesis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Imagem ilustrativa da estrutura de uma glândula salivar.....	4
Figura 2	Estágios da morfogênese da glândula salivar.....	6
Figura 3	Mecanismo da apoptose e suas vias envolvidas.....	9
Figura 4	Aspectos histológicos de glândulas salivares em desenvolvimento.....	21
Figura 5	Expressão das proteínas Caspase-3 clivada, Caspase-3 total e Caspase-7 durante a morfogênese das glândulas salivares humanas.....	25
Figura 6	Expressão da proteína SPARC no estroma durante a morfogênese das glândulas salivares humanas.....	26
Figura 7	Expressão da proteína MUC1 durante a morfogênese das glândulas salivares humanas.....	27
Figura 8	Expressão das proteínas anti-apoptóticas e proliferativa durante a morfogênese das glândulas salivares humanas.....	33
Figura 9	Expressão das proteínas pró-apoptóticas durante a morfogênese das glândulas salivares humanas.....	35
Figura 10	Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de glândula salivar sem evidência de neoplasia.....	37

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Descrição das amostras selecionadas com relação à idade gestacional e localização.....	17
Quadro 2	Descrição dos anticorpos primários, clones, fornecedor, diluição de uso e padrão de marcação.....	19
Quadro 3	Expressão das proteínas FAS, FASL, PAR4, PHLDA1, BCL2, SURVIVINA, Ki-67 e MUC1 em diferentes fases da morfogênese das glândulas salivares humanas.....	24
Quadro 4	Expressão da proteína Ki-67 em diferentes fases da morfogênese das glândulas salivares humanas.....	28

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

°C	Graus Celsius
µm	Micrometro
Apaf-1	<i>Apoptotic protease activating factor-1</i>
APO-1	<i>Apoptosis antigen 1</i>
APO-1L	<i>Apoptosis antigen 1 ligand</i>
Bak	<i>BCL2 antagonist killer 1</i>
Bax	<i>BCL2-associated X protein</i>
BCL2	<i>B cell lymphoma protein 2</i>
Bcl-XL	<i>BCL2-related protein long form of Bcl-x</i>
BIR	<i>Baculovirus IAP repeat</i>
BM-40	<i>Basement membrane protein 40</i>
Caspase	<i>Cysteinil aspartate specific proteases</i>
CD95	<i>Cluster of differentiation 95</i>
CD95L	<i>Cluster of differentiation 95 ligand</i>
DAB	Diaminobenzindine
DD	<i>Death domain</i>
EDTA/Tris	Ácido acético diaminotetraetileno/hidroximetil amino metano
FADD	<i>Fas-associated death domain</i>
FAS	Proteína de membrana CD95
FASL	Proteína de membrana CD95L
G0	Estado de parada do ciclo celular
G1	“GAP1” intervalo delimitante entre mitose e síntese de DNA
G2	“GAP2” intervalo após a síntese do DNA e antes da mitose
HE	Hematoxilina e Eosina
IAP	<i>Inhibitor of apoptosis proteins</i>
Ki-67	Marcador de proliferação celular
MEC	Matriz extracelular
MKi-67	Gene da proteína Ki-67
MUC1	<i>Mucin 1</i>

NFκB	<i>Nuclear fator kappa B</i>
PAR4	<i>Prostate apoptosis response 4</i>
PARP	<i>Poly (ADP-ribose) polymerase ADP ribosyltransferase</i>
PAWR	<i>PKC apoptosis WT1 regulator</i>
PHLDA1	<i>Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1</i>
PKC	<i>Proteína quinase C</i>
S	<i>Fase de síntese de DNA da mitose</i>
SPARC	<i>Secreted protein, acidic and rich in cysteine</i>
TDAG51	<i>T-cell Death-Associated Gene 51</i>
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
TNFR1	<i>Tumor necrosis factor receptor 1</i>
WT1	<i>Wilms Tumor 1</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Características gerais das glândulas salivares.....	1
1.2	Morfogênese das glândulas salivares	2
1.3	Apoptose	7
1.4	Justificativa	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivos Gerais	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	16
3.1	Casuística.....	16
3.2	Imunoistoquímica	17
4	RESULTADOS.....	20
4.1	Análise Morfológica (HE).....	20
4.2	Imunoistoquímica	22
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÕES	51
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	53

ANEXO

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARACTERÍSTICAS GERAIS DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares são estruturas exócrinas complexas responsáveis por secretar saliva. Sua estrutura funcional, o parênquima, é formada por um sistema de ductos e ácinos. O estroma, constituído de tecido conjuntivo de suporte, mantém a sustentação do parênquima e também supre as necessidades das glândulas pela presença de nervos, vasos sanguíneos e linfáticos (DALE 1994).

Além das glândulas menores dispersas pela cavidade oral humana – tais como as glândulas labiais, linguais, palatinas e do assoalho – existem três pares de glândulas salivares maiores: as glândulas parótida, submandibular e sublingual (KATCHBURIAN e ARANA 2014).

As glândulas parótidas estão situadas entre o ramo da mandíbula e o músculo esternocleidomastódeo em cada lado da face (KATCHBURIAN e ARANA 2014). O principal ducto desta glândula é o de Stensen, além de ser composta por ductos interlobulares, longos condutos intercalares e numerosos ductos estriados. Os ácinos, a porção secretora, são do tipo serosos que produzem saliva mais aquosa (FERRARIS e MUÑOZ 2006, 2014; DE PAULA F et al. 2017).

As glândulas submandibulares estão localizadas na parte posterior do assoalho da boca, na região medial da mandíbula e envolto pelo músculo milo-hióideo (KATCHBURIAN e ARANA 2014). Seu principal conduto excretor é o

de Wharton, com ductos intercalares menores quando comparados a parótida, além dos ductos estriados que são mais longos e ramificados. A porção acinar é constituída por células mistas, mucosas e serosas, responsável por secretar uma saliva mais viscosa (FERRARIS e MUÑOZ 2006, 2014; DE PAULA F et al. 2017).

As glândulas sublinguais estão presentes na parte anterior do assoalho da boca entre o músculo milo-hióideo e a mucosa (KATCHBURIAN e ARANA 2014). O principal ducto excretor é o de Bartholin com várias unidades assessoras de glândulas menores (ductos de Rivinus) circundada por uma cápsula ligada ao estroma. Possui ductos intercalares curtos e predomínio de células acinares de característica mucosa (FERRARIS e MUÑOZ 2006, 2014; DE PAULA F et al. 2017).

As glândulas salivares menores estão dispersas por toda a cavidade oral, tipicamente na submucosa, exceto na parte anterior e média do palato duro e a gengiva. Os ductos excretores são relativamente curtos e a porção acinar é composta principalmente por células mucosas, entretanto, as glândulas linguais de Von Ebner são constituídas por células serosas (FERRARIS e MUÑOZ 2006, 2014; DE PAULA F et al. 2017).

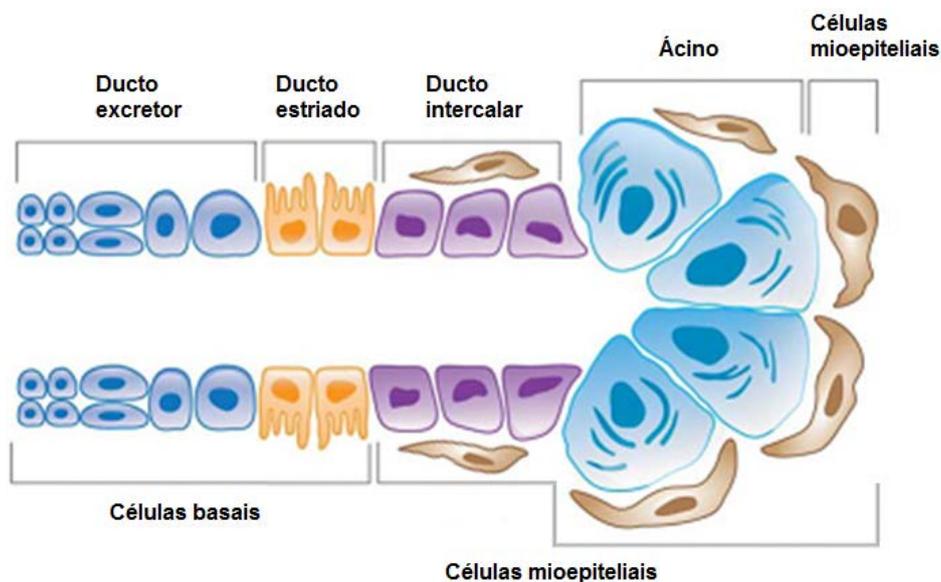
1.2 MORFOGÊNESE DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As estruturas das glândulas salivares são originadas pelo mecanismo de morfogênese que envolve o crescimento, proliferação, diferenciação, migração e morte celular, além da citodiferenciação em que as células assumem funções especializadas (MELNICK e JASKOLL 2000; PATEL et al. 2006, 2011; DE

PAULA F et al. 2017). A partir da cavidade oral primitiva, também conhecida por estomodeo, agrupamentos sólidos de células epiteliais se proliferam e internalizam formando cordões no ectomesênquima subjacente. São, então, desencadeadas ramificações extensivas que dão início ao desenvolvimento do sistema ductal e sua porção final acinar (CUTLER 1990; ELLIS e AUCLAIR 2008).

Para adequada função do sistema ductal, as células epiteliais sólidas são induzidas à canalização que permite a desobstrução do espaço luminal no interior dos ductos, fundamental para a composição e distribuição da saliva (TUCKER 2007; ANDREW e EWALD 2010; HSU e YAMADA 2010; TESHIMA et al. 2016b). O fluido salivar é transportado por estímulos contráteis das células mioepiteliais que viabilizam a passagem entre os ácinos aos ductos, antes de ser secretado na cavidade oral (PATEL e HOFFMAN 2015; DE PAULA F et al. 2017).

O sistema de ductos é constituído por unidades intercalares, ductos estriados e ductos excretores; sendo que as células mioepiteliais envolvem os ductos intercalares e as unidades secretoras acinares, enquanto as células basais estão presentes nas outras porções do sistema ductal (LOURENÇO et al. 2007; TUCKER 2007; IANEZ et al. 2010; NAGAO et al. 2012; ADAMS et al. 2013) (Figura 1).



Fonte: Modificado de ADAMS et al. (2013)

Figura 1 - Imagem ilustrativa da estrutura de uma glândula salivar. Diagrama ilustrativo da estrutura de uma glândula salivar identificada por cada elemento e as células envolvidas em sua composição.

As glândulas salivares surgem ainda no período fetal. O desenvolvimento da glândula parótida inicia-se por volta de 4-6 semanas de vida embrionária; a glândula submandibular em torno de 6 semanas e a glândula sublingual e glândulas salivares menores iniciam-se em torno de 8-12 semanas de vida fetal (CUTLER 1990; DALE 1994; LOURENÇO e KAPAS 2005; LOURENÇO et al. 2008).

TUCKER (2007), utilizando um modelo animal, descreveu o desenvolvimento da glândula salivar em cinco estágios: pré-botão, botão inicial, pseudoglandular, canalicular e botão terminal.

A morfogênese inicia-se a partir do espessamento da cavidade oral primitiva, que permite a origem de estruturas em conformação esférica provenientes dos agregados de células epiteliais, nomeada de fase **pré-botão**. Em seguida, ocorre a proliferação de botões sólidos que crescem e adentram no mesênquima subjacente formando cordões de células epiteliais cuboides

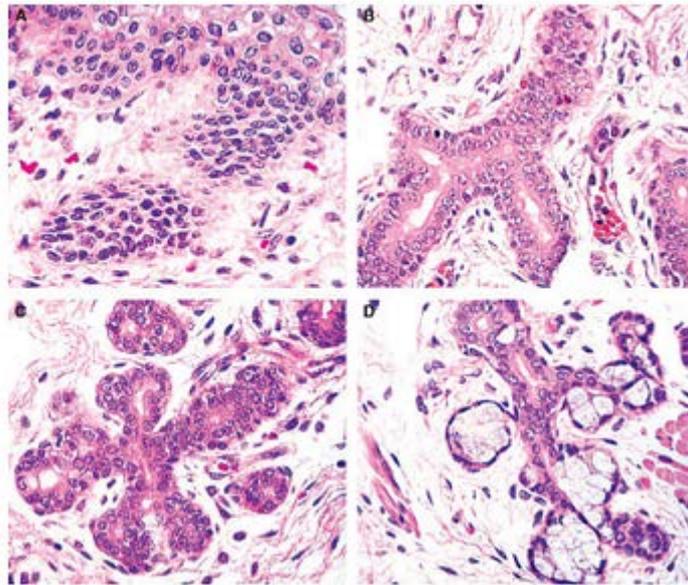
irregulares, chamada fase de **botão inicial** (CUTLER 1990; TUCKER 2007; HSU e YAMADA 2010; PATEL e HOFFMAN 2015; DE PAULA F et al. 2017).

Dando continuidade ao desenvolvimento, a fase **pseudoglandular** caracteriza-se pelas proliferações sucessivas dos cordões sólidos de células epiteliais, além de contínuas ramificações que são desencadeadas através das fendas geradas na região dos botões que permitem o prolongamento dos ductos, assim como o aspecto glandular multi-lobulado. Nesta fase é possível identificar a canalização rudimentar para a formação inicial dos lumens (TUCKER 2007; HSU e YAMADA 2010; TESHIMA et al. 2011; DE PAULA F et al. 2017).

As ramificações perduram nas porções terminais dos cordões sólidos de células epiteliais, os quais passam pelo processo de canalização por intermédio da degeneração das células centrais e, dessa maneira, estabelecem o espaço luminal dos ductos. Configuram-se lóbulos separados por septos de tecido conjuntivo, compostos pela rede de ductos ou túbulos ramificados análogos a uma árvore (processo de arborificação) circunscrevendo o parênquima glandular na fase **canalicular** (CUTLER 1990; MELNICK e JASKOLL 2000; TUCKER 2007; DE PAULA F et al. 2017).

A diferenciação celular prossegue apresentando um sistema ductal com lúmens bem demarcados, que começam a adquirir aspectos funcionais (citodiferenciação) e o desenvolvimento das células mioepiteliais. Formam-se, então, unidades secretoras acinares primitivas na porção terminal dos ductos, denominados sacos terminais (pré-ácinos) por não serem totalmente maduros, finalizando o processo da morfogênese da glândula com a fase de **botão terminal** (CUTLER 1990; MELNICK e JASKOLL 2000; TUCKER 2007;

TESHIMA et al. 2011; DE PAULA F et al. 2017) (Figura 2). Embora seja possível identificar ductos e ácinos interligados à cavidade oral nesta fase (MELNICK e JASKOLL 2000), a diferenciação dos túbulos e a maturação das glândulas salivares continuam no período pós-natal (GRESIK 1994).



Fonte: IANEZ et al. (2010)

Figura 2 - Estágios da morfogênese da glândula salivar. A: Fase de botão inicial; B: Fase pseudoglandular; C: fase canicular; D: fase de botão terminal.

Estudos têm indicado que o processo de apoptose está envolvido no desenvolvimento e conservação do lúmen das estruturas glandulares (DALE 1994; TUCKER 2007; TESHIMA et al. 2016b). A compreensão deste evento e das proteínas implicadas é importante para o esclarecimento dos mecanismos de tumorigênese e os componentes das neoplasias derivadas dessas glândulas (DALE 1994; ANDREW e EWALD 2010).

O equilíbrio entre os processos de proliferação e de morte celular é crucial para manter a homeostase durante a organogênese. A desarmonia dos

mecanismos envolvidos pode desencadear anomalias do órgão em formação (MELNICK et al. 2001; LUBARSKY e KRASNOW 2003; CAREV et al. 2006). A comparação entre a histogênese normal das glândulas salivares e o desenvolvimento tumoral denota um cenário interessante para analisar o comportamento da diferenciação celular, além de identificar a possível origem das células neoplásicas (BATSAKIS et al. 1989; DARDICK et al. 1990; MA et al. 2010).

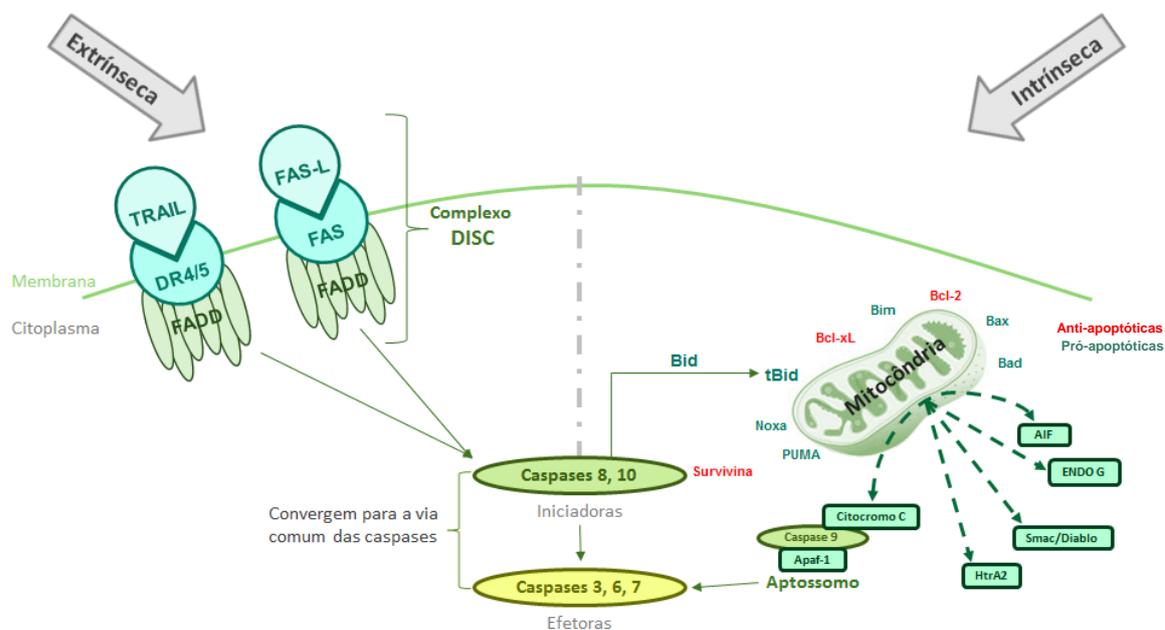
Em modelo animal, proteínas associadas ao mecanismo de morte celular programada (apoptose) foram observadas durante a morfogênese das glândulas salivares (MELNICK et al. 2001), porém em tecidos humanos ainda é pouco explorado (TESHIMA et al. 2016a). Assim, este estudo propõe a avaliação de proteínas diretamente e indiretamente envolvidas no mecanismo de apoptose durante desenvolvimento das glândulas salivares humanas, sendo os marcadores de interesse BCL2, Survivina, Ki-67, PAR4, FAS, FASL, PHLDA1, Caspase-3 clivada, SPARC e MUC1.

1.3 APOPTOSE

O processo de morte celular, conhecido por apoptose, foi fundamentado por KERR et al. (1972) que designou como mecanismo oposto ao de mitose. A apoptose abrange um sistema homeostático tecidual fisiológico de organismos multicelulares que desenvolve alterações morfológicas, tais como o encolhimento celular com destaque na formação de bolhas na membrana plasmática e a condensação de núcleos provocando a morte celular sem causar processo inflamatório. Este mecanismo participa no desenvolvimento e

na morfogênese dos tecidos, além de manter o equilíbrio da população celular e atuar na retirada de células lesionadas (KERR et al. 1972; REED 2000; VANGESTEL et al. 2009; PEREIRA e AMARANTE-MENDES 2011).

O mecanismo da morte celular programada pode ser induzido por duas vias independentes, extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial), que confluem para a via comum das Caspases executoras. A via extrínseca é induzida por membros da família dos fatores de necrose tumoral (TNF) que se ligam com receptores específicos, tais como TNFR1 e FAS, desencadeando a cascata das Caspases. Ao interagirem com ligantes específicos, como o FADD, tornam-se capazes de recrutar a Caspase-8 e assim ativar a Caspase-3 possibilitando a morte por apoptose. A via intrínseca pode ser estimulada por proteínas pró-apoptóticas, como o Bax, que induz a mitocôndria a liberar o citocromo c para o citoplasma onde se associa ao Apaf1 promovendo a ativação da pró-Caspase-9 e, então, ativa a Caspase-3 que promove a apoptose (REED 2000; COTTER 2009; VANGESTEL et al. 2009; PEREIRA e AMARANTE-MENDES 2011) (Figura 3).



Fonte: Modificado de REED (2000) e COUTINHO-CAMILLO et al. 2011

Figura 3 - Mecanismo da apoptose e suas vias envolvidas. A via extrínseca da apoptose (citoplasmática), é promovida por membros da família TNF como por exemplo, o receptor FAS e seu ligante FASL que interagem com a molécula adaptadora FADD formando o complexo DISC capaz de desencadear a cascata das Caspases e estimular a morte celular. Já a via intrínseca (mitocondrial) é estimulada pela ativação das Caspases iniciadoras que estimulam a quebra da proteína pró-apoptótica Bid para produzir sua forma truncada tBid, que induz o desequilíbrio entre as proteínas pró e anti-apoptóticas da família BCL2, liberando, como por exemplo, a proteína pró-apoptótica citocromo C que se liga a Caspase 9 e Apaf-1 para formar o complexo apoptossomo que ativa as Caspases efetoras e assim promovem a morte celular.

A via intrínseca é regulada pela família de proteínas BCL2 (*B cell lymphoma gene 2*) que podem induzir ou reprimir a morte celular. Alguns reguladores deste grupo desempenham o papel de inibição da apoptose ao evitar a liberação do citocromo c e a preservação na integridade da membrana externa, sendo assim, são considerados reguladores anti-apoptóticos como o BCL2 e Bcl-xL (CHIPUK et al. 2010). Outras proteínas, tais como o Bax e Bak, são pró-apoptóticas (HENGARTNER 2000) e induzem, através da permeabilidade da membrana mitocondrial externa, a liberação das proteínas

ativadoras de Caspases (YIP e REED 2008; COTTER 2009; GARCÍA-SÁEZ 2012).

Pertencente à família IAP (inibidores fisiológicos da apoptose), a Survivina é uma importante proteína reguladora que possui o domínio BIR responsável por agir no bloqueio de indutores presentes na via intrínseca, como por exemplo a Caspase-9, além de controlar a divisão celular. Sua expressão é evidenciada no desenvolvimento embrionário e pode ser importante no processo de diferenciação e homeostase celular (JOHNSON e HOWERTH 2004). É altamente expressa em células tumorais, sendo implicada na resistência a diferentes estímulos apoptóticos, incluindo quimioterapia (STENNER e KLUSSMANN 2009).

Codificada pelo gene MKI67, Ki-67 é uma proteína nuclear associada ao ciclo celular onde sua expressão ocorre em praticamente todo o ciclo (G1, S, G2 e mitose), exceto na fase G0. É um marcador que avalia o número de células presentes e o tempo de permanência no ciclo celular (TADBIR et al. 2012; VERHOVEN et al. 2013) e, por estar presente em todas as células proliferativas, torna-se importante ao determinar a fração de crescimento em uma população celular (SCHOLZEN e GERDES 2000).

O PAR4 (*prostatic apoptosis response 4*) ou também conhecido por PAWR (*PKC apoptosis WT1 regulator*), pertencente à classe dos genes pró-apopticos (NAGAI et al. 2010; SHRESTHA-BHATTARAI e RANGNEKAR 2010), participa no aumento da translocação de FAS e FASL na região da membrana interrompendo a ação do BCL2 (ZHAO e RANGNEKAR 2008) e da PKC (proteína quinase C). No núcleo, PAR4 ao interagir com a proteína WT1 impede a transcrição de NFκB e também bloqueia a expressão de BCL2 (EL-

GUENDY e RANGNEKAR 2003). Originalmente identificada em células tumorais da próstata, a proteína PAR4 expressa em grande quantidade induz apoptose nas células alteradas e pode ser identificada em diversos tumores (NAGAI et al. 2010; QINAN et al. 2014), em especial de cabeça e pescoço (COUTINHO-CAMILLO et al. 2013).

Membro da família dos fatores de necrose tumoral (TNF) a proteína FAS também é conhecida por APO-1 ou CD95. Considerada receptor de morte, possui domínio de morte (DD) presente no citoplasma que reconhece apenas seu ligante FASL (APO-1L ou CD95L) e a interação de ambas é essencial para a indução da apoptose pela via extrínseca (WARING e MÜLLBACHER 1999; DAVIDSON et al. 2002; LI, YIN e WU 2013). Quando ligadas, este complexo recruta a proteína adaptadora FADD que possui o domínio de morte efetor capaz de ativar a cascata das Caspases (LI, YIN e WU 2013).

A proteína PHLDA1 (*pleckstrin homology-like domain, family A, member 1*) também conhecida por TDAG51 (*T-cell Death-Associated Gene 51*), rica em prolina e glutamina, tem sido associada à regulação do mecanismo da morte celular (PARK et al. 1996; NEEF et al. 2002). Pode estar envolvida no aumento da expressão de Caspase-9 e PARP clivada sugerindo que essa proteína possa ativar a via intrínseca da apoptose (NEEF et al. 2002), entretanto, estudos revelam sua atividade de morte celular também pela via extrínseca (NAGAI 2016). PARK et al. (1996), em um estudo pioneiro, evidenciaram a importância da proteína PHLDA1 na expressão do receptor FAS. A perda dessa proteína é identificada na progressão de tumores de mama ou melanoma (PARK et al. 1996; NEEF et al. 2002) e, estudos realizados em carcinoma epidermóide da cavidade oral demonstraram que a perda da

expressão de PHLDA1 está associada a estágio precoce da doença (COUTINHO-CAMILLO et al. 2013).

Sintetizada como precursora inativa, a protease Caspase-3 (*cystenil aspartate specific proteases*) pertence ao grupo de enzimas proteolíticas que utilizam cisteína para clivagem de substratos e são ativadas através de estímulos fisiológicos ou patológicos desencadeando o mecanismo de apoptose. A expressão desta proteína ocorre tanto na via intrínseca quanto na extrínseca da apoptose sendo importante para identificar o momento da morte celular (NUÑEZ et al. 1998; LI e YUAN 1999; CHANG e YANG 2000; BOATRIGT e SALVESEN 2003). A família das Caspases são classificadas como iniciadoras (Caspases-2, -8, -9, -10, -12) ou efetoras (Caspases-3, -6, -7) (SHALINI et al. 2015). Alguns estudos sugerem que a Caspase-7 compartilha propriedades semelhantes às da Caspase-3 (LAKHANI et al. 2006; TESHIMA et al. 2016a). Em modelo *in vivo*, a deleção de ambas proteínas efetoras comprometeu a morfogênese, no entanto, a expressão da Caspase-7 supriu a ausência da Caspase-3 (LAKHANI et al. 2006).

A osteonectina, também conhecida como proteína secretora acídica rica em cisteína (SPARC) ou BM-40, pertence à classe de proteínas da matriz extracelular (MEC) com a função de remodelação e adesão celular, além de manter a estabilidade e homeostase dos tecidos (BORNSTEIN e SAGE 2002; ARNOLD e BREKKEN 2009; MCCURDY et al. 2010). SPARC é expresso em diferentes tipos de câncer tanto no estroma circundante quanto nas células tumorais e, além disso, o padrão de expressão é variável e altamente dependente do tipo de câncer (AQUINO et al. 2013; TAI e TANG 2008).

RAHMAN et al. (2011), evidenciou a interação da proteína SPARC com a Caspase-8 propiciando a atividade apoptótica pela via extrínseca.

Sintetizada por células epiteliais, a MUC1 (mucina) é uma glicoproteína que compõe a saliva e outras secreções mucosas com a função de proteger e lubrificar as superfícies epiteliais (DEKKER et al. 2002; GONÇALVES et al. 2011). Nas glândulas salivares, a mucina desempenha o papel de lubrificar os ductos na parte luminal contra atritos e infecções. A MUC1, em condições normais, localiza-se na membrana apical dos ductos salivares ao contrário de células neoplásicas que aparenta dispersa na estrutura da glândula (MAHOMED 2011). Em um estudo foi avaliada a expressão de diversas mucinas durante o desenvolvimento da glândula salivar, dentre elas a mucina MUC1, demonstrou um papel importante na maturação e manutenção da rede de ductos glandulares (TESHIMA et al. 2011). Estudos em modelo animal e *in vitro* demonstraram um papel importante da MUC1 nos processos de regulação da proliferação, angiogênese, invasão, metástase e também na evasão da apoptose, impedindo a ativação da via intrínseca da apoptose (NATH e MUKHERJEE 2014).

1.4 JUSTIFICATIVA

Durante o processo de morfogênese das glândulas salivares, modulações estruturais nas células, acompanhadas de maturação fenotípica ocorrem e culminam na composição final dessas glândulas. A compreensão desses fenômenos é importante para a elucidação dos mecanismos de tumorigênese nas glândulas salivares e para o entendimento dos componentes

das neoplasias derivadas dessas glândulas e o processo de apoptose desempenha um papel importante na formação do lúmen durante a organogênese de estruturas glandulares, incluindo o desenvolvimento das glândulas salivares.

Alguns estudos têm abordado o mecanismo de morte celular programada durante a morfogênese das glândulas salivares em modelo animal, porém poucos são relatados em amostras de tecidos humanos. Dessa forma, torna-se necessário ampliar a pesquisa de proteínas relacionadas ao processo de apoptose.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Investigar a presença de marcadores de apoptose e proliferação em glândulas salivares humanas em desenvolvimento

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a imunexpressão das proteínas BCL2, Survivina, Ki-67, PAR4, FAS, FASL, PHLDA1, Caspase-3 clivada, SPARC e MUC1 em amostras de glândula salivar humana em desenvolvimento por imunistoquímica

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados 50 espécimes de glândulas salivares dissecadas de fetos humanos em diferentes estágios gestacionais, provenientes de abortos espontâneos. Todos os fetos pesavam menos de 500 gramas, sendo considerados como peças cirúrgicas. Esse material pertence à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo-FMUSP e o estudo está de acordo com o Comitê de Ética da Instituição. As amostras foram coletadas de diferentes locais, incluindo o assoalho (anexo a estrutura sublingual), língua, palato duro, lábios e glândulas parótida e submandibular (Quadro 1). As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de cada caso foram analisadas, com o auxílio de um patologista, para checagem das estruturas glandulares presentes e seleção do material a ser utilizado na pesquisa.

Dez espécimes de glândulas salivares humanas histologicamente normais de margens cirúrgicas, provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center, também foram incluídos no estudo. Essas glândulas salivares compreendem glândulas mucosas (menores) de várias regiões da cavidade oral, e glândulas salivares maiores - parótida, submandibular e sublingual.

Após a escolha dos fragmentos a serem utilizados na pesquisa, os blocos de parafina foram separados e cortes histológicos desse material, com 3µm de espessura, foram utilizados para a realização da técnica de

imunoistoquímica segundo protocolo do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (protocolo número: 1578/11F) (Anexo 1).

Quadro 1 - Descrição das amostras selecionadas com relação à idade gestacional e localização

Idade gestacional (semanas)	Quantidade de amostras	Sítio de origem da amostra
10	2	Palato, submandibular
11	1	Língua
12	6	Língua, parótida, palato, mandíbula, submandibular
13	7	Língua, lábio, palato, parótida
15	1	Palato
16	1	Língua
18	5	Língua, lábio, palato, submandibular
19	5	Língua, parótida, mandíbula, palato
20	8	Língua, lábio, parótida, assoalho (sublingual)
21	11	Língua, submandibular, lábio, parótida, assoalho (sublingual)
22	1	Língua
23	1	Língua
25	1	Língua

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

De acordo com a padronização de cada anticorpo, foram estabelecidos os protocolos para a desparafinização, re-hidratação e recuperação antigênica dos tecidos nas etapas 1 ou 2.

- 1) As lâminas contendo os cortes dos tecidos foram desparafinizadas em 3 banhos de xilol por 5 minutos cada, seguido por lavagem em 4 banhos de etanol e posterior lavagem em água destilada por 5 minutos. A

recuperação antigênica foi realizada com tampão citrato pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0 em panela de pressão por 15 minutos, seguido por lavagem em água destilada por 5 minutos;

- 2) As lâminas contendo os cortes dos tecidos foram desparafinizadas e re-hidratadas com o reagente Trilogy, que também proporciona a recuperação antigênica. A solução foi diluída em água destilada na proporção de 1:100 em dois recipientes (um com as lâminas submersas na solução e outro apenas com a solução) que devem ser mantidos por 15 minutos em panela de pressão. Após o período de incubação em pressão, as lâminas foram transferidas para o outro recipiente com a solução permanecendo por mais 5 minutos e depois lavadas em água destilada por 5 minutos.

Após a recuperação antigênica foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio em 3 incubações de 5 minutos.

Em seguida foi realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *Protein Block* (Dako) por 20 minutos. As lâminas foram então incubadas por 16 horas a 4°C com o anticorpo específico. A lista dos anticorpos utilizados encontra-se no Quadro 2.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção *Advance* (Dako). A revelação foi feita utilizando-se como substrato cromógeno 3,3' – diaminobenzidina (*DAB*) e a contracoloração feita utilizando-se a hematoxilina. Todas as reações foram acompanhadas de um controle, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado. As reações foram analisadas em microscópio convencional e os dados estudados de forma

descritiva e quantitativa (para o anticorpo Ki-67). Na análise descritiva foi avaliado o padrão de marcação (núcleo, citoplasma, membrana). Para a análise de Ki-67 foi contado o número de células positivas em 5 campos de grande aumento e efetuada a média das contagens por fase de desenvolvimento. Adicionalmente, alguns espécimes foram selecionados para avaliar a expressão das proteínas Caspase-3 total e Caspase-7. Como critério de seleção dos espécimes, foi considerada a análise da expressão das demais proteínas e a presença de todas as fases de diferenciação da morfogênese.

Quadro 2 - Descrição dos anticorpos primários e secundários, clones, fornecedor, diluição de uso e o padrão de marcação

Anticorpo	Clone	Fornecedor	Diluição	Recuperação Antigênica	Padrão de Marcação
BCL2	124	Dako	1:200	Panela de pressão, Tris/EDTA	Citoplasmático
Caspase-3 clivada	Policlonal	Cell Signaling	1:1000	Panela de pressão, Citrato pH 6.0	Citoplasmático
SURVIVINA	Policlonal	Neomarkers	1:350	Panela de pressão, Citrato pH 6.0	Nuclear e/ou Citoplasmático
PAR4	A-10	Santa Cruz	1:700	Panela de pressão, Citrato pH 6.0	Nuclear e/ou Citoplasmático
MUC1	Ma552	Novocastra	1:500	Panela de pressão, Citrato pH 6.0	Citoplasmático
PHLDA1	M-20	Santa Cruz	1:100	Panela de pressão, Citrato pH 6.0	Nuclear e/ou Citoplasmático
SPARC	Policlonal	Chemicon	1:6000	Panela de pressão, Trilogy	Citoplasmático
FAS	EPR5700	LSBio	1:700	Panela de pressão, Trilogy	Membrana
FASL	Policlonal	LSBio	1:700	Panela de pressão, Trilogy	Membrana
Ki-67	30-9	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana)	Nuclear
Caspase-7	7CSP01	Chemicon	1:100	Panela de pressão, Tris/EDTA	Nuclear e/ou Citoplasmático
Caspase-3 total	Policlonal	Santa Cruz	1:100	Panela de pressão, Tris/EDTA	Citoplasmático

4 RESULTADOS

4.1 ANÁLISE MORFOLÓGICA (HE)

A análise da morfologia das glândulas salivares humanas foi realizada por meio da coloração hematoxilina e eosina (HE). As glândulas salivares humanas se diferenciam de forma heterogênea: o mesmo espécime pode apresentar lóbulos de glândulas salivares em diferentes estágios da sua sequência de morfogênese, independentemente da idade fetal. Assim, os espécimes incluídos nesse estudo foram classificados de acordo com essas fases. Segue-se a descrição das diferentes fases observadas e imagens representativas podem ser observadas na Figura 4.

Fase de Botão Inicial

No início do desenvolvimento glandular, foram identificados botões sólidos de células epiteliais com núcleos grandes cuboides irregulares e, ao decorrer da diferenciação, aberturas sutis foram observadas.

Fase Pseudoglandular

Ramificações dos cordões sólidos de células epiteliais foram identificadas gradualmente nas porções terminais. As estruturas ductais observadas ainda são rudimentares, mas há alguns indícios característicos de estruturas luminiais.

Fase Canalicular

A formação de lóbulos compostos por um sistema de bulbos ramificados caracterizou esta fase de diferenciação. Foi possível a melhor distinção das estruturas luminais e a formação dos canalículos. Pode-se notar aspectos primitivos da formação dos pré-ácinos com anexos ductais intercalares.

Fase de Botão terminal

A diferenciação morfológica glandular foi observada pelas estruturas pró-acinares desenvolvidas e com a formação de sacos terminais e ductos intercalares.

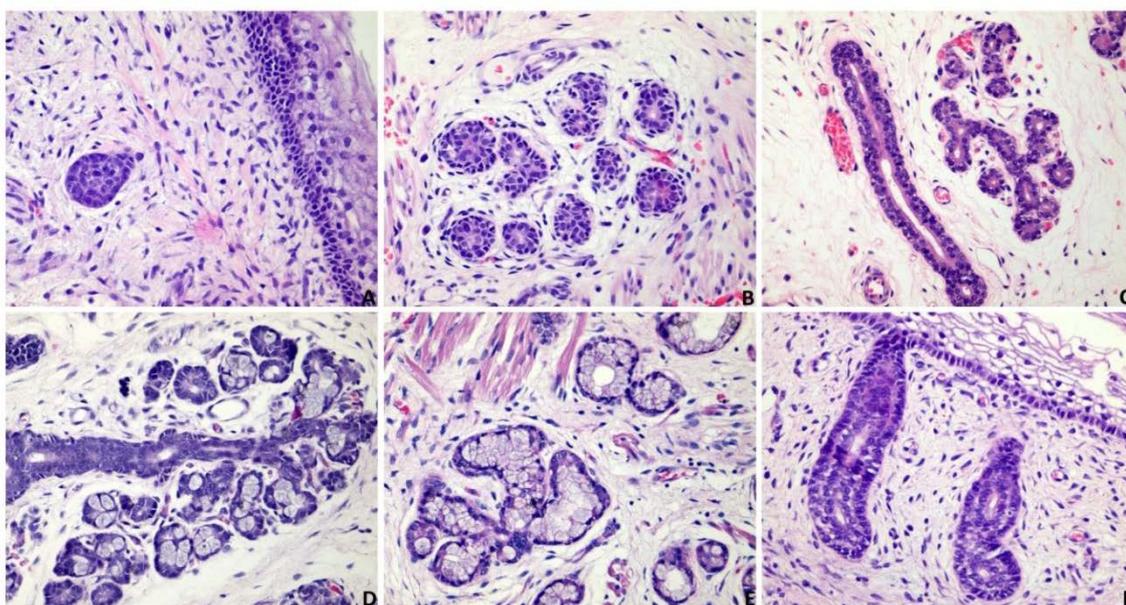


Figura 4 - Aspectos histológicos de glândulas salivares em desenvolvimento. A e B, fase inicial do desenvolvimento: botões de células (aumento original X400); C, fase pseudoglandular com cordões epiteliais ramificados (aumento original X400); D, fase de transição canalicular/botão terminal (aumento original X400); E, fase de botão terminal com estruturas acinares desenvolvidas (aumento original X400); F, ducto excretor desembocando na mucosa (aumento original X400).

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA

A análise da etapa do estudo imunoistoquímico foi realizada em 50 amostras de glândula salivar humanas em desenvolvimento; essas compreenderam amostras de glândulas salivares maiores (parótida e submandibular) e glândulas salivares menores encontradas na língua, assoalho da boca, lábio e palato.

As proteínas BCL2, Survivina, Ki-67, PAR4, FAS, FASL, PHLDA1, e MUC1 tiveram expressão detectada em pelo menos uma fase do desenvolvimento morfogênético glandular (Quadro 3), exceto a **Caspase-3 clivada** e **SPARC**, que foram negativos no parênquima de todos os espécimes glandulares. Para confirmação dos achados acerca da Caspase-3 clivada, foi analisada, adicionalmente, a expressão das proteínas Caspase-3 total e Caspase-7. A proteína **Caspase-3 total** apresentou expressão citoplasmática em raras células principalmente nas fases mais precoces do desenvolvimento da glândula salivar humana. Nos botões iniciais, foi observada marcação por toda a estrutura das pequenas ilhas de células epiteliais. Ao decorrer da diferenciação, na fase pseudoglandular, notou-se expressão pontual da proteína, principalmente em algumas das células da porção basal nas aberturas luminiais primitivas, assim como na fase canalicular. A fase de botão terminal apresentou positividade citoplasmática tênue nos compartimentos ductais e ausência nas porções acinares. Já a proteína **Caspase-7**, exibiu expressão nuclear e citoplasmática nos botões sólidos de células epiteliais na fase inicial da morfogênese. Na fase pseudoglandular foi observada marcação nuclear e na fase canalicular apresentou marcação citoplasmática mais

evidente nas regiões ductais desenvolvidas, assim como na fase de botão terminal. Resultados representativos são apresentados na Figura 5. A positividade para a proteína SPARC foi detectada apenas no estroma glandular (Figura 6).

Quadro 3 - Expressão das proteínas FAS, FASL, PAR4, PHLDA1, BCL2, SURVIVINA, Ki-67 e MUC1 em diferentes fases da morfogênese das glândulas salivares humanas

Fases da Morfogênese	Pró-apoptóticos				Anti-apoptóticos e proliferativo			Maturação
	FAS	FASL	PAR4	PHLDA1	BCL2	SURVIVINA	Ki-67	MUC1
Botão Inicial	+	+	++	++	+	++	++	-
Pseudoglandular	+	+	++	++	+	++	++	++
Canalicular	+	+	++	++	+	++	+	++
Botão Terminal								
• Ácinos	-	-	-	-	-	-	+	+
• Ductos Intercalares	+	-	++	-	-	++	+	++
• Ductos Excretores	-	-	++	-	+	+	+	++

(-) negativo, (+) raras células positivas (até 5), (++) várias células positivas (mais de 5)

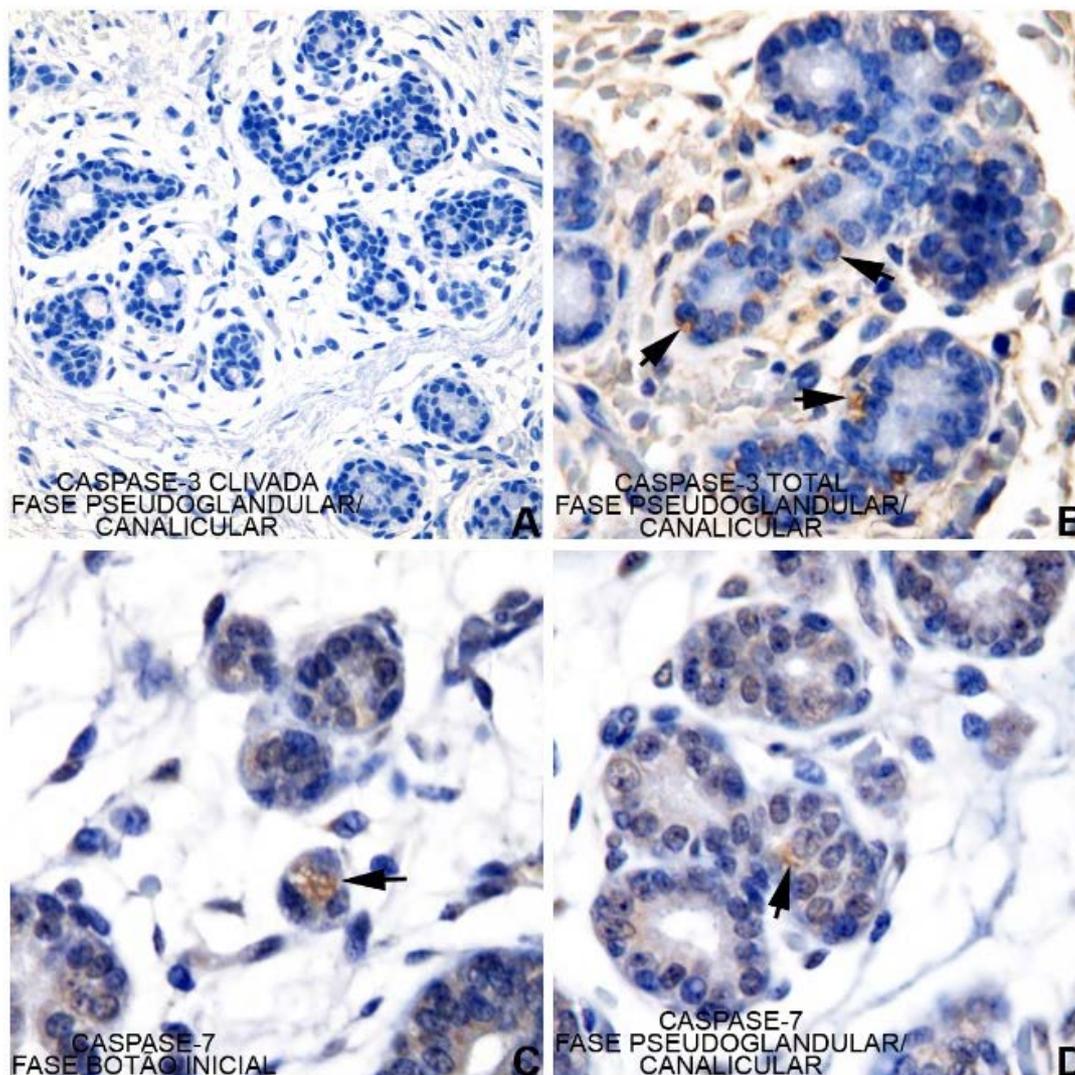


Figura 5 - Expressão das proteínas Caspase-3 clivada, Caspase-3 total e Caspase-7 durante a morfogênese das glândulas salivares humanas. **(A)** Ausência de expressão da proteína Caspase-3 clivada na fase pseudoglandular se diferenciando para a fase canalicular. Nota-se nas extremidades dos cordões sólidos de células epiteliais estruturas primitivas características dos pré-ácinos. **(B, setas)** Positividade da proteína Caspase-3 total com padrão de expressão citoplasmática entre as fases de diferenciação pseudoglandular e canalicular principalmente nos cordões epiteliais ramificados. **(C, seta)** A expressão da proteína Caspase-7 na fase de botão inicial foi observada com padrão predominantemente citoplasmática. Nos estágios mais diferenciados **(D, seta)** de pseudoglandular/canalicular permanece o padrão citoplasmático e raros núcleos positivos.

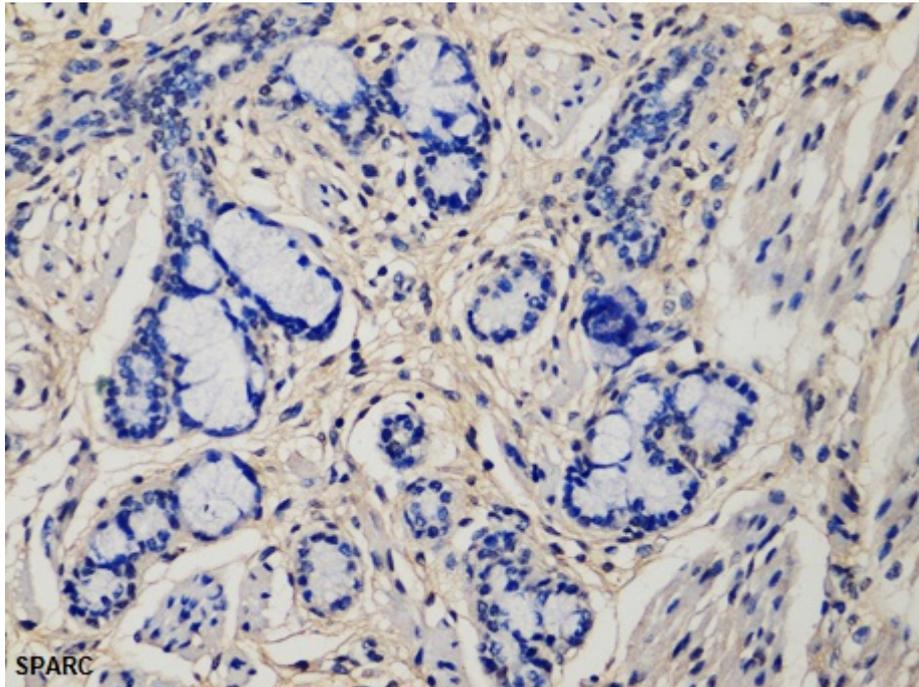


Figura 6 - Expressão da proteína SPARC no estroma durante a morfogênese das glândulas salivares humanas. Nota-se ausência de expressão da proteína SPARC nas estruturas do parênquima glandular.

A expressão da proteína **MUC1**, associada à maturação da glândula salivar, abertura luminal e início da secreção nas glândulas salivares, também foi avaliada. Essa proteína foi detectada a partir da fase pseudoglandular, com intensa expressão na região luminal de ductos bem formados na fase de botão terminal da morfogênese. Esses aspectos estão ilustrados na Figura 7.

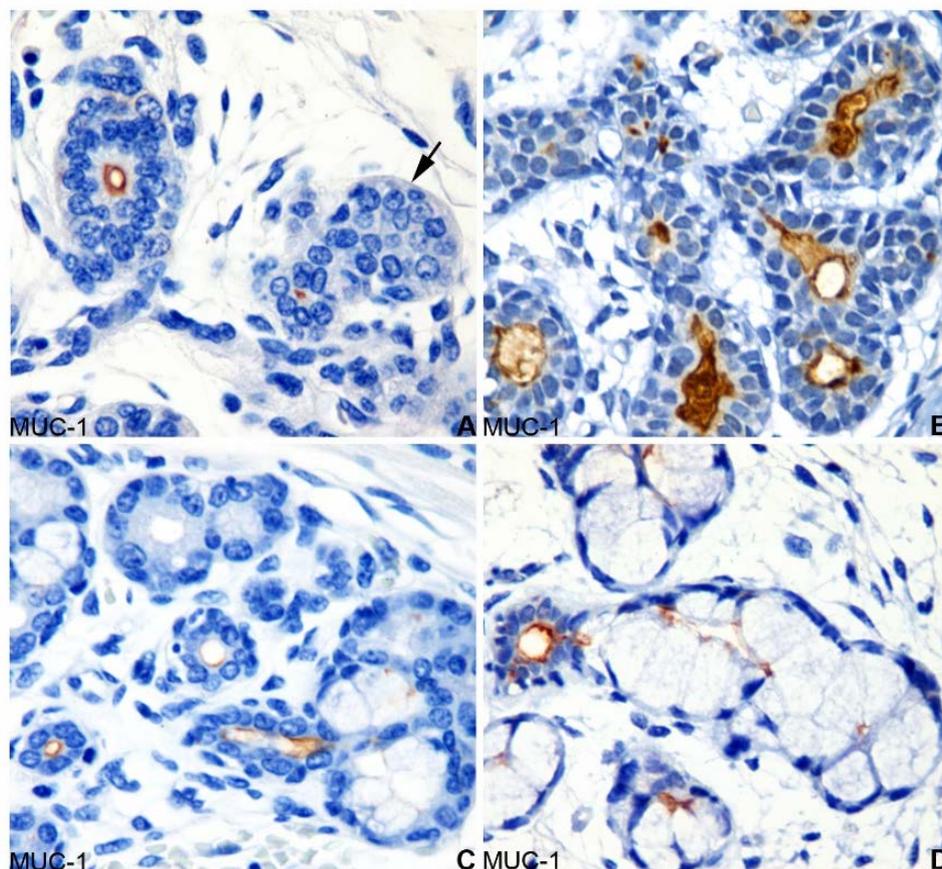


Figura 7 - Expressão da proteína MUC1 durante a morfogênese das glândulas salivares humanas. **(A, seta)** Fase de botão inicial: Ausência de expressão no botão sólido de células epiteliais. Nota-se positividade da proteína na abertura luminal primitiva próximo ao botão e no polo da cavidade ductal em uma fase mais desenvolvida. **(B)** Fase pseudoglandular: Forte expressão da proteína no polo luminal das células ductais de estruturas canalizadas e em processo de ramificação. **(C)** Fase canalicular: Marcação positiva da proteína em regiões luminiais precoces e no ducto intercalar anexo ao pré-acino. **(D)** Fase de botão terminal: Positividade no ducto excretor próximo ao saco terminal e no ducto intercalar. Raras regiões do citoplasma pré-acinar apresentaram expressão desta proteína.

Para a proteína Ki-67, além da presença ou ausência de positividade, também foi realizada a contagem do número de núcleos positivos em 5 campos de grande aumento e efetuada a média das contagens por fase de desenvolvimento (Quadro 4).

Quadro 4 - Expressão da proteína Ki-67 em diferentes fases da morfogênese das glândulas salivares humanas.

Expressão de Ki-67*				
	Idade gestacional			
	10 a 15 semanas	16 a 20 semanas	21 a 25 semanas	Número total de células marcadas por fase
Fases da Morfogênese				
Botão Inicial	1	1	-	2
Pseudoglandular	72	42	2	116
Canalicular	6	7	6	19
Botão Terminal	4	5	2	11
Número total de amostras	10	13	5	

*, média do número de núcleos positivos em 5 campos de grande aumento

A seguir são descritos os padrões de expressão para as proteínas BCL2, Survivina, Ki-67, FAS, FASL, PAR4 e PHLDA1. Resultados representativos são apresentados nas Figuras 8 e 9.

Fase de Botão Inicial

BCL2: Foram observadas raras células positivas, com o padrão de marcação citoplasmático, em regiões de células epiteliais agrupadas (Figura 8, A);

Survivina: Nas pequenas ilhotas de células epiteliais a proteína exibe padrão de marcação citoplasmática e nos botões sólidos foi identificada expressão citoplasmática e nuclear (Figura 8, B);

Ki-67: A marcação nuclear é positiva nas células que compõem os botões iniciais exibindo intensa atividade proliferativa, inclusive as que possuem aberturas primitivas dos lumens em regiões mais diferenciadas (Figura 8, C);

FAS e FASL: A expressão de FAS é complementar à expressão da proteína FASL. Foram consideradas apenas células com marcação na região da membrana. Nos aglomerados de células epiteliais houve positividade em raras células centrais com indícios da abertura primitiva dos lúmens em áreas mais diferenciadas (Figura 9, A e B);

PAR4: A expressão nuclear desta proteína é mais intensa nos botões sólidos de células epiteliais, além de sutil marcação citoplasmática por toda sua estrutura (Figura 9, C);

PHLDA1: A expressão citoplasmática foi predominante nos botões sólidos de células epiteliais e foi diminuindo ao longo do desenvolvimento. Raras células com morfologia apoptótica apresentaram positividade nuclear (Figura 9, D).

Fase Pseudoglandular

BCL2: Raras células apresentaram positividade citoplasmática pontualmente entre as ramificações dos cordões sólidos de células epiteliais. Em áreas mais diferenciadas com abertura luminal dos ductos houve predileção da proteína na porção basal da estrutura glandular (Figura 8, D);

Survivina: A expressão citoplasmática foi evidenciada em alguns aglomerados sólidos e na região de ramificação dos cordões sólidos de

células epiteliais. Nos sítios de abertura do espaço luminal ou em áreas mais diferenciadas exibiu marcação nuclear (Figura 8, E);

Ki-67: Observou-se um maior número de núcleos positivos nesta fase de diferenciação, principalmente nas estruturas ramificadas e ductais. Foi realizada também a análise quantitativa por meio da contagem de células positivas que apresentou a média de 116 núcleos positivos em comparação as demais fases com menos de 20 núcleos positivos (Figura 8, F);

FAS e FASL: Raras células foram positivas, em padrão de membrana, em regiões centrais dos cordões sólidos onde há evidência da abertura do espaço luminal, bem como nas áreas compostas por pequenos grupos de células epiteliais (Figura 9, E e F);

PAR4: A expressão foi proeminentemente nuclear em regiões com células epiteliais agrupadas em processo de ramificação dos cordões sólidos para a formação dos ductos. Essa expressão foi principalmente observada nos núcleos próximos ao lúmen ainda em desenvolvimento (Figura 9, G);

PHLDA1: O padrão citoplasmático foi observado em áreas de agrupamento de células epiteliais e nas extensões dos cordões sólidos de células epiteliais com rudimentares regiões canalizadas. Raros núcleos foram positivos, apresentando aspecto picnótico e irregular indicando características apoptóticas (Figura 9, H).

Fase Canalicular

BCL2: Marcação citoplasmática foi observada em raras células nas porções ductais e diminuição de expressão foi observada em áreas mais

desenvolvidas com a evidência de pré-ácinos ainda não diferenciados. Os ductos excretórios apresentaram marcação com predileção na região das células basais (Figura 8, G);

Survivina: A expressão nuclear foi predominante nesta fase da morfogênese e em raras células foram observadas marcação citoplasmática. Em ductos excretórios, a camada de células epiteliais próxima a região luminal apresentaram marcação de padrão nuclear (Figura 8, H);

Ki-67: A marcação nuclear prevaleceu nos ductos excretórios e nos ductos ramificados, porém nas pequenas áreas das extremidades que começam a se diferenciar em estruturas características de sacos terminais raras células são positivas (Figura 8, I);

FAS e FASL: Foram positivas raras células com padrão de expressão na membrana, principalmente nas regiões com agrupamento de células epiteliais que dão origem aos ductos intercalares anexos as estruturas pré-acinares nas extremidades dos ductos ramificados (Figura 9, I e J);

PAR4: O perfil de marcação nuclear foi evidenciado em regiões com aglomerados de células epiteliais ainda em processo de ramificação e abertura luminal. Em áreas pré-acinares foram positivas as estruturas anexas que dão origem aos ductos intercalares. A expressão citoplasmática manifestou-se principalmente nos ductos excretórios que desembocam na mucosa (Figura 9, K);

PHLDA1: Notou-se marcação citoplasmática nas estruturas ramificadas mais rudimentares e raros núcleos picnóticos foram identificados caracterizando o processo de apoptose. Nas regiões que apresentam

indícios de pré-acinos a marcação citoplasmática e nuclear é escassa ou ausente (Figura 9, L).

Fase de Botão Terminal

BCL2: Positividade citoplasmática foi observada em raras células nesta fase da morfogênese. Notou-se positividade principalmente nos ductos excretorios e ausência de expressão nos sacos terminais e ductos intercalares (Figura 8, J);

Survivina: Foi observada a expressão nuclear principalmente nos ductos excretorios e intercalares anexos aos pré-acinos. Raras células foram positivas com marcação citoplasmática. Nos sacos terminais não houve expressão desta proteína (Figura 8, K);

Ki-67: A expressão nuclear foi observada nos aglomerados celulares que dão origem aos ductos intercalares e raras células foram positivas nas estruturas pré-acinares (Figura 8, L);

FAS e FASL: Raras células apresentaram positividade na membrana na região dos ductos intercalares e ausência de expressão nas estruturas dos sacos terminais (Figura 9, M e N);

PAR4: Foi observado marcação, principalmente nuclear, nos ductos intercalares representados pelos aglomerados celulares com abertura luminal sutil. Nas porções mais diferenciadas, os sacos terminais demonstraram ausência de expressão desta proteína (Figura 9, O);

PHLDA1: Nesta fase de desenvolvimento a expressão é ausente para esta proteína (Figura 9, P).

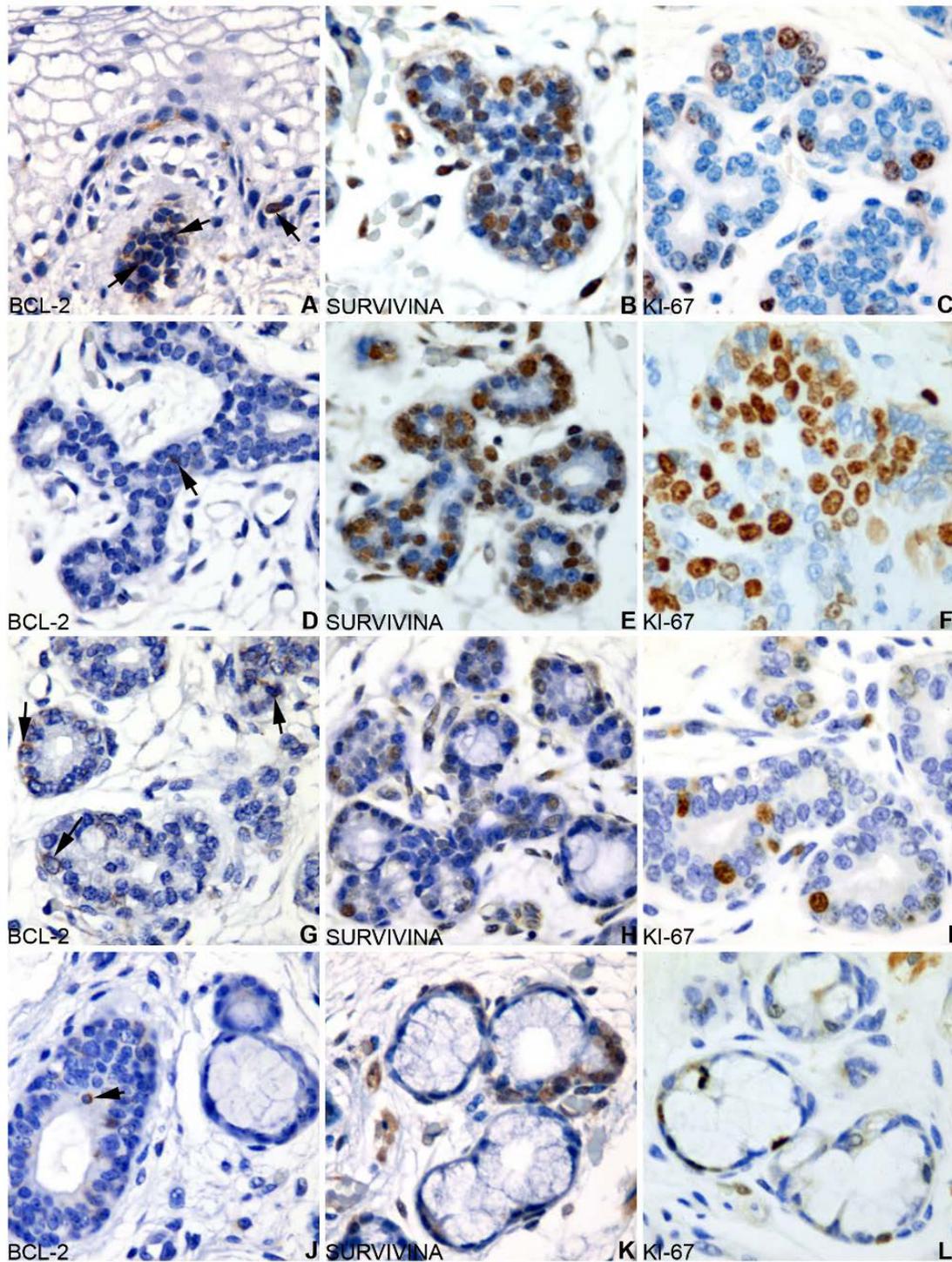


Figura 8 - Expressão das proteínas anti-apoptóticas e proliferativa durante a morfogênese das glândulas salivares humanas. Fase de botão inicial: **(A, setas)** Marcação citoplasmática de BCL2 no botão sólido de células epiteliais e em raras células na região do epitélio; **(B)** Expressão citoplasmática e nuclear da proteína Survivina principalmente na porção basal do botão; **(C)** Positividade nuclear da proteína Ki-67 na

região do broto sólido de células epiteliais e das porções pouco diferenciadas. Fase pseudoglandular: **(D, seta)** Expressão citoplasmática de BCL2 em raras células dos cordões ramificados de células epiteliais; **(E)** Marcação proeminente nuclear da proteína Survivina nas regiões de abertura do espaço luminal ductal e nas estruturas ramificadas; **(F)** Marcação nuclear da proteína Ki-67 principalmente nesta fase de diferenciação, principalmente nas regiões em processo de ramificação dos cordões epiteliais para abertura luminal. Fase canalicular: **(G, setas)** Raras células foram positivas com padrão citoplasmático para a proteína BCL2, principalmente em áreas pouco diferenciadas e ductais; **(H)** Expressão nuclear e citoplasmática da proteína Survivina em regiões menos diferenciadas e nos cordões ramificados. Nota-se diminuição de marcação nas extremidades que iniciaram o desenvolvimento da estrutura pré-acinares com exceção das suas porções anexas, os ductos intercalares; **(I)** Diminuição de expressão nuclear da proteína Ki-67 nas regiões ramificadas e com o espaço luminal mais desenvolvido. Fase de botão terminal: **(J, seta)** Raras células positivas com padrão citoplasmático da proteína BCL2 nos ductos excretores e ausência de expressão na porção pré-acinar; **(K)** Marcação nuclear e citoplasmática da proteína Survivina nos ductos intercalares e nenhuma expressão nos pré-acinos; **(L)** Expressão em raras células com padrão nuclear da proteína Ki-67 nos ductos intercalares e ausente nos pré-ácinos.

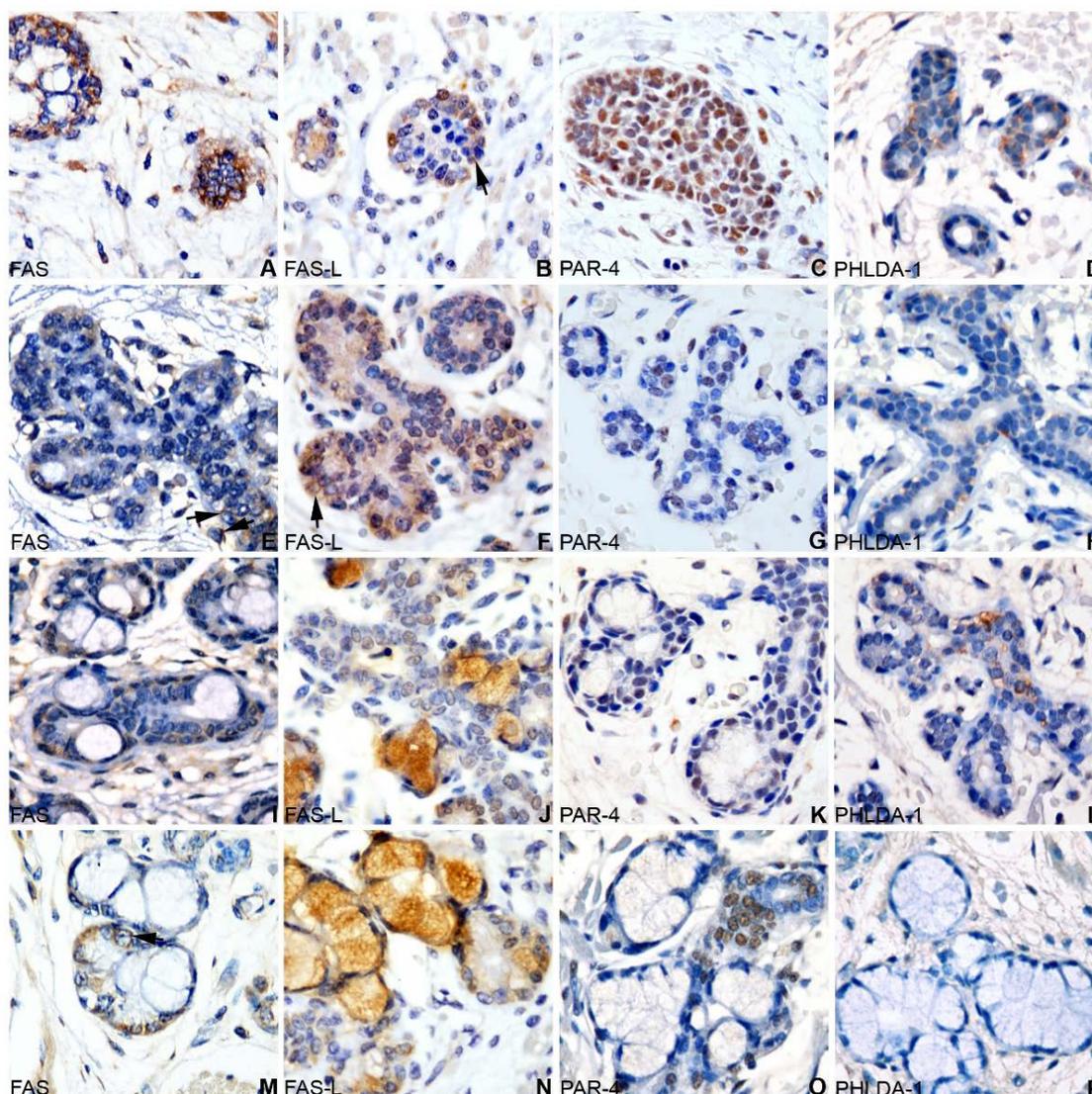


Figura 9 - Expressão das proteínas pró-apoptóticas durante a morfogênese das glândulas salivares humanas. Fase de botão inicial: **(A)** Expressão com padrão de membrana da proteína FAS no botão sólido de células epiteliais; **(B, seta)** Raras células positivas da proteína FASL com padrão de membrana na região basal do broto de células epiteliais; **(C)** Expressão principalmente de padrão nuclear e sutil marcação citoplasmática da proteína PAR4 no botão de células epiteliais; **(D)** Padrão de expressão citoplasmática da proteína PHLDA1 nos agrupamentos sólidos de células epiteliais e nas regiões com aberturas primitivas do espaço luminal. Fase pseudoglandular: **(E, setas)** Raras células positivas com padrão de membrana da proteína FAS, localizadas principalmente em regiões de ramificação dos cordões de células epiteliais; **(F, seta)** Positividade da proteína FASL com padrão de membrana em raras células na região basal das estruturas menos diferenciadas com sutil abertura luminal; **(G)** Expressão da proteína PAR4 com padrão

nuclear, proeminente nos aglomerados de células epiteliais e nas extremidades dos cordões; **(H)** Expressão de PHLDA1 com padrão citoplasmático nos cordões sólidos de células epiteliais ramificados e nas regiões de abertura luminal primitiva. Fase canalicular: **(I)** Raras células positivas da proteína FAS com padrão de membrana nos ductos intercalares; **(J)** Raras células expressaram a proteína FASL com padrão de membrana; **(K)** Padrão de expressão nuclear da proteína PAR4 nos cordões ramificados e nos ductos intercalares anexos as estruturas primitivas pré-acinares; **(L)** Padrão de marcação citoplasmática da proteína PHLDA1 proeminente nas regiões dos cordões sólidos de células epiteliais em processo de ramificação e abertura luminal. Nota-se rara positividade nuclear com aspecto condensado característico de célula apoptótica. Fase de botão terminal: **(M, seta)** Raras células positivas da proteína FAS no ducto intercalar com padrão de expressão de membrana; **(N)** Ausência de expressão com padrão de membrana da proteína FASL nesta fase de desenvolvimento. Apesar de apresentar positividade no citoplasma das células pró-acinares foram consideradas inativas, uma vez que sua atividade funcional é expressa na membrana; **(O)** Marcação predominante de padrão nuclear da proteína PAR4 em proximidade com as estruturas pré-acinares nos ductos intercalares e na porção ramificada do cordão sólido de células epiteliais com sutil abertura luminal; **(P)** Ausência de expressão de PHLDA1 nesta fase do desenvolvimento.

Também foram analisadas 10 amostras de glândulas salivares adultas histologicamente normais provenientes de margens cirúrgicas para comparação com a expressão na glândula em desenvolvimento: as proteínas PAR-4, survivina e FAS foram focalmente expressas. As proteínas MUC-1 e SPARC foram amplamente expressas e as proteínas PHLDA1, FAS-L, BCL-2, Caspase-3 clivada e Ki-67 não foram expressas (Figura 10).

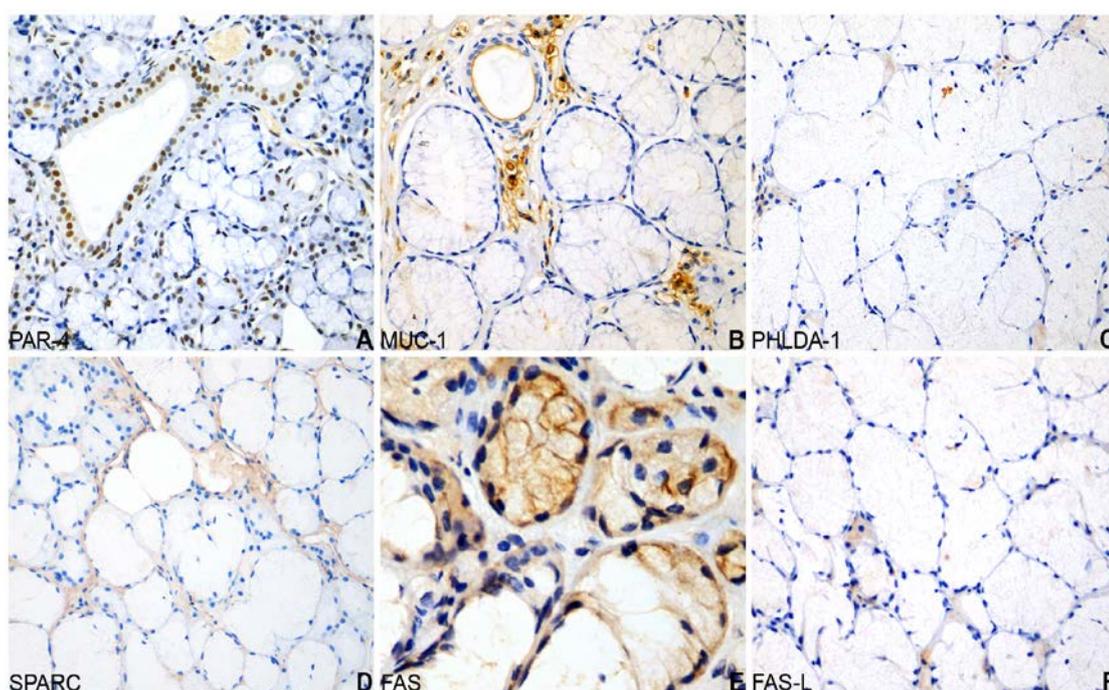


Figura 10 - Expressão das proteínas PAR-4, MUC-1, PHLDA1, SPARC, FAS, FAS-L em amostras de glândula salivar sem evidência de neoplasia.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a imunexpressão de proteínas associadas ao mecanismo de apoptose em amostras de glândulas salivares humanas em desenvolvimento por imunistoquímica.

A morfogênese das glândulas salivares humanas é semelhante ao observado em camundongos (LOURENÇO et al. 2008; TESHIMA et al. 2011). Porém, as glândulas salivares humanas se diferenciam de forma heterogênea: o mesmo espécime pode apresentar diferentes estágios do desenvolvimento glandular, independentemente da idade fetal (IANEZ et al. 2010). Em nosso estudo, também foram observadas diferentes fases de morfogênese, seguindo a classificação de TUCKER 2007, na mesma amostra sem relação com a idade correspondente (entre 10 a 25 semanas) utilizando-se a avaliação da coloração HE.

A apoptose é um dos mecanismos envolvidos na morfogênese de tecidos embrionários atuando na manutenção homeostática dos órgãos em formação através das sinalizações de morte ou sobrevivência celular (FLUSBERG e SORGER 2015). Duas vias estão associadas a este processo de morte celular, a extrínseca (citoplasmática) e intrínseca (mitocondrial) que convergem a uma via comum e, além disso, a expressão ou inibição de proteínas envolvidas em uma via podem influenciar a outra (PEREIRA e AMARANTE-MENDES 2011).

Em glândulas salivares, a morte celular parece estar envolvida na abertura luminal dos ductos, permitindo a cavitação dos cordões sólidos de células epiteliais nas fases iniciais da morfogênese (MELNICK e JASKOLL 2000; TUCKER 2007; TESHIMA et al. 2016b). Contudo, os resultados ainda são escassos, assim como, não é totalmente conhecido o papel das proteínas diretamente e indiretamente envolvidas no mecanismo de apoptose durante desenvolvimento glandular.

A proteína anti-apoptótica BCL2 localiza-se no citoplasma (ALLEN et al. 1998; HENGARTNER 2000; GARCÍA-SÁEZ 2012). Nosso estudo observou ausência da proteína BCL2 na maioria dos espécimes estudados. Raras células foram positivas com padrão citoplasmático, principalmente nos botões sólidos de células epiteliais e nos ductos excretores em sua porção basal. Em contrapartida, TESHIMA et al. (2016a) observaram a ausência de BCL2 em todos os espécimes analisados durante as fases da morfogênese das glândulas salivares humanas. No estudo da morfogênese estrutural dos néfrons, CAREV et al. (2006) demonstraram a expressão da proteína BCL2 nos mesonéfrons, a qual foi relacionada com a sobrevivência seletiva de alguns túbulos que posteriormente dão origem às estruturas mais diferenciadas. Nos metanéfrons, a expressão é positiva principalmente nas estruturas em desenvolvimento e ausente nas mais diferenciadas. Sugere-se, portanto, que a expressão de BCL2 é necessária para a diferenciação dos néfrons nas fases mais precoces do desenvolvimento. Em outro estudo, por meio de imunistoquímica, a expressão de BCL2 foi observada nos três folhetos embrionários de murinos nas fases mais precoces do

desenvolvimento e afirmaram que a contribuição de proteínas repressoras de morte celular é importante durante a organogênese (NOVACK e KORSMEYER 1994).

Em tumores benignos, como o adenoma pleomórfico, a expressão de BCL2 encontra-se positiva nas células periféricas das estruturas ductais e, nas glândulas normais adjacentes ao tumor benigno, a expressão de BCL2 é ausente. Entretanto, nas glândulas não associadas ao tumor houve expressão forte focal nas células basais ductais (MIRANDA VIANA et al. 2013).

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose que é expressa abundantemente em tecidos fetais (JASKOLL et al. 2001), porém em células adultas normais, somente em alguns tecidos específicos (JOHNSON e HOWERTH 2004; STENNER e KLUSSMANN 2009; VANGESTEL et al. 2009), tais como timo e mucosa gástrica, em padrão citoplasmático e nuclear (JOHNSON e HOWERTH 2004). A expressão nuclear parece estar relacionada ao controle da divisão celular, ao passo que a expressão citoplasmática parece estar envolvida com a inibição da apoptose (ALTIERI, 2003; VANGESTEL et al. 2009;).

Em nosso estudo, a expressão da proteína survivina foi identificada em todas as fases do desenvolvimento com localização intracelular diferenciada ao longo da maturação glandular. Nas estruturas mais precoces a marcação prevaleceu com perfil citoplasmático em regiões ramificadas, enquanto que nos estágios mais avançados a expressão foi predominantemente nuclear. TESHIMA et al. (2016a) identificaram o mesmo

padrão de expressão durante a morfogênese das glândulas salivares humanas, sugerindo que a survivina possui um papel importante na sobrevivência das células ductais em formação, corroborando os nossos resultados. No modelo animal, JASKOLL et al. (2001) verificaram a expressão da survivina no desenvolvimento da glândula submandibular nos principais estágios da abertura luminal: pseudoglandular, canalicular e botão terminal. Na fase pseudoglandular o padrão de expressão foi citoplasmático difuso nas estruturas ramificadas, sugerindo que a survivina possa ser um mediador importante para a delimitação do lúmen durante da morfogênese da glândula (JASKOLL et al. 2001).

Por estar ausente na maioria dos tecidos normais, a survivina tem sido usada como parâmetro prognóstico em diversos tumores (JOHNSON e HOWERTH 2004), inclusive de cabeça e pescoço (STENNER e KLUSSMANN 2009). A alta expressão de survivina está correlacionada com a invasão e agressividade do tumor, o que resulta no pior prognóstico comparado a tumores negativos para esta proteína (JOHNSON e HOWERTH 2004).

A proteína Ki-67 é um marcador de proliferação celular localizada no núcleo. O aumento de sua expressão está associado ao mau prognóstico em diversos tumores, inclusive de cavidade oral, laringe, faringe e glândulas salivares (PICH et al. 2004).

Nas glândulas salivares em desenvolvimento, a proteína Ki-67 foi expressa em todas as fases da morfogênese, principalmente nas estruturas pseudoglandulares. Porém, em estruturas mais diferenciadas (pré-ácinos) foi

observada uma redução da expressão dessa proteína. Essa diferença de marcação entre as fases do desenvolvimento foi confirmada pela análise quantitativa, com a contagem dos núcleos ao longo do desenvolvimento na qual o estágio pseudoglandular apresentou em média 116 núcleos positivos em comparação aos demais estágios com média de 20 núcleos. Isso sugere que ao decorrer da diferenciação e maturação da glândula é fundamental o equilíbrio entre as proteínas envolvidas na proliferação e no mecanismo de morte celular programada.

Em um estudo sobre a morfogênese estrutural dos néfrons, CAREV et al. (2006) observaram a expressão da proteína Ki-67 em duas fases de desenvolvimento, os mesonéfrons e os metanéfrons, variando de acordo com as semanas de maturação analisadas. O mecanismo de proliferação celular em equilíbrio com outras proteínas envolvidas tanto no estímulo quanto na inibição da apoptose revela sua importância na formação dos rins e, desse modo, o rompimento deste padrão compensatório pode desencadear vários distúrbios neste órgão, incluindo insuficiência renal crônica (CAREV et al. 2006).

A proteína PAR4 é expressa com padrão citoplasmático em linhagens celulares e tecidos normais, mas não promove a apoptose a menos que haja um segundo estímulo. Nas células tumorais, em contrapartida, a expressão de PAR4 é observada no citoplasma e no núcleo, sendo associada a translocação nuclear com o processo de morte celular programada (GOSWAMI et al. 2006; ZHAO e RANGNEKAR 2008; SHRESTHA-BHATTARAI e RANGNEKAR 2010).

No nosso estudo foi observada positividade nuclear de PAR4, predominantemente nas estruturas pseudoglandulares, onde ocorre a formação rudimentar das estruturas luminais, sugerindo, portanto, um possível papel dessa proteína durante a morfogênese das glândulas salivares. NAGAI et al. (2010), identificaram em cultura de células alta expressão de PAR4 durante a morfogênese da glândula mamária, destacando sua importância na composição estrutural do lúmen (porção acinar). Além disso, em ensaios de imunistoquímica observaram baixa expressão nuclear de PAR4 a qual foi associada ao mau prognóstico em pacientes com câncer de mama primário.

Nas células tumorais resistentes ao mecanismo de morte celular programada a proteína PAR4 mantém-se presente no citoplasma (EL-GUENDY e RANGNEKAR 2003). Nesse contexto, COUTINHO-CAMILLO et al. (2013) relacionaram a expressão citoplasmática de PAR4 ao estágio avançado do carcinoma epidermóide oral.

FAS e FASL são importantes proteínas mediadoras da apoptose e sua interação ocorre tanto em células normais quanto em células tumorais (LORO et al. 1999; WARING e MÜLLBACHER 1999; PETER et al. 2015) com padrão de expressão na membrana (LORO et al. 1999; DAVIDSON et al. 2002; PETER et al. 2015). Os resultados foram complementares em ambos marcadores: raras células foram positivas destacando a região basal das estruturas glandulares, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento e ausente nas fases mais avançadas que compreendem os compartimentos pré-acinares.

Foi relatado, em um estudo com ratos, que a apoptose desempenha um papel importante durante o processo da atrofia da glândula submandibular mediada pela via FAS/FASL. As Caspases 8 e 3 foram utilizadas para confirmar a atividade apoptótica. As proteínas FAS/FASL foram observadas no parênquima glandular: expressão da proteína FAS foi observada nos ácinos e nas células ductais, enquanto a proteína FASL apresentou aumento de expressão nas células ductais, principalmente nas glândulas atrofiadas (TAKAHASHI et al. 2007).

Na comparação mucosa oral normal e carcinoma de células escamosas de cavidade oral, FASL foi observada na superfície das células e no citoplasma, onde a proporção de células positivas em lesões pouco diferenciadas foi maior em relação às lesões bem diferenciadas. A ausência de expressão de FAS e a positividade de FASL indicam o desequilíbrio na sinalização da morte celular para as células tumorais (LORO et al. 1999).

A proteína pró-apoptótica PHLDA1 (TDAG51) é expressa predominantemente no citoplasma, mas alguns estudos revelam que pode ser localizada em região perinuclear, nuclear e também nos nucléolos (NAGAI 2016).

Nosso estudo apresentou rara positividade nuclear em regiões pontuais, com morfologia característica de apoptose, indicados por núcleos picnóticos condensados e irregulares. A expressão foi predominante citoplasmática nas fases mais precoces do desenvolvimento das glândulas salivares humanas. Em estágios mais desenvolvidos, onde as extremidades

dos cordões ramificados que apresentaram aspectos primitivos pré-acinares, não houve expressão desta proteína.

COUTINHO-CAMILLO et al. (2013) observaram expressão citoplasmática reduzida de PHLDA1 em 60,7%, do total de 229 amostras, em carcinomas de células escamosas de cavidade oral. A expressão de PHLDA1 foi correlacionada aos estágios avançados da doença, porém em pacientes negativos para esta proteína a sobrevida global e sobrevida livre de doença foram significativamente maiores, sugerindo um marcador prognóstico independente neste tipo de neoplasia. Outros estudos associaram a diminuição da expressão de PHLDA1 no desenvolvimento neoplásico sugerindo, portanto, um possível biomarcador prognóstico, tais como em: câncer de mama invasivo primário (NAGAI et al. 2007), colangiocarcinoma (ZHAO et al. 2015b) e adenocarcinoma gástrico (ZHAO et al. 2015a).

A Caspase-3 é uma proteína efetora responsável por promover a morte celular programada, essencial para o desenvolvimento embrionário (BOATRIGT e SALVESEN 2003). O padrão de expressão normalmente é citoplasmático, mas alguns estudos revelam marcação nuclear (KRAJEWSKA et al. 1997; KAMADA et al. 2005).

Nosso estudo demonstrou ausência de expressão da proteína Caspase-3 clivada em todas as estruturas do desenvolvimento glandular estudadas. Em contraste, no desenvolvimento das glândulas salivares em modelo animal, TESHIMA et al. (2016b) identificaram atividade apoptótica da Caspase-3 clivada nas fases iniciais da morfogênese, principalmente durante

a formação da cavidade luminal dos ductos. Nas fases mais desenvolvidas foi observada expressão mínima desta proteína, sugerindo que a presença de Caspase-3 clivada é um indicador precoce durante a formação primitiva dos lúmens ductais. Esse mesmo grupo, utilizando amostras de glândula salivar humanas em desenvolvimento, também não observou a expressão de Caspase-3 clivada em todos os espécimes analisados no estudo, sugerindo que a avaliação desta proteína talvez não caracterize o marcador mais sensível para identificar a ativação da apoptose (TESHIMA et al. 2016a).

Embora a expressão da Caspase-3 clivada tenha sido negativa, em algumas amostras a marcação citoplasmática da Caspase-3 total foi evidenciada em fases precoces da morfogênese da glândula salivar, o que confirma, portanto, que a proteína está presente durante no desenvolvimento da glândula salivar humana, porém não desempenha um papel importante no mecanismo da apoptose. Em compensação, a Caspase-7 também participa do grupo das Caspases efetoras e demonstra compartilhar propriedades semelhantes às da Caspase-3. A deleção concomitante das proteínas Caspases 3 e 7 em modelo *in vivo* resultaram no comprometimento da morfogênese, ao passo que apenas a expressão da Caspase-7 supre a ausência da Caspase-3 (LAKHANI et al. 2006). Avaliamos em alguns espécimes a expressão da proteína Caspase-7: foi observada expressão citoplasmática de Caspase-7 nas fases iniciais do desenvolvimento e, nas fases mais diferenciadas, foi observada também a expressão nuclear. Isso sugere que a Caspase-7 possa ser uma importante

Caspase efetora na morfogênese das glândulas salivares humanas compensando a ausência da Caspase-3 clivada, corroborando o recente estudo de TESHIMA et al. (2016a).

Pertencente à classe de proteínas da matriz extracelular, SPARC é uma proteína geralmente expressa em tecidos embrionários ou em lesões teciduais (MORRIS e KYRIAKIDES 2014). Estudos em câncer têm demonstrado que a expressão de SPARC pode ser observada tanto nas células tumorais quanto no estroma intra e/ou peritumoral (ARNOLD e BREKKEN 2009; MURPHY-ULLRICH e SAGE 2014). No nosso estudo, a proteína SPARC não foi expressa nas estruturas que constituem o parênquima das glândulas salivares, porém foi observada expressão na região do estroma circundando as porções ductais e acinares.

A matriz extracelular circunscreve a arquitetura dos tecidos e proporciona o suporte celular, além disso, é responsável por modular direta ou indiretamente a ação de fatores de crescimento envolvidos no mecanismo de angiogênese e remodelamento tecidual. A proteína SPARC, portanto, é considerada um modulador do câncer por estar relacionado com funções regulatórias como a proliferação, adesão, sobrevivência e migração celular (ARNOLD e BREKKEN 2009).

AQUINO et al. (2013), estudando amostras carcinoma epidermóide da cavidade oral, observaram marcação citoplasmática nas células tumorais, entretanto, houve expressão significativa no estroma adjacente ao tumor. A expressão de SPARC foi correlacionada ao grau do tumor e aos índices de proliferação (AQUINO et al. 2013). Em outro estudo utilizando modelo

animal, foi analisada a inibição da proteína SPARC durante a morfogênese pulmonar que originou morfologia inadequada, principalmente durante a fase pseudoglandular, o estágio fundamental da ramificação das vias aéreas, sugerindo que SPARC possa ser um mediador essencial durante a formação e desenvolvimento das estruturas pulmonares (STRANDJORD et al. 1995).

As mucinas são glicoproteínas que compõem a saliva, importantes para a manutenção da homeostase da cavidade oral (TESHIMA et al. 2011). Expressa principalmente no citoplasma, a MUC1 é tipicamente encontrada na porção apical das glândulas ou nas células epiteliais luminas (NATH e MUKHERJEE 2014) e, nas glândulas salivares, localiza-se especialmente nos ductos estriados e intercalares (MAHOMED 2011).

A proteína MUC1 pode estar associada à regulação da apoptose, uma vez que contribui na evasão da morte celular nas células tumorais evitando a ativação da via intrínseca da apoptose (NATH e MUKHERJEE 2014). RAINA et al. (2004) relatam que a superexpressão de MUC1 pode interferir na ativação da apoptose pela regulação da proteína Bcl-xL (anti-apoptótica) e inativação da proteína Bad (pró-apoptótica) em cultura de fibroblastos de rato.

Em nosso estudo, MUC1 foi positiva com padrão citoplasmático no início da fase pseudoglandular da morfogênese das glândulas salivares maiores e menores, principalmente na região luminal das células ductais. Nas estruturas mais diferenciadas (pré-acinos) houve diminuição da expressão desta proteína. Em um estudo da morfogênese de glândulas salivares menores, na fase pseudoglandular foi identificada marcação nas

porções luminais rudimentares e, no botão terminal, manteve a marcação de MUC1 nas células luminais e em todo o sistema ductal, corroborando os nossos resultados (TESHIMA et al. 2011).

Diversos tipos de neoplasias epiteliais apresentam glicosilação anormal de MUC1, sendo encontrados altos níveis de expressão citoplasmática desta proteína (MAHOMED 2011; NATH e MUKHERJEE 2014). Neste contexto a revisão de MAHOMED (2011) relata que MUC1 nas células tumorais não se limita às regiões apicais das glândulas. No adenoma pleomórfico, a expressão encontra-se em estruturas tubulares na porção luminal das células alteradas e, em contrapartida, no adenocarcinoma de células acinares a marcação citoplasmática é difusa.

Os dados obtidos neste estudo em comparação ao exposto na literatura demonstram a importância entre o equilíbrio das proteínas pró-apoptóticas, anti-apoptótica e de proliferação durante a morfogênese das glândulas salivares humanas, bem como na formação do espaço luminal dos ductos, principalmente nas fases iniciais do desenvolvimento. A similaridade entre a histogênese e o processo de tumorigênese tem sido observada quanto ao comportamento biológico e a base molecular, sugerindo, portanto, a relevância da compreensão e comparação da expressão proteica nestes tecidos para identificar possíveis biomarcadores que possam ser aplicados no diagnóstico precoce de doenças (MA et al. 2010).

Estudo do nosso grupo (dados não publicados) demonstrou a expressão das proteínas BCL2, Caspase-3 clivada, Survivina, PAR4, PHLDA1, MUC1, SPARC, Ki-67, FAS e FASL em amostras de carcinoma

mucoepidermóide e adenoma pleomórfico. Os resultados demonstraram que as proteínas BCL2, SPARC, PHLDA1 e FAS foram mais expressas nas amostras de adenoma pleomórfico enquanto Ki-67 foi mais expressa nas amostras de mucoepidermóide. A associação entre a expressão da proteína SPARC e tumores de baixo grau histológico e expressão da proteína Ki-67 com a presença de metástase em linfonodo em amostras de carcinoma mucoepidermóide, bem como a associação entre a expressão da proteína FAS e menor expressão de Ki-67 e melhores taxas de sobrevida global e câncer específica em amostras de carcinoma mucoepidermóide sugerem que essas proteínas possam apresentar um valor prognóstico nesses tumores.

Em resumo, o estímulo apoptótico durante a morfogênese das glândulas salivares humanas parece estar presente principalmente nas fases mais precoces da morfogênese. Ao longo do desenvolvimento as proteínas pró-apoptóticas diminuem a expressão, enquanto a expressão das proteínas de proliferação aumenta. A proteína Survivina além de ser anti-apoptótica também possui um papel importante durante a proliferação celular e foi observada ao longo do desenvolvimento, bem como a proteína Ki-67 principalmente na fase pseudoglandular. Isso sugere que mesmo nas fases mais desenvolvidas já com a abertura luminal dos ductos, a proliferação celular é necessária para manter a ramificação. Contudo, outros mecanismos, como por exemplo a polarização celular, estão provavelmente envolvidos na manutenção da abertura luminal dos ductos além da apoptose.

6 CONCLUSÕES

As proteínas BCL2, Survivina, Ki-67, FAS, FASL, PAR4, PHLDA1 e MUC1 apresentaram positividade em pelo menos uma fase durante o processo de morfogênese das glândulas salivares humanas:

- A proteína BCL2 foi expressa em raras células nas fases iniciais do desenvolvimento e nos ductos excretores;
- A proteína Survivina foi expressa em padrão citoplasmático ou nuclear ao longo do desenvolvimento glandular;
- A proteína Ki-67 foi expressa principalmente nas fases mais precoces do desenvolvimento;
- As proteínas FAS e FASL foram simultaneamente expressas em raras células principalmente nas fases mais iniciais do desenvolvimento;
- A proteína PAR4 apresentou positividade em todas as fases do desenvolvimento, exceto nas estruturas pré-acinares;
- A proteína PHLDA1 foi expressa nas fases iniciais do desenvolvimento, exceto no botão terminal;
- A proteína MUC1 foi expressa a partir da fase pseudoglandular;
- A proteína SPARC não foi expressa no parênquima da glândula em nenhuma fase da morfogênese, apenas no estroma;
- A proteína Caspase-3 clivada não foi expressa em nenhuma das fases da morfogênese da glândula. Adicionalmente, a proteína Caspase-3 total foi expressa principalmente nas fases mais precoces

do desenvolvimento da glândula e a proteína Caspase-7 foi expressa em todos os estágios da morfogênese com padrão nuclear nas fases iniciais e citoplasmática nas mais desenvolvidas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. **Oral oncol** 2013; 49:845-53.

Allen RT, Cluck MW, Agrawal DK. Mechanisms controlling cellular suicide: role of BCL2 and Caspases. **Cell Mol Life Sci** 1998; 54:427-45.

Altieri DC. Survivin in apoptosis control and cell-cycle regulation in cancer. **Prog Cell Cycle Res** 2003;5:447.

Andrew DJ, Ewald AJ. Morphogenesis of epithelial tubes: Insights into tube formation, elongation, and elaboration. **Dev Biol** 2010; 341:34-55.

Aquino G, Sabatino R, Cantile M, et al. Expression analysis of SPARC/osteonectin in oral squamous cell carcinoma patients: from saliva to surgical specimen. **Bio Med Res Int** 2013; 2013:736438.

Arnold S A, Brekken R A. SPARC: a matricellular regulator of tumorigenesis. **J Cell Commun Signal** 2009; 3:255-73.

Batsakis JG, Regezi JA, Luna MA, El-Naggar A. Histogenesis of salivary gland neoplasms: a postulate with prognostic implications. **J Laryngol Otol** 1989; 103:939-44.

Boatright KM, Salvesen GS. Mechanisms of Caspase activation. **Curr Opin Cell Biol** 2003; 15:725-31.

Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. **Curr Opin Cell Biol** 2002; 14:608-16.

Carev D, Krnić D, Saraga M, Sapunar D, Saraga-Babić M. Role of mitotic, pro-apoptotic and anti-apoptotic factors in human kidney development. **Pediatr Nephrol** 2006; 21:627-36.

Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of Caspases. **Microbiol Mol Biol Rev** 2000; 64:821-46.

Chipuk JE, Moldoveanu T, Llambi F, Parsons MJ, Green DR. The BCL2 family reunion. **Mol Cell** 2010; 37:299-310.

Cotter TG. Apoptosis and cancer: the genesis of a research field. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:501-7.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Caspase expression in oral squamous cell carcinoma. **Head Neck**. 2011 Aug;33(8):1191-8.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nonogaki S, et al. Expression of PAR4 and PHLDA1 is prognostic for overall and disease-free survival in oral squamous cell carcinomas. **Virch Arch** 2013; 463:31-9.

Cutler LS. The role of extracellular matrix in the morphogenesis and differentiation of salivary glands. **Adv Dent Res** 1990; 4:27-33.

Dale AC. Salivary gland. In: **Ten Cate AR**, editor. Oral histology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1994. p.312-33.

Dardick I, Byard RW, Carnegie JA. A review of the proliferative capacity of major salivary glands and the relationship to current concepts of neoplasia in salivary glands. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1990; 69:53-67.

Davidson WF, Haudenschild C, Kwon J, Williams MS. T cell receptor ligation triggers novel nonapoptotic cell death pathways that are Fas-independent or Fas-dependent. **J Immunol** 2002; 169:6218-30.

de Paula F, Teshima TH, Hsieh R, Souza MM, Nico MM, Lourenco SV. Overview of Human Salivary Glands: Highlights of Morphology and Developing Processes. **Anat Rec (Hoboken)**. 2017 Feb 13.

Dekker J, Rossen JWA, Büller HA, Einerhand AWC. The MUC family: an obituary. **Trends Biochem Sci** 2002; 27:126-31.

El-Guendy N, Rangnekar VM. Apoptosis by PAR4 in cancer and neurodegenerative diseases. **Exp Cell Res** 2003; 283:51-66.

Ellis GL, Auclair PL. **AFIP Atlas of tumor pathology**. 4th ed. Maryland: ARP Press; 2008. The normal salivary glands; p.1-20.

Ferraris ME, Muñoz AC. Histologia e embriologia bucodental: **bases estruturais da patologia, diagnóstico, tratamento e prevenção odontológica**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2006; Glândulas salivares; p.139-69.

Flusberg DA, Sorger PK. Surviving apoptosis: life-death signaling in single cells. **Trends Cell Biol** 2015; 25:446-58.

García-Sáez AJ. The secrets of the BCL2 family. **Cell Death Differ** 2012; 19:1733-40.

Gonçalves CF, Morais MO, Alencar RDCG, et al. Expression Of Ki-67 and MUC1 In mucoepidermoid carcinomas of young and adult patients: prognostic implications. **Exp Mol Pathol** 2011; 90:271-5.

Goswami A, Ranganathan P, Rangnekar VM. The phosphoinositide 3-kinase/AKT1/PAR4 axis: a cancer-selective therapeutic target. **Cancer Res** 2006; 66:2889-92.

Gresik EW. The granular convoluted tubule (GCT) cell of rodent submandibular glands. **Microsc Res Tech** 1994; 27:1-24.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. **Nature** 2000; 407:770-6.

Holmberg K V, Hoffman MP. Anatomy, biogenesis and regeneration of salivary glands. **Monogr Oral Sci** 2014; 24:1-13.

Hsu JC, Yamada KM. Salivary gland branching morphogenesis--recent progress and future opportunities. **Int J Oral Sci** 2010; 2:117-26.

Ianez RF, Buim ME, Coutinho-Camillo CM, Schultz R, Soares FA, Lourenço SV. Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers. **Histopathology** 2010; 57:410-7.

Jaskoll T, Chen H, Min Zhou Y, Wu D, Melnick M. Developmental expression of survivin during embryonic submandibular salivary gland development. **BMC Dev Biol** 2001; 1:5.

Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. **Vet Pathol** 2004; 41:599-607.

Kamada S, Kikkawa U, Tsujimoto Y, Hunter T. Nuclear translocation of CASPASE-3 is dependent on its proteolytic activation and recognition of a substrate-like protein(s). **J Biol Chem** 2005; 280:857-60.

Katchburian E, Arana V. **Histologia e embriologia oral: texto, atlas e correlações clínicas**. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2014. Glândulas salivares; p.83-104.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. **Br J Cancer** 1972; 26:239-57.

Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CPP32 (CASPASE-3), a cell death protease. **Cancer Res** 1997; 57:1605-13.

Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis. **Science** 2006; 311:847-51.

Li H, Yuan J. Deciphering the pathways of life and death. **Curr Opin Cell Biol** 1999; 11:261-6.

Li J, Yin Q, Wu H. Structural basis of signal transduction in the TNF receptor superfamily. **Adv Immunol** 2013; 119:135-53.

Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC, Liavaag PG, Jonsson R. Suppression of Fas receptor and negative correlation of Fas ligand with differentiation and apoptosis in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med** 1999; 28:82-7.

Lourenço SV, Kapas S. Integrin expression in developing human salivary glands. **Histochem Cell Biol** 2005; 124:391-9.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim MEC, Uyekita SH, Soares FA. Human salivary gland branching morphogenesis: morphological localization of claudins and its parallel relation with developmental stages revealed by

expression of cytoskeleton and secretion markers. **Histochem Cell Biol** 2007; 128:361-9.

Lourenço SV, Uyekita SH, Lima DMC, Soares FA. Developing human minor salivary glands: morphological parallel relation between the expression of TGF-beta isoforms and cytoskeletal markers of glandular maturation. **Virch Arch** 2008; 452:427-34.

Lubarsky B, Krasnow MA. Tube morphogenesis: making and shaping biological tubes. **Cell** 2003; 112:19-28.

Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang Z, Qin H. The relationship between early embryo development and tumourigenesis. **J Cell Mol Med** 2010; 14:2697-701.

Mahomed F. Recent advances in mucin immunohistochemistry in salivary gland tumors and head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncol** 2011; 47:797-803.

McCurdy S, Baicu CF, Heymans S, Bradshaw AD. Cardiac extracellular matrix remodeling: fibrillar collagens and Secreted Protein Acidic and Rich in Cysteine (SPARC). **J Mol Cell Cardiol** 2010; 48:544-9.

Melnick M, Jaskoll T. Mouse submandibular gland morphogenesis: a paradigm for embryonic signal processing. **Crit Rev Oral Biol Med** 2000; 11:199-215.

Melnick M, Chen H, Zhou Y, Jaskoll T. Embryonic mouse submandibular salivary gland morphogenesis and the TNF/TNF-R1 signal transduction pathway. **Anat Rec** 2001; 262:318-30.

Miranda Viana ADC, Ribeiro DC, Florêncio TNG, Santos VT, Sousa AA, Aguiar MCF. Immunohistochemical expression of metallothionein in pleomorphic adenoma of minor salivary glands: a role in the control of apoptosis? **Acta Histochem** 2013; 115:564-8.

Morris AH, Kyriakides TR. Matricellular proteins and biomaterials. **Matrix Biol** 2014; 37:183-91.

Murphy-Ullrich JE, Sage EH. Revisiting the matricellular concept. **Matrix Biol** 2014; 37:1-14.

Nagai MA. Pleckstrin homology-like domain, family A, member 1 (PHLDA1) and cancer. **Biomol Rep** 2016; 4:275-281.

Nagai MA, Fregnani JHTG, Netto MM, Brentani MM, Soares F A. Down-regulation of PHLDA1 gene expression is associated with breast cancer progression. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 106:49-56.

Nagai MA, Gerhard R, Salaorni S, et al. Down-regulation of the candidate tumor suppressor gene PAR4 is associated with poor prognosis in breast cancer. **Int J Oncol** 2010; 37:41-9.

Nagao T, Sato E, Inoue R, et al. Immunohistochemical analysis of salivary gland tumors: application for surgical pathology practice. **Acta Histochem Cytochem** 2012; 45:269-82.

Nath S, Mukherjee P. MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. **Trends Mol Med** 2014; 20:332-42.

Neef R, Kuske MA, Pröls E, Johnson JP. Identification of the human PHLDA1/TDAG51 gene: down-regulation in metastatic melanoma

contributes to apoptosis resistance and growth deregulation. **Cancer Res** 2002; 62:5920-9.

Novack DV, Korsmeyer SJ. BCL2 protein expression during murine development. **Am J Pathol** 1994; 145:61-73.

Nuñez G, Benedict MA, Hu Y, Inohara N. Caspases: the proteases of the apoptotic pathway. **Oncogene** 1998; 17:3237-45.

Park CG, Lee SY, Kandala G, Choi Y. A novel gene product that couples TCR signaling to Fas(CD95) expression in activation-induced cell death. **Immunity** 1996; 4:583-91.

Patel VN, Rebutini IT, Hoffman MP. Salivary gland branching morphogenesis. **Differentiation** 2006; 74:349-64.

Patel N, Sharpe PT, Miletich I. Coordination of epithelial branching and salivary gland lumen formation by Wnt and FGF signals. **Dev Biol** 2011; 358:156-67.

Patel VN, Hoffman MP. Salivary gland development: a template for regeneration. **Sem Cell Dev Biol** 2015; 25-26:52-60.

Pereira WO, Amarante-Mendes GP. Apoptosis: a programme of cell death or cell disposal? **Scand J Immunol** 2011; 73:401-7.

Peter ME, Hadji A, Murmann A E, et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell Death Differ** 2015; 22:549-59.

Pich A, Chiusa L, Navone R. Prognostic relevance of cell proliferation in head and neck tumors. **Ann Oncol** 2004; 15:1319-29.

Qinan W, Ling Z, Bing C. PAR4: a possible new target for age-related disease. **Expert Opin Ther Targets** 2014; 18:917-27.

Rahman M, Chan APK, Tang M, Tai IT. A peptide of SPARC interferes with the interaction between Caspase8 and Bcl2 to resensitize chemoresistant tumors and enhance their regression in vivo. **PloS One** 2011; 6:e26390.

Raina D, Kharbanda S, Kufe D. The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. **J Bio Chem** 2004; 279:20607-12.

Reed JC. Mechanisms of apoptosis. **Am J Pathol** 2000; 157:1415-30.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol** 2000; 182:311-22.

Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. Old, new and emerging functions of Caspases. **Cell Death Differ** 2015; 22:526-39.

Shrestha-Bhattarai T, Rangnekar VM. Cancer-selective apoptotic effects of extracellular and intracellular PAR4. **Oncogene** 2010; 29:3873-80.

Stenner M, Klussmann JP. Current update on established and novel biomarkers in salivary gland carcinoma pathology and the molecular pathways involved. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2009; 266:333-41.

Strandjord TP, Sage EH, Clark JG. SPARC participates in the branching morphogenesis of developing fetal rat lung. **Am J Resp Cell Mol Biol** 1995; 13:279-87.

Tadbir AA, Pardis S, Ashkavandi ZJ, et al. Expression of Ki67 and CD105 as proliferation and angiogenesis markers in salivary gland tumors. *Asian Pac J Cancer Prev* 2012; 13:5155-9.

Tai IT, Tang MJ. SPARC in cancer biology: its role in cancer progression and potential for therapy. *Drug Resist Updat* 2008; 11:231-46.

Takahashi S, Gobe GC, Yoshimura Y, Kohgo T, Yamamoto T, Wakita M. Participation of the Fas and Fas ligand systems in apoptosis during atrophy of the rat submandibular glands. *Int J Exp Pathol*. 2007 Feb;88(1):9-17.

Teshima THN, Ianez RF, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Soares F A, Lourenço S V. Development of human minor salivary glands: expression of mucins according to stage of morphogenesis. *J Anat* 2011; 219:410-7.

Teshima THN, Ianez RCF, Coutinho-Camillo CM, Tucker AS, Lourenço S V. Apoptosis-associated protein expression in human salivary gland morphogenesis. **Arch Oral Biol** 2016a; 69:71-81.

Teshima THN, Wells KL, Lourenço S V, Tucker A S. Apoptosis in early salivary gland duct morphogenesis and lumen formation. **J Dent Res** 2016b; 95:277-83.

Tucker A S. Salivary gland development. **Sem Cell Dev Biol** 2007; 18:237-44.

Vangestel C, Van de Wiele C, Mees G, Peeters M. Forcing cancer cells to commit suicide. **Cancer Biother Radiopharm** 2009; 24:395-407.

Verhoven B, Yan Y, Ritter M, et al. Ki-67 is an independent predictor of metastasis and cause-specific mortality for prostate cancer patients treated

on Radiation Therapy Oncology Group (RTOG) 94-08. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2013; 86:317-23.

Waring P, Müllbacher A. Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. **Immun Cell Biol** 1999; 77:312-7.

Yip KW, Reed JC. BCL2 family proteins and cancer. **Oncogene** 2008; 27:6398-406.

Zhao Y, Rangnekar VM. Apoptosis and tumor resistance conferred by PAR4. **Cancer Biol Ther** 2008; 7:1867-74.

Zhao P, Lu Y, Liu L. Correlation of decreased expression of PHLDA1 protein with malignant phenotype of gastric adenocarcinoma. **Int J Clin Exp Pathol** 2015a; 8:5230-5.

Zhao PO, Li X, Lu Y, Liu L. Downregulated expression of PHLDA1 protein is associated with a malignant phenotype of cholangiocarcinoma. **Oncol Lett** 2015b; 10:895-900.

Anexo 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

	A.C. Camargo Cancer Center	Comitê de Ética em Pesquisa - CEP
---	---------------------------------------	--

São Paulo, 07 de maio de 2015.

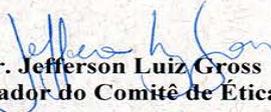
À
Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo
Aluna: Ágatha Nagli de Mello Gomes (Mestrado)

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1578/11F
“Apoptose nas glândulas salivares humanas: Avaliação de marcadores durante o processo de morfogênese da glândula.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em reunião de 14/04/2015, **tomaram conhecimento e aprovaram** os seguintes documentos:

- Solicitação de dispensa da submissão da documentação obrigatória e análise ética do projeto acima mencionado por se tratar de um projeto afiliado ao temático intitulado “Avaliação de marcadores de apoptose durante a morfogênese e tumorigênese das glândulas salivares humanas”, registrado neste CEP sob nº 1578/11. O projeto afiliado em referência será Dissertação de Mestrado da aluna: Ágatha Nagli de Mello Gomes.
- Projeto de Mestrado, datado de 05 de março de 2015.

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br