



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA METALOPROTEINASE (MMP-9) E DA (TIMP-1) EM NEOPLASIAS BENIGNAS E MALIGNAS GLÂNDULAS SALIVARES¹

Micheline Bica Guterres²

¹ Análise imuno-histoquímica da metaloproteinase (MMP-9) e da TIMP(-1) em neoplasias benignas e malignas glândulas salivares Dissertação de Mestrado

² Micheline Bica Guterres Aluna Pós Graduação Mestrado: Biopatologia Bucal, Área Patologia Faculdade de Odontologia, Campus de São José dos Campos,UNESP. Bolsista Capes

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a presença e expressão de MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias de glândulas salivares. Foram estudados 20 casos de adenoma pleomórfico (AP), 05 de mioepitelioma (MIO), 17 de carcinoma mucoepidermóide (CME), 10 de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade (APBG) e 08 de carcinoma adenóide cístico (CAC).O material foi submetido à reação imuno-histoquímica para detecção de MMP-9 e TIMP-1, pelo método da estreptavidina-biotina peroxidase. Foi feita avaliação semiquantitativa da marcação e os dados foram submetidos à análise estatística descritiva e inferencial utilizando o programa Minitab (versão 16.0). Foram aplicados os testes Mann-Whitney e de sinais de postos de Wilcoxon, com nível de significância de 5%. Verificou-se que existe variação da expressão dos marcadores entre as diversas estruturas de cada lesão, com predomínio de TIMP-1 sobre MMP-9. Entre as neoplasias, observou-se maior expressão de TIMP-1 no AP, no CME e no CAC e de MMP-9 no MIO e no APBG, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Na comparação da marcação para cada anticorpo, entre lesões benignas e malignas, não se observou diferença estatisticamente significativa. Concluiu-se que a maioria das neoplasias de glândula salivar apresenta MMP-9 e TIMP-1 e que o grau de expressão dessas proteínas é variável entre as estruturas de uma mesma lesão e entre as diferentes neoplasias. A capacidade invasiva e disseminativa das neoplasias de glândula salivar independe do grau de expressão imuno-histoquímica de MMP-9 e TIMP-1.

Descritores: Neoplasias. Glândulas salivares. Metaloproteinases da matriz (MMPs). Imuno-histoquímica.Carcinoma mucoepidermóide.

Relevância Clínica: O trabalho reforçou a grande diversidade celular e



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

morfológica das neoplasias de glândulas salivares o que muitas vezes torna difícil seu diagnóstico.

INTRODUÇÃO

A origem e o desenvolvimento das neoplasias de glândulas salivares ainda são pouco esclarecidos devido à grande variedade de comportamento e de padrões histológicos que estas lesões apresentam, tornando assim seu diagnóstico e tratamento difíceis¹.

O microambiente onde se encontra uma célula neoplásica (cancerosa) pode desempenhar um papel importante no desenvolvimento do câncer. O componente principal deste ambiente é a matriz extracelular (MEC). A remodelação da matriz extracelular é regulada por uma série de enzimas, como as metaloproteinases da matriz (MMPs), que podem estar desreguladas com a idade ou em condições patológicas².

Nos tumores, as MMPs são consideradas moléculas fundamentais em várias etapas da progressão, como crescimento, invasão e metástase, sendo o aumento de sua expressão geralmente associado a um pior prognóstico³. Em especial, MMP-2 e MMP-9 desempenham papel crítico na invasão da membrana basal por meio da degradação do colágeno tipo IV, levando aos processos de vascularização e progressão de diversos tumores⁴.

Por outro lado, a expressão dos inibidores teciduais das MMPs (TIMPs) é observada durante a remodelação tecidual fisiológica, contribuindo para a



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

manutenção do equilíbrio metabólico e estrutural da MEC. Alterações na homeostasia entre as MMPs e os TIMPs têm sido identificadas em doenças associadas à renovação não controlada da MEC⁵.

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

MATERIAL E MÉTODO

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

Amostra e Seleção dos Casos

Para este estudo foram utilizados 60 casos de neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares pertencentes aos arquivos da Disciplina de Patologia do Departamento de Biociências e Diagnóstico Bucal da FOSJC.

Reação Imuno-histoquímica

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

Para a reação imuno-histoquímica os cortes histológicos após desparafinação em xilol e desidratação em série decrescente de etanol, foram submetidos à recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena e incubação com o anticorpo primário. Foram utilizados os métodos de visualização da



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

estreptavidina-biotina (LSAB, Dako) e sistema de polímero (NovocastraTM NovolinkTM Polymer Detection System), revelando com o cromógeno DAB.

Método de análise dos resultados

Avaliação da Marcação para MMP-9 e TIMP-1

Os cortes submetidos à reação imuno-histoquímica foram analisados em microscopia de luz (Microscópio Zeiss Axiophot-2, Carl Zeiss, Oberkochen, Alemanha), inicialmente em aumento de 200x, para identificar as diversas estruturas do tumor e posteriormente de 400x, para fazer a avaliação semi-quantitativa da marcação. As lâminas das reações para MMP-9 e TIMP-1 foram analisadas por um único observador, com a atribuição de escores de 0 a 6, baseados na soma dos escores da porcentagem de células tumorais positivas (0-3) e da intensidade de marcação (0-3), segundo o método proposto por⁶. (Tabela 1). Somente as células coradas em marrom foram consideradas positivas.

Para cada neoplasia, foi construído um quadro com as estruturas características daquela lesão, baseado no trabalho⁷, a fim de facilitar a análise da marcação por estrutura. O escore final de cada tumor consistiu na média dos escores das estruturas individuais presentes em uma determinada lesão.

Análise Estatística

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



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

RESULTADOS

Análises dos dados clínicos

Os casos estudados foram compostos por 20 adenomas pleomórficos, 05 mioepiteliomas, 17 carcinomas mucoepidermóides, 10 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau de malignidade e 08 carcinomas adenóides císticos.

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

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

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

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

DISCUSSÃO

As neoplasias glandulares apresentam grande variação morfológica, tanto em diferentes casos quanto na mesma lesão, optou-se por analisar as principais estruturas componentes de cada neoplasia, atribuindo a elas escores parciais. O escore global consistiu na média dos escores parciais de cada lesão⁷.

Neste estudo, a marcação imuno-histoquímica de MMP-9 e TIMP-1 foi avaliada por meio de escores semi-quantitativos de 0 a 6 baseados na soma dos escores da porcentagem de células tumorais positivas (0-3 pontos) e na intensidade de



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

marcação (0-3 pontos). O mesmo tipo de análise semi-quantitativa⁶.

Em nosso estudo investigamos a presença de MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, comparando sua expressão em cada lesão e entre lesões benignas e malignas, utilizando para isso a reação imuno-histoquímica.

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

Nos casos de adenoma pleomórfico, verificamos que a marcação imuno-histoquímica para TIMP-1 foi maior que para MMP-9 nas células luminiais ductais, células mioepiteliais poligonais e fusiformes em lençol, células mioepiteliais plasmocitóides e estroma, sendo a marcação para MMP-9 maior que para TIMP-1 apenas nas células ductais não luminiais. Obteve-se assim uma maior marcação para TIMP-1 na maioria dos componentes do AP, quando comparada com MMP-9. Este achado é coerente com a natureza benigna do tumor. No entanto, sem entrar em detalhes sobre as estruturas do adenoma pleomórfico analisadas, observaram que a marcação para MMP-9 foi maior que a observada para TIMP⁶.

Nas estruturas ductiformes do AP, a MMP-9 foi fracamente expressa na membrana das células luminiais e fortemente expressa na membrana basal, quando comparada com outros marcadores como TIMP-1. Os autores não detectaram a expressão de RNAm de MMP-9 em dois dos seis casos de AP, sugerindo que a expressão desta metaloproteinase, por vezes, é instável e mantida a níveis quase imperceptíveis nos AP. Os autores também notaram que os dois casos que não tiveram nenhuma expressão do RNAm de MMP-9 eram tumores visivelmente maiores com maior tempo de evolução⁸.

Nos casos de mioepitelioma, as células mioepiteliais poligonais, fusiformes e plasmocitóides apresentaram marcação para MMP-9 na grande maioria dos casos e, esta expressão foi maior quando comparada com TIMP-1. No estroma, tanto MMP-9 quanto TIMP-1 tiveram a mesma proporção de casos marcados. Resultados semelhantes com escores de marcação maior para MMP-9 que para TIMP-1 em casos de mioepitelioma foram encontrados por Nagel⁶.



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Nos casos de carcinoma mucoepidermóide, comparando as células mucosas, intermediárias e epidermóides organizadas em lençol, observamos que a marcação para MMP-9 e TIMP-1 apresentou-se um pouco maior nas células epidermóides. Observamos também maior marcação para MMP-9 e TIMP-1 nas células mucosas e epidermóides dos revestimentos dos espaços císticos, quando comparadas com as células intermediárias. Nagel⁶ também encontraram um padrão de expressão de MMPs e TIMPs em carcinoma mucoepidermóides que variou entre os diferentes tipos de células tumorais. Estes autores observaram maior expressão imuno-histoquímica de MMP-2 e MMP-9 em células intermediárias e epidermóides, o que foi confirmado por análise zimográfica. Em células mucosas a expressão imuno-histoquímica mostrou-se fraca ou negativa.

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

Os APBG analisados neste trabalho, verificou-se que a expressão de MMP-9 foi maior que a de TIMP-1. A maior expressão de MMP-9 pode estar relacionada ao padrão de crescimento infiltrativo do APBG¹.

No presente estudo, verificou-se nos casos de carcinoma adenóide cístico que as células luminais e não luminais das estruturas tubulares e cribriformes tiveram um padrão semelhante de marcação para MMP-9. A marcação de TIMP-1 variou entre as estruturas e foi maior que a de MMP-9, exceto nas células não luminais ductais. Apesar do possível papel supressor tumoral de TIMPs, Nagel⁶ também encontraram escores de marcação aumentados para TIMPs em carcinomas, quando comparados com adenomas.

Realizou-se também a comparação da marcação para MMP-9 e TIMP-1 entre lesões benignas e malignas. O teste estatístico demonstrou que não houve diferença significativa na imuno-expressão dos marcadores. No estudo de Nagel⁶ a expressão de MMPs e TIMPs foi comparada em diferentes tumores benignos e



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

malignos de glândulas salivares. Os escores imuno-histoquímicos de MMP-2 detectados em células tumorais foram significativamente aumentados em tumores malignos quando comparados com benignos, enquanto que os escores imuno-histoquímicos de MMP-9 não tiveram diferença significativa entre benignos e malignos.

No presente trabalho, observou-se que a marcação para TIMP-1 foi ligeiramente maior nos casos de neoplasias malignas, indicando que as TIMPs não teriam papel importante na função supressora tumoral em carcinomas de glândulas salivares, conforme sugerido por Nagel⁶.

Zhang⁸ compararam, em adenomas pleomórficos, a expressão de MMP-2, MMP-9, TIMP1 e TIMP2 em epitélio ductal e células mioepiteliais envoltas por estroma. Notaram que o aumento da expressão de MMPs foi seguido pelo aumento da expressão de TIMPs, sugerindo uma correlação positiva entre MMPs e seus inibidores teciduais. Segundo os autores, o aumento de TIMPs representa uma tentativa fisiológica para controlar a atividade aumentada de MMPs e manter uma relação equilibrada entre as duas proteínas.

Em tumores malignos de glândula salivar, Nagel⁶ sugerem um desequilíbrio no balanço entre MMPs e TIMPs. As MMPs estão envolvidas em processos fisiológicos do organismo. No trabalho realizado por Wigner¹⁰, os autores observaram que a MMP-9 estava associada tanto com o processo de formação vascular quanto com a remodelação do estroma tecidual.

Luukka⁹ ao realizar um estudo imuno-histoquímico correlacionando as MMPs-1, 9 e 13 como fator de prognóstico em câncer de glândulas salivares, comprovou que estas MMPs contribuem para a progressão e invasão desses tumores malignos por meio da clivagem de membrana basal. A expressão de MMPs e TIMPs em tumores de glândulas salivares não está bem estabelecida na literatura.

Os trabalhos existentes mostram que diversas metaloproteínases e seus inibidores estão presentes nessas lesões, porém, não há consenso sobre a importância de cada tipo específico dessas proteínas para os diferentes grupos de neoplasias glandulares. Estudos adicionais são necessários para se entender melhor a relação desses marcadores com o desenvolvimento, a evolução e o prognóstico de



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

neoplasias salivares.

CONCLUSÕES

A análise dos resultados obtidos nesse estudo permitiu concluir que:

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

APLICAÇÃO CLÍNICA:



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

Analisar, pela imuno-histoquímica, a presença de MMP-9 e TIMP-1 em neoplasias benignas e malignas de glândulas salivares, comparando sua expressão em cada lesão e entre lesões benignas e malignas.

REFERÊNCIAS*

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

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

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

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

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

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

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



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

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

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

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

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

ABSTRACT

The salivary gland tumors present very diverse cellular morphology and behavior, often making their diagnosis, treatment and prognosis difficult. An important component of tumors is the extracellular matrix, which is regulated by remodeling enzymes such as matrix metalloproteinases (MMPs) and their inhibitors (TIMPs). The objective of this study was to evaluate the role of MMP-9 and TIMP-1 in salivary gland neoplasms. We studied 20 pleomorphic adenomas (PA), 05 myoepitheliomas (MIO), 17 mucoepidermoid carcinomas (MEC), 10 polymorphous low-grade adenocarcinomas (PLGA) and 08 adenoid cystic carcinomas (ACC), which were selected from the files of the Laboratory of Surgical Pathology from FOSJC / UNESP. The material was subjected to immunohistochemical staining for detection of MMP-9 and TIMP-1 by the method of the streptavidin-biotin peroxidase. A staining semiquantitative assessment was made and the data were



Tipo de trabalho: TRABALHO COMPLETO (MÍNIMO 08 PÁGINAS, MÁXIMO 15 PÁGINAS)

submitted to descriptive and inferential statistical analysis using Minitab (version 16.0). We applied the Mann-Whitney and Wilcoxon signs of posts tests, with a significance level of 5%. It was found that there is variation in the expression of markers among the various structures of each lesion, with a predominance of TIMP-1 over MMP-9. Among the tumors, we observed greater expression of TIMP-1 in PA, MEC and ACC and of MMP-9 in MIO and PLGA, however, any statistically significant difference has not been observed. Comparing the labeling for each antibody among benign and malignant lesions, there was no statistically significant difference. It was concluded that most of the salivary gland neoplasms express MMP-9 and TIMP-1 and that the degree of expression of these proteins is variable among the structures of the same lesion and among the various salivary neoplasms, regardless of their benign or malignant nature. The invasive properties and dissemination capacity of salivary gland tumors is independent of the degree of immunohistochemical expression of MMP-9 and TIMP-1.

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