**ANEXO 1 – MODELO PARA APRESENTAÇÃO DE RELATÓRIO FINAL**

Imunoexpressão de Ephrin-A1 e receptores de efrinas Eph-A1 e Eph-A2 em Carcinoma Adenóide Cístico Glandular Salivar

**Jailton Daniel de Sousa Silva (1); Manuel Antonio Gordón-Núñez (2).**

(1) Estudante de Graduação em Odontologia; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB; jailton.sousa@aluno.uepb.edu.br

(2) Professor do Departamento de Odontologia e do Programa de Pós-Graduação em Odontologia; Universidade Estadual da Paraíba; Campina Grande, PB; godonnunez152631@servidor.uepb.edu.br

**RESUMO:** : Efrinas (Ephrins) e seus receptores (Eph) participam de sinalizações intracelulares bidirecionais que modulam fenômenos citológicos e tumorais, porém poucos estudos abordam suas ações em neoplasias glandulares salivares. Foi avaliada a imunoexpressão de Efrina-A1, Eph-A1 e Eph-A2 em 7 carcinoma adenóides císticos (CAC) glandulares salivares em relação a parâmetros histomorfológicos. Foram estabelecidos percentuais de imunoexpressão citoplasmática e nuclear em cinco campos de maior imunorreatividade (400x). Os dados foram analisados através dos testes de Mann-Whitney e de correlação de Spearman (p < 0,05). Houve expressão citoplasmática de Efrina-A1 em todos os casos, com baixos percentuais de positividade. Imunopositividade nuclear da efrina-A1 ocorreu em 6 (85,7%) CAC, com baixos percentuais de positividade. Expressão citoplasmática de Eph- A1 foi identificada em todos os CAC, com altos percentuais de positividade. Imunoexpressão nuclear ocorreu em todos CAC, com baixos percentuais de positividade. Expressão citoplasmática de Eph-A2 ocorreu em toda a amostra, com altos percentuais de positividade. Imunoexpressão nuclear de Eph-A2 ocorreu em

3 (42,9%) CAC, com baixos percentuais de células imunopositivas. Somente houve diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão citoplasmática de Efrina-A1 em relação aos graus histopatológicos de malignidade (p=0,034), principalmente em CAC de alto grau. Não houve correlação significativa entre as variáveis analisadas. A baixa imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Efrina-A1, sugere um discreto envolvimento desta proteína na modulação de eventos moleculares relacionados à patogenia dessa neoplasia, principalmente pelo fato dos CAC de alto grau de malignidade. A translocação nuclear de Eph-A1, poderiam sugerir uma participando de vias de sinalização reversas intracelulares, com possível influência na regulação da morfologia, proliferação e eventos

adesivos célula-célula/célula-MEC e crescimento tumoral do CAC. Os altos percentuais citoplasmáticos de Eph-A2 sugerem sua maior participação em eventos etiopatogênicos dos CAC, enquanto os baixos percentuais sugerem que essa expressão não parece ser importante para a patogenia do CAC.

**Palavras-chave:** *Carcinoma adenóide cístico; Ephrin-A1; Eph-A1; Eph-A2.*

**INTRODUÇÃO**

O Carcinoma Adenóide Cístico (CAC) é uma neoplasia maligna de glândula salivar que ocorre principalmente glândulas salivares menores, com destaque para o palato. O CAC, comumente, mostra-se como um aumento de volume de crescimento lento, sendo a dor o seu achado clínico mais comum e significante (Neville *et al*., 2023).

Histopatologicamente, o CAC pode apresentar-se através de três padrões principais: cribriforme, tubular e sólido (Ellis; Auclair, 1996; Neville *et al*., 2023). Existem diversos sistemas de gradação histopatológica para o CAC, que se baseiam no comportamento biológico e nas características histoplatológicas tumorais predominantes, como o proposto por van Weert *et al*. (2015), que classifica os CAC em Baixo e Alto grau, considesrando ausência ou presença de áreas de proliferação neoplásica com arranjo sólido, independentemente da sua quantidade.

Efrinas e seus receptores (Eph) são proteínas que regulam uma variedade de eventos celulares, incluindo morfologia, proliferação, migração, angiogênese e eventos patogênicos e processos neoplasicos (Kou; Kandpal, 2018; Grandi *et al*., 2019). Embora sejam alvo comum de estudos em outras doeças ainda são tema pouco abordado em relação a neoplasias glandulares salivares (Ieguchi; Maru, 2019; Xiao *et al.,* 2020).

Encontra-se um número limitado de estudos relacionados à análise de efrinas e Ephs em neoplasias glandulares salivares, porém aparentemente, desempenham funções etiopatogênicas complexas nessas lesões, incluindo angiogênese, adesão, migração celular, invasão vascular e perineural e progressão tumoral (Shao *et al*., 2013; Fukai *et al*., 2014).

Nesse sentido, o presente trabalho objetivou avaliar a expressão de Efrina-A1 e receceptores Eph-A1 e Eph-A2 em CAC, visando obter maiores informações sobre a sua participação nos mecamisnos etiopatogênicos dessa neoplasia de glândulas salivares.

**MATERIAL E MÉTODOS**

O Estudo foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e submetida à análise pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB) e aprovado pelo parecer nº 6.798.135, respeitando a resolução 466/2012 do Conselho Nacional de Saúde/ Ministério da Saúde.

# Amostra

A amostra foi composta por sete (07) casos de CAC provenientes dos arquivos do Laboratório de Histopatologia Oral do Departamento de Odontologia da Universiade Estadual da Paraíba (UEPB), Universidade Federal de Minas Gerais e Universidade Federal do Rio Grande do Norte. Foram incluidos apenas casos com material biológico suficente para realização dos estudos histomorfológicos e imunohistoquímicos. Foram excluídos espécimes que tenham sido submetidos a radioterapia prévia.

# Análise epidemiológica

Foi baseada nas informações das fichas de registro, prontuários e laudos histopatológicos do paciente.

# Análise histomorfológica

A partir do material emblocado em parafina, cortes de 5μm foram obtidos, em seguida estendidos em lâminas de vidro e seguiram para coloração através da técnica da Hematoxilina e Eosina. Um patologista oral experiente analisou morfologicamente cada caso sob microscopia de luz *(Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE).*

A classificação dos CAC baseou-se nos parâmetros propostos por van Weert *et al*. (2015), distinguindo-os em: baixo grau e alto grau, de acordo com os achados histomorfológicos.

# Imuno-histoquímica

As amostras fixadas em formol a 10% e incluidas em parafina, foram submetidas a cortes de 3μm, os quais foram estendidos em lâminas de vidro silanizadas.

Os cortes teciduais foram desparafinizados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica. Para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, os cortes foram imersos em peróxido de hidrogênio a 3% e posteriormente incubados com anticorpos primários, lavados com tampão Citrato pH 6 e tratados com complexo baseado em polímeros de dextrano (*EnVisionTM Flex+, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*). A atividade da peroxidase foi visualizada por meio da imersão dos cortes em diaminobenzidina (*EnVisionTM Flex DAB+, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA*), resultando em um produto de coloração acastanhada. Por fim, os cortes teciduais foram contracorados com hematoxilina de Harris, desidratados e montados com lamínula. Tecido glandular salivar normal foi utilizado para controle positivo. Para controle negativo, houve a omissão dos anticorpos primários.

# Análise imuno-histoquímica

As lâminas foram escaneadas em imagens digitais de alta resolução (*MoticEasyScan Pro 6, Motic Inc., Richmond, BC, CAN*) e, subsequentemente, visualizadas no programa *DSAssistant* (*Motic Inc., Richmond, BC, CAN*).

Um examinador previamente treinado realizou as análises imunoistoquímicas, sem conhecimento dos dados clinicopatológicos relacionados aos casos. Sob aumento de 100× (*DSAssistant, Motic Inc., Richmond, BC, CAN*), foram elencadas áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos e sob aumento de 400×, foram fotomicrografados cinco campos nessas áreas de maior imunorreatividade. O programa *ImageJ*® (*Image Processing and Analysis in Java, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA*) foi utilizado para a contagem de células imunomarcadas e negativas em cada campo da amostra. Os valores obtidos nos campos foram somados, estabelecendo-se o percentual de

células imunopositivas em relação ao total de células contadas.

# Análise estatística

Os dados coletados foram analisados com o auxílio do programa *IBM SPSS Statistics* (*versão 20.0; IBM Corp., Armonk, NY, USA*). O teste de Shapiro-Wilk revelou distribuição não normal dos dados, sendo o teste não paramétrico de Mann-Whitney utilizado para comparar as medianas dos percentuais de células imunopositivas para Efrina-A1, Eph-A1 e Eph-A2 em relação aos parâmetros histomorfológicos dos casos.

Para analisar possíveis correlações entre as imunoexpressões dessas proteínas, aplicou-se o teste de correlação de Kendall. Para todos os testes estatísticos utilizados no presente estudo, foi considerado o nível de significância de 5% (p < 0,05).

**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A análise dos dados clínicos dos CAC revelou a maioria (42,9%) da amostra era do sexo feminino, com idades variando de

37 a 86 anos e média de 52 anos, além disso, 100% dos CAC eram de glândulas salivares menores.

# Análise histomorfológica

A análise das características histopatológicas dos CAC, considerando o grau histopatológico de malignidade (van Weert *et al*., 2015), observou-se que 3 (42,9%) casos de baixo grau e 4 (57,1%) de alto grau.

# Imunoexpressão de Efrina-A1

Expressão citoplasmática de Efrina-A1 foi observada em todos os casos analisados, com baixos percentuais de positividade em todos os grupos e mediana de 2,73. Houve diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão citoplasmática de Efrina-A1 em relação aos graus histopatológicos de malignidade (*p=0,034*), com os CAC de alto grau de malignidade apresentando os maiores percentuais de imunopositividade citoplasmática dessa efrina. Houve imunopositividade nuclear da efrina-A1 em 6 (85,7%) CAC, com baixos percentuais de positividade e mediana de 0,70. Não foi observada diferença estatisticamente significativa da expressão nuclear da Efrina-A1 entre os graus histomorfológicos dos CAC (*p=0,480*).

Os achados desta pesquisa no tocante à

expressão da Efrina-A1 corrobora os resultados obtidos por Shao *et al.* (201) que ao avaliaram a expressão dessa efrina-A1 através de imunistoquímica, Westernblot e RTPCR em tempo real em 49 CAC primários e tecido glandular salivar normal, observaram maior expressão dessa efrina nos CAC do que no tecido normal. Além disso observara que a imunoexpressão dessa proteína era associada a característica patogênicas de maior agressividade tumoral, reforçado pelo achado que os CAC sólidos, usualmente associados a pior prognóstico, exibiram maior expressão.

# Imunoexpressão de Eph-A1

Expressão citoplasmática de Eph-A1 foi identificada em todos os CAC, com altos percentuais de positividade e mediana de 43,19. Imunoexpressão nuclear foi observada em todos CAC, com baixos percentuais de positividade e mediana de 20,31.

Não foram constatadas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Eph-A1 em relação grau histomorfológico de malignidade da amostra (*p= 0,289; p= 1,000*). Os achados poderiam sugerir que o Eph-A1 tenha uma ação na regulação de eventos etiopatogênicos tumorais.

# Imunoexpressão de Eph-A2

Expressão citoplasmática de Eph-A2 foi observada em todos os casos analisados, com altos percentuais de positividade em todos os casos de CAC e mediana de 99,87. Verificou-se imunoexpressão nuclear em 3 (42,9%) CAC, com baixos percentuais de células imunopositivas, com mediana de 0,00. Não houve diferença estatisticamente significativas na imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Eph-A2 em relação grau histomorfológico de malignidade da amostra (*p= 0,593; p= 0,593*).

No tocante à expressão de Eph-A2, Shao *et al*. (2013) observaram achados semelhantes ao da presente pesquisa, com maior expressão desse receptor em CAC do que em tecido não neoplásico e correlação positiva com aumentada microdensidade vascular (MVD), ao estágio TNM tumoral e à presença de invasão perineural e perivascular, bem como maior expressão em CAC sólidos, que correspondem a casos de alto grau de malignidade na classificação de van Weert *et al*. (2016).

Os achados do presente estudo, somado aos resultados de Shao *et al*. (2013), permitem inferir que possivelmente o Eph-A2 possa ter um papel importante nas sinalizações celulares

que regulam eventos moleculares importantes para a patogenia tumoral do CAC. Corroborando o exposto, Fukai *et al*. (2014) relataram o caso de CAC com disseminação perineural ao longo do nervo mandibular. As células tumorais apresentaram características de transição epitelial-mesenquimal (EMT) e uma alta imunoexpressão de Eph-A2, sugerindo um possível papel desse receptor à ocorrência de fenótipos tumorais agressivos.

# Correlações entre as imunoexpressões de Efrina-A1, Eph-A1 e Eph-A2

Não foi observada correlação significativa entre as expressões citoplasmática e nuclear de Efrina-A1, Eph-A1 e Eph-A2 e nem dessas proteínas com o grau histopatológico de malignidade das lesões.

**CONCLUSÕES**

Embora a literatura seja escassa no tocante à imunoexpressão de efrinas e seus receptores em tecidos glandulares salivares, os achados deste estudo sobre a imunoexpressão de Efrina-A1, Eph-A1 e Eph-A2, sugerem potencial participação dessas proteínas na patogênese de CAC.

A baixa imunoexpressão citoplasmática de Efrina-A1 na amostra em geral, sugere um discreto envolvimento dessa proteína na transmissão de sinais moduladores de eventos moleculares relacionados à patogenia dessa neoplasia, principalmente pelo fato dos CAC de alto grau de malignidade terem apresentado uma tendência a maiores percentuais de imunoexpressão dessa proteína. Os baixos percentuais de imunoexpressão nuclear da efrina-A1 na amostra sugere que uma possível translocação nuclear dessa proteína não seria relevante para a patogenia dessa neoplasia maligna.

A imunoexpressão citoplasmática e nuclear de Eph-A1, principalmente em citoplasma nos CAC, parece sugerir algum papel desse receptor nos eventos patogênicos relacionados ao comportamento biológico dessa neoplasia. A imunoexpressão nuclear, sugere a ocorrência de translocação nuclear desse receptor transmembranar, achados que corroboram informações da literatura e que sugerem uma expressão nuclear provavelmente participando de vias de sinalização reversas intracelulares para o meio extracelular, com possível influência na regulação de eventos moleculares relacionados à proliferação e morfologia celular, processos adesivos célula-célula/célula-MEC e

crescimento tumoral do CAC.

Embora não tenha sido observada diferença estatisticamente significativa da expressão citoplasmática e nuclear de Eph-A2 na amostra, os altos percentuais de imunopositividade citoplasmática em CAC corroboram a literatura, sugerindo sua maior expressão em neoplasias malignas. Os baixos percentuais de imunoexpressão nuclear de Eph-A2 na amostra sugerem que essa expressão não parecer ser importante para a patogenia do CAC. Nesse contexto é importante dizer que a translocação nuclear do receptor, poderia indicar seu envolvimento na regulação de eventos celulares diferentes daqueles que esse receptor regula na sua localização habitual na superfície celular.

Considerando a ausência de correlação da imunoexpressão entre Efrina-A1, Eph-A1 e Eph-A2 e dessas em relação ao grau histopatológico de malignidade das lesões constitui um dados que infelizmente pode ser o reflexo do tamanho reduzido da amostra, destacando assim a necessidade de realizar estudos com uma amostra maior, que possam subsidiar a busca de informações que auxiliem no entendimento dos complexos mecanismos etiopatogênicos dessa neoplasia maligna glandular salivar, como comportamento biológico usualmente muito agressivo.

# AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio do CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – Brasil, portanto agradecemos ao programa PIBIC-Af/CNPQ-UEPB**,** pelo insentivo à realização deste trabalho, bem como à pesquisa científica em todo Brasil. Em especial agradeço ao Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón- Núñez pela orientação e direcionamento durante a realização do presente trabalho.

# REFERÊNCIAS

ELLIS, G.L.; AUCLAIR, P.L. Tumors of the

Salivary Glands. Atlas of tumor pathology, 3rd series, fascicle 17. Washington (DC): Armed Forces Institute of Pathology, 1996.

FUKAI, J. *et al*. Intracranial extension of adenoid cystic carcinoma: potential involvement of EphA2 expression and epithelial-mesenchymal transition in tumor

metastasis: a case report. **BMC Res Notes**, v.7, n.1, p., 2014.

GRANDI, A. *et al*. Targeting the Eph/ephrin system as anti-inflammatory strategy in IBD. **Frontiers in pharmacology**, v.10, p.691, 2019.

IEGUCHI, K.; MARU, Y. Roles of EphA1/A2 and ephrin‐A1 in cancer. **Cancer Science**, v.110, n.3, p.841-848, 2019.

KOU, C. T. J.; KANDPAL, R. P. Differential expression patterns of Eph receptors and ephrin ligands in human cancers. **BioMed research international**, v.2018, p.1–23, 2018.

NEVILLE, B.B. *et al*. Patología Oral e Maxilofacial. 4ª Ed. GEN Guanabara Koogan, 2023, 928p.

SHAO, Z. *et al*. EphA2/ephrinA1 mRNA expression and protein production in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.71, n.5, p.869-878, 2013.

VAN WEERT, S. *et al*. Histopathological grading of adenoid cystic carcinoma of the head and neck: analysis of currently used grading systems and proposal for a simplified grading scheme. **Oral Oncol, v.**51, n.1, p.71-6, 2015.

XIAO, T. *et al*. Targeting EphA2 in cancer. **Journal of Hematology & Oncology**, v.13, n.1, p.1-17, 2020.

**OBSERVAÇÃO (exclusiva para Projetos PIBITI):**

Relatórios de projetos PIBITI ( Programa Institucional de Bolsas de Iniciação em Desenvolvimento Tecnológico e Inovação), faz-se necessário também, incluir ao relatório, um sub-item com a descrição do potencial de patenteamento/desenvolvimento de tecnologia passível de proteção, etc.