

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE AQUAPORINAS
EM CARCINOMA MUCOEPIDERMÓIDE
DA GLÂNDULA SALIVAR**

MÉRIN BARBARA STAMBONI

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

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

Co-orientador: Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Stamboni, Mérin Barbara

Avaliação da expressão de aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide da glândula salivar / Mérin Barbara Stamboni – São Paulo, 2018.

62p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. Aquaporinas/Aquaporins. 2. Glândulas Salivares/Salivary Gland. 3. Carcinoma Mucoepidermoide/Carcinoma, Mucoepidermoid. 4. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 5. Saliva/secreção/Saliva/ secretion

DEDICATÓRIA

Primeiramente a DEUS e às pessoas que estão intimamente ligadas à minha vida e que puderam me acompanhar com atos, palavras e orações:

Meus pais: Odair e Thelma

Minha Irmã: Helen

Meu bebê: Davi, meu presente de DEUS.

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o centro da minha vida. Sem Deus eu não teria conseguido.

A Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, minha orientadora, por ter me dado essa oportunidade, por toda compreensão e por seu tempo dedicado a mim e a conclusão desse trabalho. Que Deus a recompense por tudo o que fez por mim.

A Dra Silvia Vanessa Lourenço por sua atenção e dedicação a esse trabalho.

A Katia pelos ensinamentos no uso do laboratório.

A Ana Maria R. Alves Kunimari, por seu incentivo e palavras de encorajamento. A Luciana Pitombeira Castelano, Cássia e Karla pela atenção e orientações.

A Suely Francisco, supervisora da biblioteca, por seu tempo dedicado a me ensinar, pelo seu auxílio e suporte nos momentos finais.

Aos Departamentos de Cabeça e Pescoço e Anatomia Patológica pelo apoio no desenvolvimento da pesquisa.

Ao Núcleo de Epidemiologia e Estatística pela análise Estatística.

As meninas Helen, Agatha e Malu por tornar a convivência mais agradável no CIPE e a Agatha, também, pela ajuda na confecção de figuras.

Aos meus pais e minha irmã Helen por nunca me deixarem desistir.

A Capes por me auxiliar financeiramente.

RESUMO

Stamboni MB. **Avaliação da expressão de aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide da glândula salivar**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

As aquaporinas (AQPs) pertencem a uma família de 13 pequenos canais de proteína transmembrana, envolvidos no transporte de água e solutos sendo fundamentais na fisiologia do organismo. Nas glândulas salivares, as aquaporinas têm sido consideradas muito relevantes para o controle da produção da saliva e manutenção da estrutura glandular, desde os processos de morfogênese do órgão. Entretanto, pouco se sabe acerca da participação dessas proteínas em processos neoplásicos dessas glândulas. Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. O carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares. Em muitos casos, os aspectos histopatológicos desse tumor se assemelham aos das glândulas salivares, e assim, indaga-se a participação das aquaporinas em suas estruturas, no sentido de se compreender a relação biológica da neoplasia com a do órgão normal. O objetivo desse trabalho foi a avaliação da expressão das aquaporinas AQP1, AQP3 e AQP5 em 24 amostras de carcinoma mucoepidermóide por imunistoquímica. Dos 24 pacientes avaliados neste estudo, 11 eram mulheres e 13 homens. A mediana de idade dos indivíduos acometidos por esta lesão foi de 48,5 anos (variando de 8 a 81 anos) e o local mais frequentemente afetado em nossa amostra foi a glândula salivar menor, seguido pela parótida. Considerando os resultados da imunistoquímica, a AQP1 não foi expressa no carcinoma mucoepidermóide, sendo expressa na parede dos vasos sanguíneos que permeiam o tumor. A AQP3 foi expressa nas células epidermóides e mucosas em 85,7% dos casos de carcinoma mucoepidermóide e a AQP5 foi

expressa nas células mucosas em 60,0% dos casos de carcinoma mucoepidermóide. Não foi observada associação entre a expressão das proteínas e as características demográficas, clínicas, patológicas e nem associação da expressão das aquaporinas entre si. Na análise de sobrevida, foi observado que ausência de invasão vascular e ausência de recidiva estavam associadas a melhores taxas de sobrevida global. Apesar de não ser estatisticamente significativo, nossos resultados sugerem que pacientes com ausência de expressão de AQP3 e presença de expressão de AQP5 apresentam uma melhor sobrevida global. De forma geral, nosso estudo apresentou resultados inéditos sobre a expressão de aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide. A expressão de aquaporinas parece estar associada ao processo de desenvolvimento/progressão do carcinoma mucoepidermóide, onde sugere-se que AQP1 poderia contribuir para o fornecimento de nutrientes essenciais para sustentar o crescimento do tumor, AQP3 poderia atuar no metabolismo tumoral, fornecendo energia pela captação de glicerol e conseqüentemente, divisão e proliferação celular e a AQP5 poderia estar mais envolvida no processo de diferenciação celular.

SUMMARY

Stamboni MB. **[Evaluation of the expression of aquaporins in mucoepidermoid carcinoma of the salivary gland]**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

The aquaporins (AQPs) belong to a family of 13 small transmembrane protein channels, involved in the transport of water and solutes being fundamental in the physiology of the organism. In the salivary glands, aquaporins have been considered very relevant for the control of saliva production and maintenance of the glandular structure, from the organ morphogenesis processes. However, little is known about the participation of these proteins in neoplastic processes of these glands. Tumors of salivary glands comprise a heterogeneous group of lesions, presenting different histological characteristics and diverse clinical behavior. Mucoepidermoid carcinoma is the most common malignant tumor of the salivary glands. In many cases, the histopathological aspects of this tumor resemble those of the salivary glands, and thus, the participation of the aquaporins in their structures is investigated, in order to understand the biological relation of the neoplasia with that of the normal organ. The aim of this work was to evaluate the expression of AQP1, AQP3 and AQP5 aquaporins in 24 mucoepidermoid carcinoma samples by immunohistochemistry. Of the 24 patients evaluated in this study, 11 were women and 13 men. The median age of the individuals affected by this lesion was 48.5 years (ranging from 8 to 81 years) and the most frequently affected site in our sample was the minor salivary gland, followed by the parotid gland. Considering the immunohistochemistry results, AQP1 was not expressed in the mucoepidermoid carcinoma, being expressed in the wall of the blood vessels that permeate the tumor. Aquaporin AQP3 was expressed in epidermoid and mucous cells in 85.7% of mucoepidermoid carcinoma cases and AQP5 was expressed in mucous cells in 60.0% of mucoepidermoid carcinoma cases. There was no association

between the expression of the proteins and the demographic, clinical, pathological or association of the expression of the aquaporins with each other. Regarding survival analysis, it was observed that absence of vascular invasion and absence of relapse were associated with better overall survival rates. Although not statistically significant, our results suggest that patients with absence of AQP3 expression and presence of AQP5 expression have a better overall survival. In general, our study presented original results on the expression of aquaporins in mucoepidermoid carcinoma. The expression of aquaporins appears to be associated with the development/progression of mucoepidermoid carcinoma, where it is suggested that AQP1 might contribute to the supply of essential nutrients to support tumor growth, AQP3 might act on tumor metabolism, providing energy by uptake of glycerol and consequently, cell division and proliferation, and AQP5 might be involved in the process of cell differentiation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura das Aquaporinas; representação esquemática da estrutura das aquaporinas.....	3
Figura 2	Aspectos histológicos do carcinoma mucoepidermóide	19
Figura 3	Expressão das aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide	23
Figura 4	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com presença ou ausência de invasão vascular	28
Figura 5	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com ou sem recidiva.....	29
Figura 6	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para linfonodo comprometido.....	30
Figura 7	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com ou sem metástase.....	31
Figura 8	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com diferentes graus histológicos	32
Figura 9	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para a expressão da proteína AQP3.....	33
Figura 10	Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para a expressão da proteína AQP5.....	34

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Expressão de Aquaporinas nas Glândulas Salivares	5
Quadro 2	Expressão das aquaporinas em diferentes tipos tumorais	7
Quadro 3	Expressão das aquaporinas em tumores de Glândulas Salivares.....	12
Quadro 4	Anticorpos primários, clones e procedência	17
Tabela 1	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide.....	21
Tabela 2	Imunoexpressão das proteínas aquaporinas em amostras de carcinoma mucoepidermóide	24
Tabela 3	Associação da expressão da proteína AQP3 com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide	25
Tabela 4	Associação da expressão da proteína AQP5 com características demográficas, clínicas, e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide	26
Tabela 5	Taxas de sobrevida global (SG) em pacientes com carcinoma mucoepidermóide.....	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AQP	Aquaporina
AQP0	Aquaporina 0
AQP1	Aquaporina 1
AQP2	Aquaporina 2
AQP3	Aquaporina 3
AQP4	Aquaporina 4
AQP5	Aquaporina 5
AQP6	Aquaporina 6
AQP7	Aquaporina 7
AQP8	Aquaporina 8
AQP9	Aquaporina 9
AQP10	Aquaporina 10
AQP11	Aquaporina 11
AQP12	Aquaporina 12
AQPs	Aquaporinas
CAC	Carcinoma Adenoide Cístico
CCR	Câncer Colorretal
CEA	Antígeno carcinoembrionário
CEC	Carcinoma epidermóide
DAB	Diaminobenzidina
HCC	Carcinoma Hepatocelular
KDa	Kilodalton
MEC	Carcinoma Mucoepidermóide
MIPs	Major Intrinsic Protein
NPA	Asparagina-Prolina-Alanina
SCC	Carcinoma de células Escamosas

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Aquaporinas.....	1
1.2	Tumores de Glândula Salivar	8
1.2.1	Carcinoma Mucoepidermóide (MEC)	9
1.3	Justificativa	13
2	OBJETIVOS	14
2.1	Objetivo Geral.....	14
2.2	Objetivos Específicos	14
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	15
3.1	Casuística.....	15
3.2	Imunoistoquímica	16
3.3	Análise Estatística	17
4	RESULTADOS.....	18
4.1	Casuística.....	18
4.1.1	Dados Demográficos, Clínicos e Patológicos	20
4.2	Imunoistoquímica	22
4.3	Análise Estatística	24
5	DISCUSSÃO	35
6	CONCLUSÃO	45
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	46

ANEXOS

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

Anexo 2 Características demográficas, clínicas e patológicas dos
pacientes com carcinoma mucoepidermóide de glândula
salivar

1 INTRODUÇÃO

1.1 AQUAPORINAS

Aquaporinas (AQPs) pertencem a uma família de 13 canais de proteínas integrais de membrana, caracterizadas por sua permeabilidade à água transcelular e que apresentam regulação precisa nesse transporte sendo fundamentais na fisiologia do organismo (AGRE et al. 1993; AGRE 2004; VERKMAN 2005). As membranas celulares são compostas de bicamadas lipídicas e, portanto, são quase impermeáveis à água. No entanto, muitos processos dependem criticamente da eficiente troca de água entre a célula e seu ambiente. As aquaporinas permitem a penetração passiva eficiente de moléculas de água através das membranas celulares em todos os tecidos, para as quais o balanço hídrico é crucial (GROOT e GRUBMULLER 2005).

Os canais de água ou aquaporinas são amplamente expressos nas membranas dos epitélios transportadores de fluidos (GRESZ et al. 2001), e estão distribuídas em vários tecidos, localizados em sua maioria no epitélio, endotélio e células especializadas como eritrócitos, astrócitos, adipócitos (VERKMAN 2012; TOMITA et al. 2017).

A família AQP foi inicialmente dividida em duas subfamílias com base na sua estrutura proteica e características de permeabilidade: AQPs clássicas: permeáveis a água, mas também aos íons e gases (AQP0, AQP1,

AQP2, AQP4, AQP5, AQP6, AQP8) e aquagliceroporinas: canal de glicerol e outros solutos além da água (AQP3, AQP7, AQP9, AQP10). Posteriormente foi descrita uma terceira subdivisão, denominada como AQPs não-clássicas ou superaquaporinas, de permeabilidade incerta para água ou glicerol (AQP11, AQP12) (KRANE et al. 2007; KOZONO et al. 2002; AGRE 2004; DELPORTE e STEINFELD 2006; HARA-CHIKUMA e VERKMAN 2006; YOOL 2007; ROJEC et al. 2008; MUSA-AZIZ et al. 2009; DELPORTE et al. 2016). A sinalização específica da permeabilidade dos poros da membrana para cada aquaporina ainda permanece a esclarecer: sugeriu-se que algumas aquaporinas assegurem a regulação da permeabilidade de membrana através da influência do pH, regulação hormonal e mudanças na conformação dos poros das AQPs (GONEN e WALZ 2006; DE PAULA et al. 2017).

As aquaporinas formam um homotetrâmero, onde cada monômero apresenta seis domínios transmembrânicos (hélices α , M1, M2, M4-M6, M8), duas meias-hélices (M3 e M7) e cinco voltas intracelulares (laços de conexão, *loops* A-E), sendo que as voltas B e E (meias hélices M3 e M7) apresentam um domínio Asn-Pro-Ala (NPA-asparagina-prolina-alanina) que está incorporado na membrana lipídica, formando um poro aquoso, que contém cadeias laterais polares de asparagina viradas para dentro. Os motivos NPA atuam como doadores e receptores de hidrogênio e coordenam o transporte de água (ou glicerol para as aquagliceroporinas) através do poro (FU et al. 2000; SUI et al. 2001). Os domínios N- e carboxi-terminal estão localizados no citoplasma. Cada aquaporina apresenta uma

cadeia única de 270 aminoácidos e pesa cerca de 30 kDa (KRUSE et al. 2006; VERKMAN et al. 2014). Cada monômero de AQP apresenta um acesso extracelular e citoplasmático contendo superfícies hidrofílicas e hidrofóbicas, como demonstrado na Figura 1 (SUI et al. 2001).

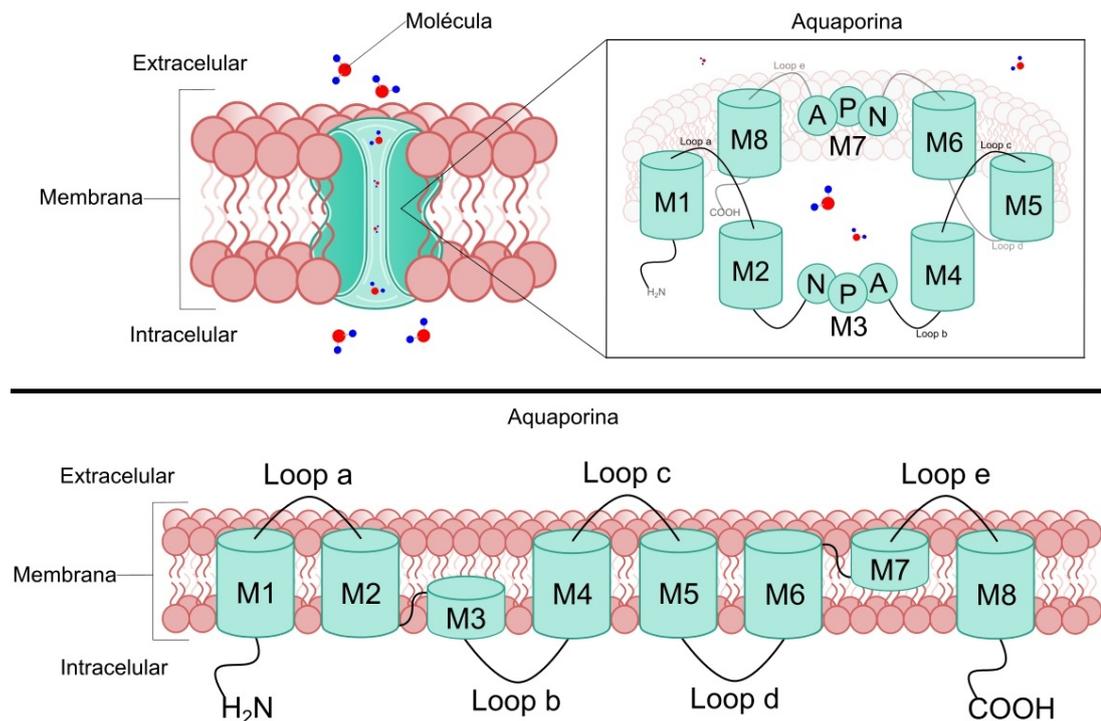


Figura 1 - Representação esquemática da estrutura das aquaporinas. As aquaporinas são canais iônicos e de água responsáveis pela manutenção iônica e de osmolaridade. São compostas por 6 domínios transmembranares, três alças extracelulares que garantem a interface com outras proteínas e a formação do poro funcional, o domínio NPA, situado entre as alças B e E, desempenhando um papel crucial na seletividade e exclusão de íons. A porção N terminal serve como resposta a osmolaridade externa. A porção C terminal, localizada no domínio 6, define as diferentes funções de cada aquaporina.

As aquaporinas regulam diversas funções celulares, incluindo osmolaridade, metabolismo energético, migração, adesão, proliferação, diferenciação, organogênese, regeneração e vascularização (AGRE et al. 1998; HARA-CHIKUMA e VERKMAN 2006, 2008; ROJEK et al. 2008; VERKMAN et al. 2008; ISHIBASHI et al. 2009; VERKMAN 2009; DAY et al. 2014). Desempenham um papel importante em estruturas tubulares devido a sua função na reabsorção de água e no transporte de fluido transepitelial. São encontradas no trato urinário, respiratório, digestivo, sistema nervoso, cardiovascular, tegumentar, reprodutivo e musculoesquelético (VERKMAN 2012; DAY et al. 2014). Seu papel já está bem estabelecido nas estruturas tubulares dos rins e vem sendo investigada no transporte de fluido em diversas glândulas como: mamária, sudorípara, lacrimal, salivar e pâncreas (TRADTRANTIP et al. 2009).

As glândulas salivares são glândulas exócrinas responsáveis pela produção de saliva. São divididas em glândulas salivares maiores: parótida, submandibular e sublingual (responsáveis por 90% da secreção da saliva) e pelas glândulas salivares menores distribuídas no interior da cavidade oral. Sua estrutura é constituída por ácinos (seroso e mucoso) e ductos (intercalar, estriado e excretor) (HOLMBERG e HOFFMAN 2014). As aquaporinas vêm sendo estudadas nas glândulas salivares, por estarem relacionadas a produção e distribuição da saliva (DELPORTE et al. 2016). A localização das aquaporinas nas glândulas salivares tem sido descrita em literatura, como demonstrado resumidamente no Quadro 1.

Quadro 1 - Expressão de aquaporinas nas glândulas salivares

Aquaporina	Glândula salivar humana	Glândula salivar de camundongos/ratos	Referência
1	Células acinares, endoteliais e mioepiteliais	Células mioepiteliais e endoteliais	GRESZ et al. 2001; WANG et al. 2003; MOBASHERI e MARPLES 2004; DELPORTE 2014, DE PAULA et al. 2017
2	Não detectada	Não detectada	DELPORTE et al. 2016
3	Células acinares da membrana basolateral, e em células ductais	Membrana basolateral dos ácinos e nas células ductais	GRESZ et al. 2001; BEROUKAS et al. 2002; WANG et al. 2003; DELPORTE 2014 YAMAMURA et al 2018; NAKAMURA et al. 2013
4	mRNA detectado nas glândulas	Membrana basolateral dos ácinos e nas células ductais	GRESZ et al. 2001; WANG et al. 2003; NAKAMURA et al. 2013; AURE et al. 2014
5	Células acinares	Ductos intercalares	NIELSEN et al. 1997; GRESZ et al. 2001; STEINFELD et al. 2001; WANG et al. 2003
6	mRNA detectado nas glândulas	Células acinares	WANG et al. 2003; MATSUKI-FUKUSHIMA et al. 2013
8	Citoplasma dos ductos excretores	Células mioepiteliais e Membrana basolateral dos ácinos e das células ductais	(WELLNER et al. 2006; NAKAMURA et al. 2013; TZARTOS et a. 2017)
9	Não determinado	mRNA detectado nas glândulas	AURE et al. 2014; DELPORTE et al. 2016;
11	Não determinado	Nas células ductais	LARSEN et al. 2011; AURE et al. 2014

Estudos sugerem que a expressão de aquaporinas possa apresentar um papel importante no desenvolvimento tumoral (VERKMAN et al. 2008; RIBATTI et al. 2014; PAPADOPOULOS e SAADOUN 2015; XIA et al. 2017). O papel biológico das aquaporinas nos tumores envolve a expansão tumoral devido ao edema, migração de células tumorais, proliferação tumoral e estímulo à angiogênese (PAPADOPOULOS e SAADOUN 2015).

O rápido fluxo de água através da membrana plasmática é conduzido por mudanças na osmolalidade produzida pelo fluxo de íons

transmembranares e despolimerização da actina. Isso explicaria a migração celular pelas aquaporinas. Uma segunda explicação seria que as células que migram através do espaço extracelular de forma irregular sofrem mudanças rápidas em seu volume, acompanhadas de mudanças rápidas nos fluxos de água transmembrana (PAPADOPOULOS et al. 2008).

Desta forma, a migração celular facilitada por AQP para diferentes tipos de células sugere que a sua expressão em células tumorais pode aumentar a invasão tumoral local e a capacidade metastática das células tumorais através da transposição de barreiras endoteliais microvasculares (HU e VERKMAN 2006) sugerindo a inibição de AQP como uma nova terapia antitumoral (VERKMAN et al. 2008).

Diversos estudos têm demonstrado a expressão de aquaporinas em diferentes tipos tumorais (VERKMAN et al. 2008; RIBATTI et al. 2014; PAPADOPOULOS e SAADOUN 2015; XIA et al. 2017). (Quadro 2). Contudo, em tumores de glândula salivar, a expressão das aquaporinas ainda não está esclarecida.

Quadro 2 - Expressão das aquaporinas em diferentes tipos tumorais

TUMOR	AQUAPORINAS							REFERÊNCIA
	1	3	4	5	7	8	9	
Mama	X	X	X	X				JUNG et al. 2011; SHI et al. 2012; LEE et al. 2014; WANG et al. 2015; SATOOKA e HARA CHIKUMA 2016
Colangiocarcinoma	X							LI et al. 2017
Colorretal	X	X		X		X		MOON et al. 2003; KANG et al. 2008; WANG et al. 2012; YOSHIDA et al. 2013;
Colo do útero	X	X		X				CHEN R et al. 2014; ZHANG et al. 2012
Cérebro	X		X	X			X	SAADOUN et al. 2002; MCCOY e SONTHEIMER 2007; FOSSDAL et al. 2012; MAUGERI et al. 2016
Hemangioblastoma	X							CHEN et al. 2006
Próstata	X							PARK e YOON 2017
Leucemia				X				CHAE et al. 2008a
Fígado		X		X		X	X	GUO et al. 2013; JABLONSKI et al. 2007
Pulmão	X	X		X				YUN et al. 2016; HOU et al. 2016; JO et al. 2016
Meningeoma			X					WANG et al. 2011
Nasofaringe		X		X				LIU et al. 2013
Ovário	X	X		X	X		X	YANG et al. 2011a e b
Pele		X						NIU et al. 2012
Gástrico			X	X				WATANABE et al. 2009; CHEN J et al. 2014
Tireóide		X	X		X			NIU et al. 2012
Língua		X		X				ISHIMOTO et al. 2012
Pâncreas	X	X	X	X		X		DELPORTE 2014
Glândula Salivar	X	X		X				NIU et al. 2012; ISHIMOTO et al. 2012; SHAO et al. 2011; TAN et al. 2014

1.2 TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo e amplo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso levando a dificuldades para uma classificação universal e para o diagnóstico de algumas neoplasias (VASCONCELOS et al. 2016; GOEL et al. 2017; BADLANI et al. 2018).

Os tumores de glândula salivar são classificados em benignos (adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais, tumor de Warthin, entre outros) e malignos (carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide-cístico, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, adenocarcinoma de células basais, carcinoma de células acinares, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, carcinoma mioepitelial, entre outros) e correspondem a cerca de 3% dos tumores de cabeça e pescoço (LOYOLA et al. 1995; LIMA et al. 2005; VASCONCELOS et al. 2016).

As glândulas salivares maiores representam os sítios anatômicos mais comumente afetados pelas neoplasias salivares, sejam elas de caráter benigno ou maligno, especialmente a glândula parótida (64-80%) (RAPIDIS et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2009), e quando acometem as glândulas salivares menores, o palato é o sítio mais comum (DOSSANI et al. 2014; GOEL et al. 2017), seguido da glândula submandibular, enquanto que as glândulas sublinguais são as menos acometidas (HOCWALD et al. 2001; OLIVEIRA et al. 2009). As neoplasias malignas correspondem a 23% das neoplasias salivares e, geralmente, surgem a partir da sexta e sétima

década de vida, principalmente no sexo feminino (VARGAS et al. 2002; LIMA et al. 2005).

O tratamento para os tumores de glândula salivar consiste em remoção cirúrgica na grande maioria dos casos. Radioterapia pós-operatória tem sido utilizada para melhorar o controle local da doença e aumentar as taxas de sobrevida para pacientes com tumores de alto grau, com margens cirúrgicas positivas ou com infiltração perineural. O papel da quimioterapia como tratamento para estes tumores é limitado e os resultados controversos (HOCWALD et al. 2001; MILANO et al. 2007; ANDRY et al. 2012; GOEL et al. 2017).

1.2.1 Carcinoma mucoepidermóide (MEC)

O carcinoma mucoepidermóide (MEC) é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares, compreendendo aproximadamente 10-15% de todas as neoplasias de glândulas salivares e cerca de 30% dos tumores malignos (SPEIGHT e BARRET 2002; GOEL et al. 2017). Esse tumor deriva do ducto excretor das glândulas salivares e é composto por células mucosas, intermediárias e epidermóides em combinações variadas. Os locais anatômicos mais acometidos pelo MEC são: glândula parótida (80%), glândula submandibular (13%) e glândula sublingual (3%) (BRANDWEIN et al. 2001; MCHUGH et al. 2012; COCA-PELAZ et al. 2015).

O grau histológico é de importância prognóstica e baseia-se na formação arquitetural, características citológicas, presença de invasão

perineural e presença de necrose (GOODE et al. 1998; BRANDWEIN et al. 2001) e pode ser classificado em:

- Carcinoma mucoepidermóide de baixo grau
- Carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário
- Carcinoma mucoepidermóide de alto grau (GOODE et al. 1998; BRANDWEIN et al. 2001).

O **Carcinoma Mucoepidermóide de baixo grau** sugere uma expectativa clínica de baixo risco, e, quase sempre, é tratado apenas pela cirurgia, sendo a metástase linfonodal rara (SEETHALA 2009). A taxa de sobrevida global em 5 anos é de 90 a 100% (GOODE et al. 1998; RAPIDIS et al. 2007).

Os tumores de baixo grau geralmente desenvolvem um padrão de células escamosas bem circunscritas, contendo numerosas células claras, algumas das quais contêm mucina intracitoplasmática e presença de espaços císticos. Atipia nuclear, atividade mitótica, infiltração e padrão de crescimento não são características de tumores de baixo grau (BRANDWEIN et al. 2001).

O **Carcinoma Mucoepidermóide de grau intermediário** apresenta um padrão menos cístico, com formas grandes, mais irregulares e folhas de células escamosas e, muitas vezes, tem uma população de células intermediárias mais proeminentes, um menor grau de atipia nuclear e atividade mitótica pode estar presente e um componente infiltrativo pode ser notado (BRANDWEIN et al. 2001). Devido ao comportamento biológico incerto, torna-se difícil o estabelecimento de um protocolo de tratamento,

sugerindo-se que seja tratado como um carcinoma de alto grau (ARO et al. 2008).

O Carcinoma Mucoepidermóide de alto grau é predominantemente sólido, com graus de atipia semelhante ao carcinoma de células escamosas. São tumores infiltrativos com escassa produção de mucina (BRANDWEIN et al. 2001).

Os carcinomas de alto grau necessitam de tratamento adjuvante e dissecação do pescoço por sua agressividade ou quando a margem cirúrgica é incerta e/ou com linfonodo positivo (BRANDWEIN et al. 2001). Apresenta uma sobrevida de 3 meses a 2 anos (HICKS e FLAITZ 2000; RAPIDIS et al. 2007). Metástase em linfonodo é comum no MEC de alto grau e está associada a um pior prognóstico (CHEN et al. 2013).

A diversidade morfológica e a raridade dos tumores de glândula salivar são um grande desafio para os patologistas, sendo o diagnóstico baseado na coloração HE (hematoxilina-eosina), o padrão ouro utilizado na patologia das glândulas salivares (SPEIGHT e BARRET 2002). No auxílio ao diagnóstico entre lesões benignas, baixo grau ou alto grau histológico de malignidade, têm sido usada a técnica de imunistoquímica (LUUKKAA et al. 2006; SCHNEIDER et al. 2014). Recentes estudos mostram que Ki-67, beta catenina, ciclina A e CEA, tem um potencial para distinguir a lesão benigna da maligna (NAGAO et al. 1998; LUUKKAA et al. 2006, SCHNEIDER et al. 2014). O MEC também expressa uma proporção variável de mucinas, sendo essa expressão associada ao grau histológico, recorrência e metástase (ALOS et al. 2005).

Considerando a expressão das aquaporinas, poucos estudos têm abordado esse tópico nos tumores de glândula salivar (Quadro 3).

Quadro 3 - Expressão das aquaporinas em tumores de glândulas salivares

Tipo de tumor	AQP	Referência
Carcinoma adenoide cístico	3 e 5	ISHIMOTO et al. 2012
	1	SHAO et al. 2011
	1	TAN et al. 2014
	3	NIU et al. 2012
Carcinoma Mucoepidermóide	3	NIU et al. 2012
Carcinoma de Células Acinares	3	NIU et al. 2012
Carcinoma Ductal	3	NIU et al. 2012
Adenoma Pleomórfico	3	NIU et al. 2012
Tumor de Warthin	3	NIU et al. 2012

ISHIMOTO et al. (2012), estudaram a expressão de AQP3 e AQP5 no carcinoma epidermoide de língua e no carcinoma adenoide cístico e observaram superexpressão no carcinoma epidermoide e ausência de expressão carcinoma adenoide cístico. TAN et al. (2014), avaliando o carcinoma adenoide cístico, observaram superexpressão do mRNA de AQP1. NIU et al. (2012), avaliaram a expressão de AQP3 em diversos tecidos neoplásicos, incluindo os tumores de glândulas salivares: adenoma pleomórfico, tumor de Warthin, carcinoma ductal, carcinoma de células acinares, carcinoma mucoepidermóide (MEC) e carcinoma adenoide cístico observando positividade dessa aquaporina nesses tipos tumorais.

1.3 JUSTIFICATIVA

O carcinoma mucoepidermóide é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares. O grau histológico e o sítio anatômico são de importância prognóstica e terapêutica, sendo a ocorrência de metástase um indicador de mau prognóstico. As aquaporinas, além de seu papel no transporte de água e solutos, também são associadas aos processos de migração celular, angiogênese, regeneração tecidual e cicatrização de feridas. Recentes estudos têm demonstrado expressão alterada das aquaporinas em diversos tumores. Contudo, poucos estudos têm avaliado o papel das aquaporinas no desenvolvimento/progressão dos tumores de glândula salivar. Assim, a identificação de um perfil de expressão de aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide e associação com características demográficas, clínicas e patológicas poderiam não só proporcionar um melhor entendimento das bases moleculares destas lesões como também fornecer evidências para a determinação de fatores prognósticos para esses tumores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da expressão de aquaporinas em amostras de carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Avaliar a expressão das aquaporinas AQP1, AQP3 e AQP5 em amostras de carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar.

- ✓ Associar a expressão das aquaporinas com as características demográficas, clínicas e patológicas.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo retrospectivo, onde foram selecionadas 24 amostras de carcinoma mucoepidermóide e 3 amostras de glândulas salivar histologicamente normais provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do A.C.Camargo Cancer Center. Todos os espécimes utilizados neste estudo foram provenientes de pacientes submetidos à cirurgia no A.C.Camargo Cancer Center no período de 1985 a 2004. Foram incluídos neste estudo os casos que apresentaram blocos de parafina com material satisfatório no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica e com confirmação do diagnóstico revista por um patologista. Foram excluídos pacientes que foram submetidos a tratamento prévio. Dados demográficos, clínicos e patológicos de cada caso foram estudados nos prontuários arquivados no SAME do A.C.Camargo Cancer Center.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center em 19 de setembro de 2017 (protocolo n° 2433/17) (Anexo 1).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Os blocos de parafina dos casos selecionados para a análise de expressão de aquaporinas foram separados e cortes histológicos desse material, com 3µm de espessura foram utilizados para a realização da técnica de imunoistoquímica.

Os espécimes preparados foram desparafinizados em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi re-hidratado em etanol e água e os espécimes lavados em água.

A recuperação antigênica foi realizada de acordo com a padronização de cada anticorpo primário conforme descrição no Quadro 4. Seguiu-se com o bloqueio da peroxidase endógena em solução de peróxido de hidrogênio (3 banhos de 5 minutos) e em seguida foi feito o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *Protein Block* (Spinger) por 30 minutos. Os espécimes foram então incubados por 16 horas a 4°C com o anticorpo específico.

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 foi realizada 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 semiquantitativa.

Na análise semi-quantitativa foi considerado o seguinte escore, baseado no número de células e intensidade de marcação: 0, negativo (quando até 10% das células estão marcadas); 1, positivo (mais de 10% das células marcadas) (Adaptado de CHAE et al. 2008b). Na análise descritiva foi avaliada a localização da marcação (núcleo, citoplasma, membrana) e o padrão de marcação (difuso, focal).

Quadro 4 - Anticorpos primários, clones e procedência

Soro primário	Clone	Procedência	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
AQP1	1/22	Abcam	1:1000	Citrato pH 6,0, panela de pressão 15'	Pâncreas	Membrana
AQP3	Policlonal	Abcam	1:1000	Citrato pH 6,0, panela de pressão 15'	Rim	Membrana
AQP5	EPR3747	Abcam	1:1000	Citrato pH 6,0, panela de pressão 15'	Glândula salivar	Membrana

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de associação entre a expressão das proteínas e as características demográficas, clínicas e patológicas foi realizada por meio do teste qui-quadrado ou exato de Fisher quando apropriado. As curvas de sobrevida foram estimadas pelo método de Kaplan-Meier e a comparação entre as curvas foi avaliada pelo teste de log-rank. As análises foram realizadas utilizando-se o software SPSS e o nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes.

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram avaliadas 24 amostras de pacientes diagnosticados como carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar. Imagens histopatológicas representativas de alguns tumores selecionados podem ser observadas na Figura 2.

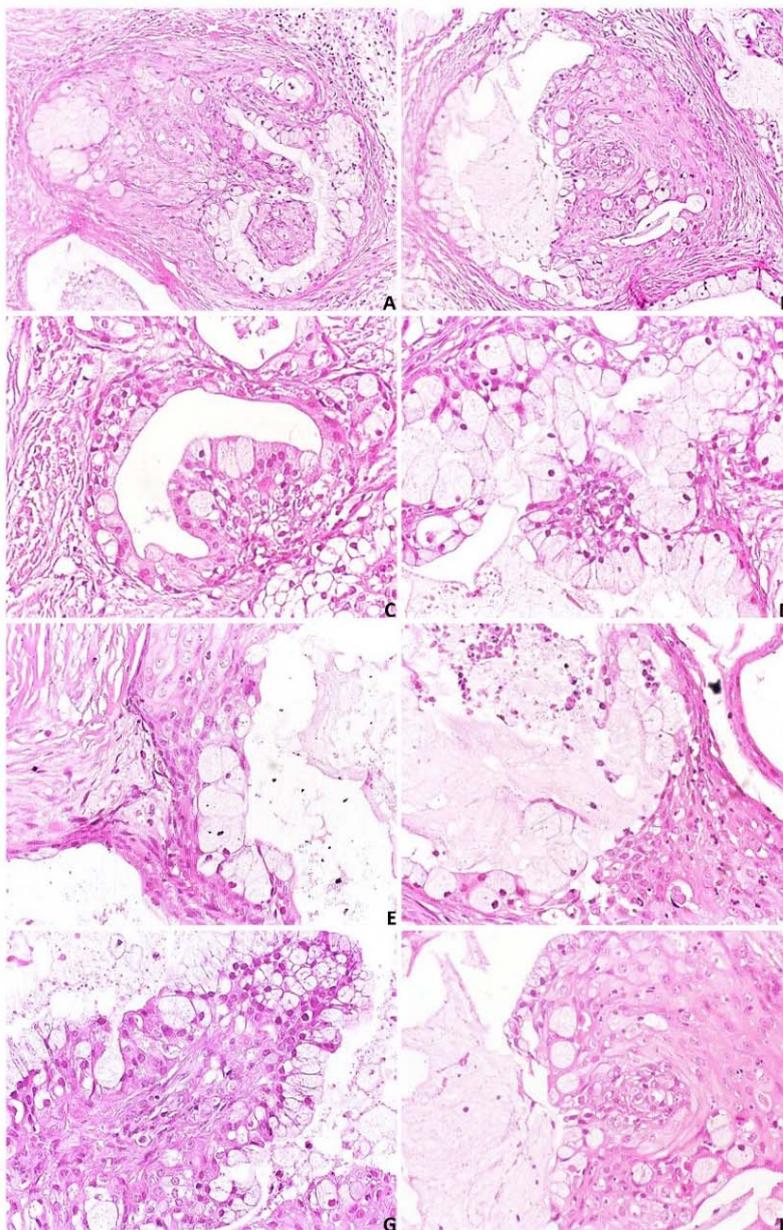


Figura 2 - Aspectos histológicos do carcinoma mucoepidermóide. A e B, carcinoma mucoepidermóide com os elementos clássicos: células mucosas, intermediárias e epidermóides (magnificação original x100 e x200, respectivamente); C, lago mucoso circundado por células mucosas (magnificação original x250); D, detalhe das células mucosas do carcinoma mucoepidermóide (magnificação original x 400); E e F, lago mucoso no carcinoma mucoepidermóide circundado por células mucosas, intermediárias e epidermóides (magnificação original x400); G e H, carcinoma mucoepidermóide com área predominantemente composta por células intermediárias e epidermóides (magnificação original x250 e x400, respectivamente).

4.1.1 Dados Demográficos, Clínicos e Patológicos

Os dados demográficos, clínicos e patológicos coletados estão descritos na Tabela 1. Os dados mostraram que dos 24 indivíduos com MEC 11 eram mulheres e 13 homens. A média de idade dos indivíduos acometidos por esta lesão foi de 45 anos (8-81 anos), sendo 41 anos (8-75 anos) no sexo masculino e 47 anos (14-81 anos) no sexo feminino. O local mais frequentemente acometido nessa casuística foi a glândula salivar menor, seguido pela parótida.

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide

Característica	Categoria	Número de pacientes (%)
Sexo	Masculino	13 (54,0)
	Feminino	11 (46,0)
Raça	Branca	22 (91,7)
	Não branca	2 (8,3)
Idade	Média*	45 anos
	Mediana*	48,5 anos
Localização	Parótida	9 (37,5)
	Sublingual	1 (4,2)
	Glândula salivar menor	14 (58,3)
Grau histológico	Alto	7 (29,2)
	Intermediário	4 (16,6)
	Baixo	12 (50,0)
	nd**	1 (4,2)
Embolização vascular	Sim	3 (12,5)
	Não	15 (62,5)
	nd	6 (25,0)
Infiltração perineural	Sim	6 (25,0)
	Não	13 (54,2)
	nd	5 (20,8)
Linfonodo comprometido	Sim	10 (41,7)
	Não	6 (25,0)
	nd	8 (33,3)
Recidiva	Sim	6 (25,0)
	Não	13 (54,2)
	nd	5 (20,8)
Metástase	Sim	5 (20,8)
	Não	14 (58,4)
	nd	5 (20,8)
Estado atual	Vivo	12 (50,0)
	Morto por câncer	8 (33,3)
	Morto por outras causas	3 (12,5)
	nd	1 (4,2)

* para a variável idade foi calculada a média e a mediana, não descrevendo a quantidade dos casos da casuística

** nd, informação não disponível

4.2 IMUNOISTOQUIMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas para as proteínas aquaporinas: AQP1 (21 amostras), AQP3 (21 amostras) e AQP5 (20 amostras).

A AQP1 não foi expressa no carcinoma mucoepidermóide, sendo expressa na parede dos vasos sanguíneos que permeavam o tumor. Na glândula salivar histologicamente normal a AQP1 também foi expressa nos vasos sanguíneos (Figura 3 e Tabela 2).

A AQP3 foi expressa, na membrana, nas células epidermóides e mucosas do carcinoma mucoepidermóide. Nas glândulas salivares histologicamente normais a AQP3 foi expressa nas células mioepiteliais e ductais (Figura 3 e Tabela 2).

A AQP5 foi expressa, na membrana, nas células mucosas do carcinoma mucoepidermóide. Nas glândulas salivares histologicamente normais a AQP5 foi expressa nas estruturas acinares (Figura 3 e Tabela 2).

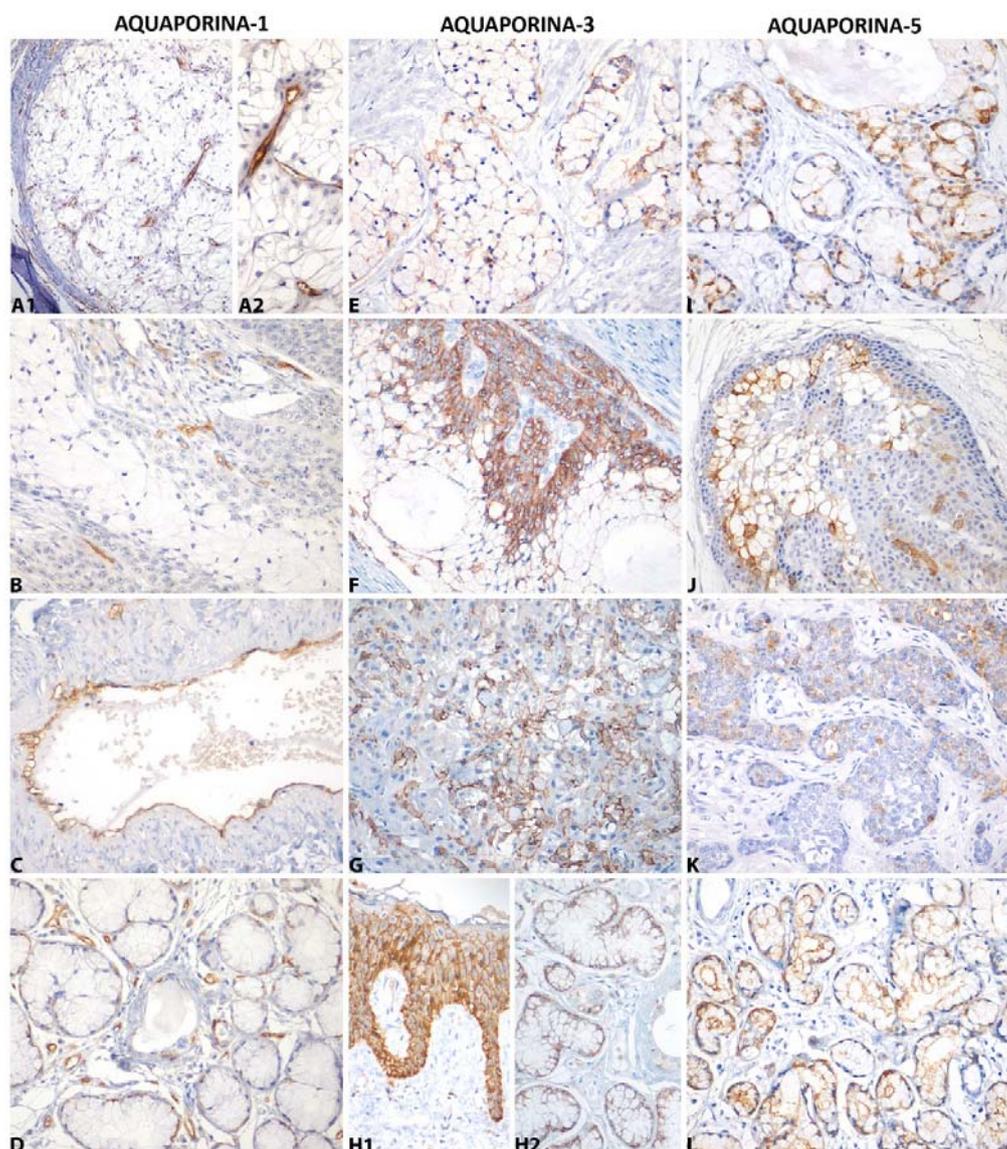


Figura 3 – Expressão das aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide. A, B, C, expressão da aquaporina-1 (AQP1) nas células endoteliais dos vasos sanguíneos que irrigam a neoplasia. A AQP1 não foi detectada no parênquima tumoral; D, glândula salivar normal: presença de AQP1 na complexa rede de vasos que irriga a glândula; E, F, G, Expressão da aquaporina-3 (AQP3) nas membranas das células mucosas, intermediárias e epidermóides da neoplasia; H1, expressão de AQP3 em todas as camadas do epitélio normal da mucosa oral; H2, expressão de AQP3 nas células mucosas dos ácinos na glândula salivar normal e algumas células ductais; I, J, K, Presença da aquaporina-5 (AQP5) nas células mucosas e em poucas células intermediárias do carcinoma mucoepidermóide; L, expressão de AQP5 nas membranas das células acinares na glândula salivar normal.

Tabela 2- Imunoexpressão das proteínas aquaporinas em amostras de carcinoma mucoepidermóide

Proteína	Positivo	Negativo	Total de amostras (Número/%)*
AQP1	0 (0,0)	21 (100,0)	21 (100,0)
AQP3	18 (85,7)	3 (14,3)	21 (100,0)
AQP5	12 (60,0)	8 (40,0)	20 (100,0)

*, o valor total de amostras pode variar de acordo com a disponibilidade de material para a realização da técnica de imunohistoquímica

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Considerando a proteína AQP1, não foi realizada análise estatística, pois não foi observada expressão dessa proteína nas células tumorais em nenhum dos casos.

Para as proteínas AQP3 e AQP5 não foi observada nenhuma associação estatisticamente significativa com as características demográficas, clínicas e patológicas (Tabelas 3 e 4).

Comparando-se a expressão das proteínas AQP3 e AQP5 entre si, também não foi observada associação estatisticamente significativa ($p > 0,999$).

Tabela 3 - Associação da expressão da proteína AQP3 com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide

Característica	Categoria	Expressão AQP3 (Número de casos/%)		Total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Sexo	Masculino	2 (18,2)	9 (81,8)	11 (100,0)	>0,999
	Feminino	1 (10,0)	9 (90,0)	10 (100,0)	
Raça	Branca	2 (10,0)	18 (90,0)	20 (100,0)	0,143
	Não branca	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
Idade*	<= 40 anos	1 (14,3)	6 (85,7)	7 (100,0)	>0,999
	> 40 anos	2 (14,3)	12 (85,7)	14 (100,0)	
Localização	Parótida	1 (16,6)	5 (83,4)	6 (100,0)	0,089
	Sublingual	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Glândula salivar menor	1 (7,2)	13 (92,8)	14 (100,0)	
Grau histológico	Alto	2 (28,6)	5 (71,4)	7 (100,0)	0,558
	Intermediário	0 (0,0)	4 (100,0)	4 (100,0)	
	Baixo	1 (11,1)	8 (88,9)	9 (100,0)	
Embolização vascular	Não	2 (14,3)	12 (85,7)	14 (100,0)	>0,999
	Sim	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Invasão perineural	Não	2 (16,6)	10 (83,4)	12 (100,0)	0,529
	Sim	0 (0,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	
Linfonodo comprometido	Não	1 (20,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	>0,999
	Sim	1 (10,0)	9 (90,0)	10 (100,0)	
Recidiva	Não	3 (27,3)	8 (72,7)	11 (100,0)	0,515
	Sim	0 (0,0)	6 (100,0)	6 (100,0)	
Metástase	Não	2 (16,7)	10 (83,3)	12 (100,0)	>0,999
	Sim	1 (20,0)	4 (80,0)	5 (100,0)	

* para fins de análise estatística a variável idade foi classificada em 2 categorias

Tabela 4 - Associação da expressão da proteína AQP5 com características demográficas, clínicas e patológicas em amostras de carcinoma mucoepidermóide

Característica	Categoria	Expressão AQP5 (Número de casos/%)		Total	Valor de p
		Negativo	Positivo		
Sexo	Masculino	6 (50,0)	6 (50,0)	12 (100,0)	0,373
	Feminino	2 (25,0)	6 (75,0)	8 (100,0)	
Raça	Branca	8 (42,1)	11 (57,9)	19 (100,0)	>0,999
	Não branca	0 (0,0)	1 (100,0)	1 (100,0)	
Idade*	<= 40 anos	2 (28,6)	5 (71,4)	7 (100,0)	0,642
	> 40 anos	6 (46,2)	7 (53,8)	13 (100,0)	
Localização	Parótida	3 (42,8)	4 (57,2)	7 (100,0)	>0,999
	Sublingual	1 (100,0)	0 (0,0)	1 (100,0)	
	Glândula salivar menor	5 (38,4)	8 (61,6)	13 (100,0)	
Grau histológico	Alto	3 (50,0)	3 (50,0)	6 (100,0)	0,850
	Intermediário	2 (50,0)	2 (50,0)	4 (100,0)	
	Baixo	3 (33,4)	6 (66,6)	9 (100,0)	
Embolização vascular	Não	6 (46,2)	7 (53,8)	13 (100,0)	0,250
	Sim	0 (0,0)	3 (100,0)	3 (100,0)	
Invasão perineural	Não	3 (27,3)	8 (72,7)	11 (100,0)	0,162
	Sim	4 (66,6)	2 (33,4)	6 (100,0)	
Linfonodo comprometido	Não	1 (25,0)	3 (75,0)	4 (100,0)	0,406
	Sim	5 (50,0)	5 (50,0)	10 (100,0)	
Recidiva	Não	3 (33,3)	6 (66,7)	9 (100,0)	>0,999
	Sim	2 (33,3)	4 (66,7)	6 (100,0)	
Metástase	Não	3 (30,0)	7 (70,0)	10 (100,0)	0,329
	Sim	3 (60,0)	2 (40,0)	5 (100,0)	

* para fins de análise estatística a variável idade foi classificada em 2 categorias

Considerando-se a análise de sobrevida, foi observado que ausência de invasão vascular e ausência de recidiva estavam associadas a melhores taxas de sobrevida global (Tabela 5; Figuras 4 e 5).

Tabela 5 - Taxas de sobrevida global (SG) em pacientes com carcinoma mucoepidermóide

Característica	Categoria	n	SG (5 anos) %
Sexo	Masculino	12	61,1
	Feminino	11	61,4
Raça	Branca	21	57,3
	Não branca	2	100,0
Idade*	<= 40 anos	8	83,3
	> 40 anos	15	50,3
Localização	Parótida	8	62,5
	Sublingual	1	100,0
	Glândula salivar menor	14	57,9
Grau histológico	Alto	7	42,9
	Intermediário	4	100,0
	Baixo	11	70,7
Embolização vascular	Não	15	69,2
	Sim	3	33,3
Invasão perineural	Não	13	64,8
	Sim	6	40,0
Linfonodo comprometido	Não	6	60,0
	Sim	10	41,7
Recidiva	Não	13	74,6
	Sim	6	16,7
Metástase	Não	14	68,8
	Sim	5	20,0
AQP3	Negativo	3	100,0
	Positivo	18	49,0
AQP5	Negativo	8	52,5
	Positivo	11	61,4

* para fins de análise estatística a variável idade foi classificada em 2 categorias

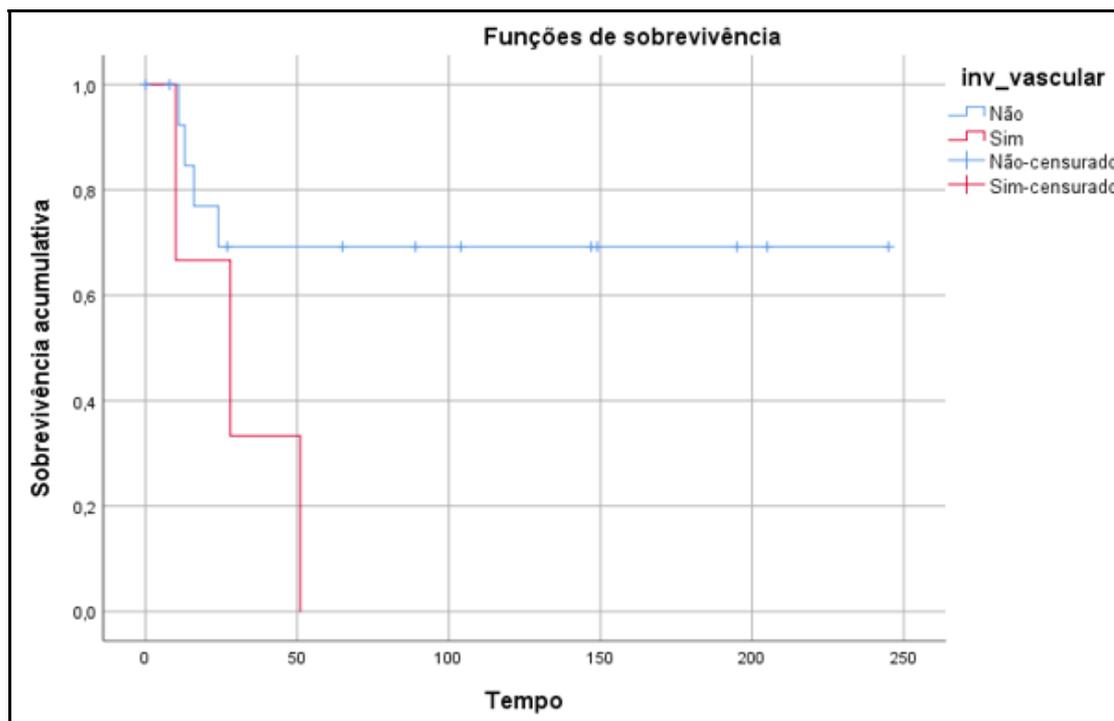


Figura 4 - Curva de sobrevivência em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com presença ou ausência de invasão vascular. A taxa de sobrevivência global em 5 anos foi de 69,2% para pacientes sem invasão vascular e 33,3% para pacientes com invasão vascular ($p= 0,047$).

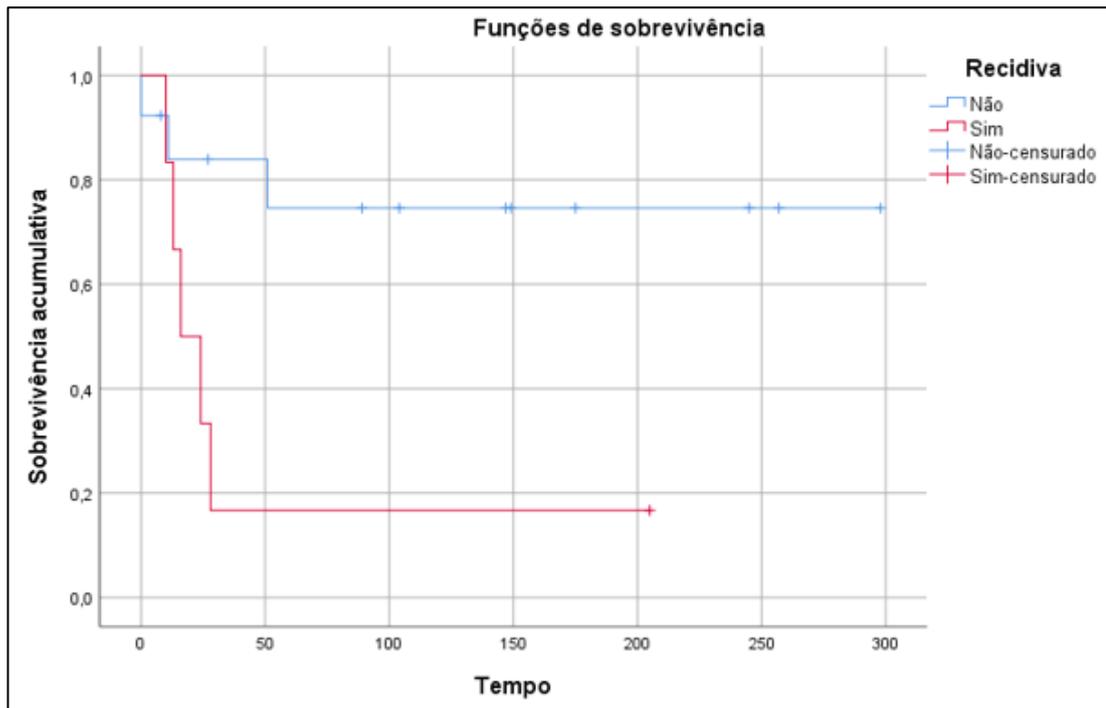


Figura 5 - Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com ou sem recidiva. A taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 74,6% para pacientes sem recidiva e 16,7% para pacientes com recidiva ($p= 0,018$).

Considerando a presença ou ausência de linfonodos comprometidos, ocorrência de metástase e diferentes graus histológicos, foi observada diferença nas taxas de sobrevida global dos pacientes. Contudo, esses resultados não apresentaram significância estatística ($p=0,479$, $p=0,073$ e $p=0,297$, respectivamente) (Tabela 5; Figuras 6, 7 e 8).

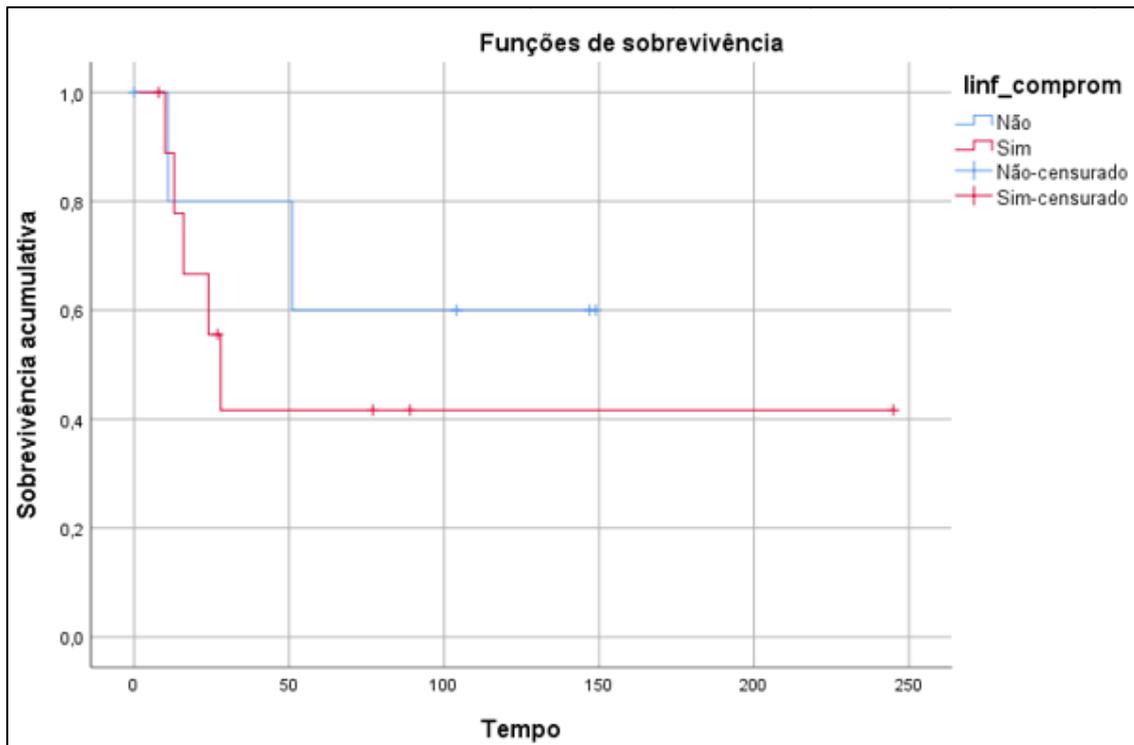


Figura 6 - Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para linfonodo comprometido. A taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 60,0% para pacientes sem linfonodos comprometidos e 41,7% para pacientes com linfonodos comprometidos ($p=0,479$).

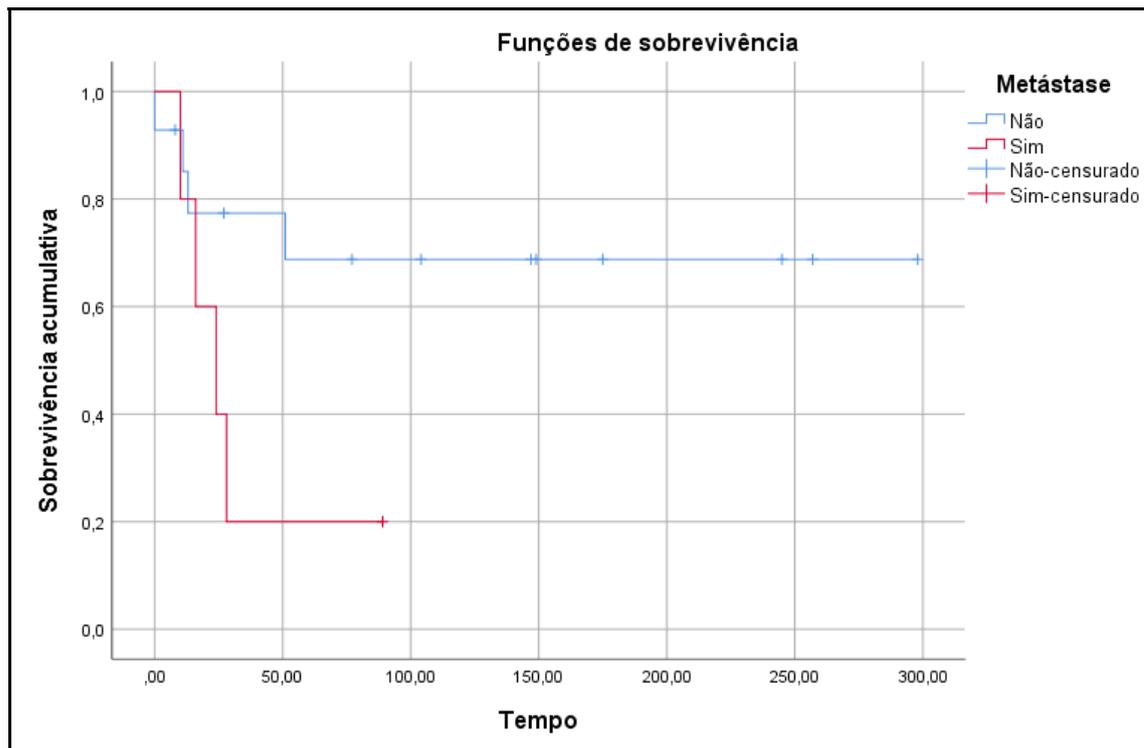
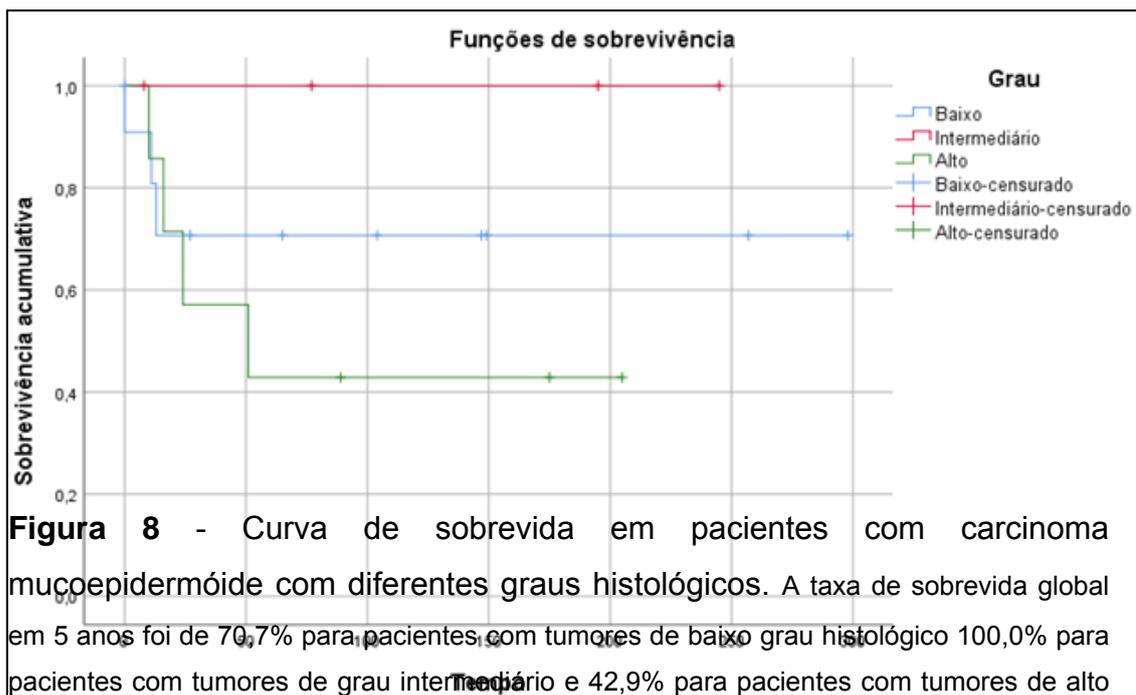


Figura 7 - Curva de sobrevivência em pacientes com carcinoma mucoepidermóide com ou sem metástase. A taxa de sobrevivência global em 5 anos foi de 68,8% para sem metástase e 20,0% para pacientes com metástase ($p=0,073$).



Considerando a proteína AQP3, foi observado que a taxa de sobrevida global em 5 anos foi 100,0% para pacientes sem expressão da proteína e 49,0% para pacientes com expressão da proteína. Contudo, esse resultado não apresenta significância estatística (p=0,153) (Tabela 5; Figura 9).

Com relação à proteína AQP5, foi observado que a taxa de sobrevida global em 5 anos foi 52,5% para pacientes sem expressão da proteína e 61,4% para pacientes com expressão da proteína. Contudo, esse resultado não apresenta significância estatística (p=0,574) (Tabela 5; Figura 10).

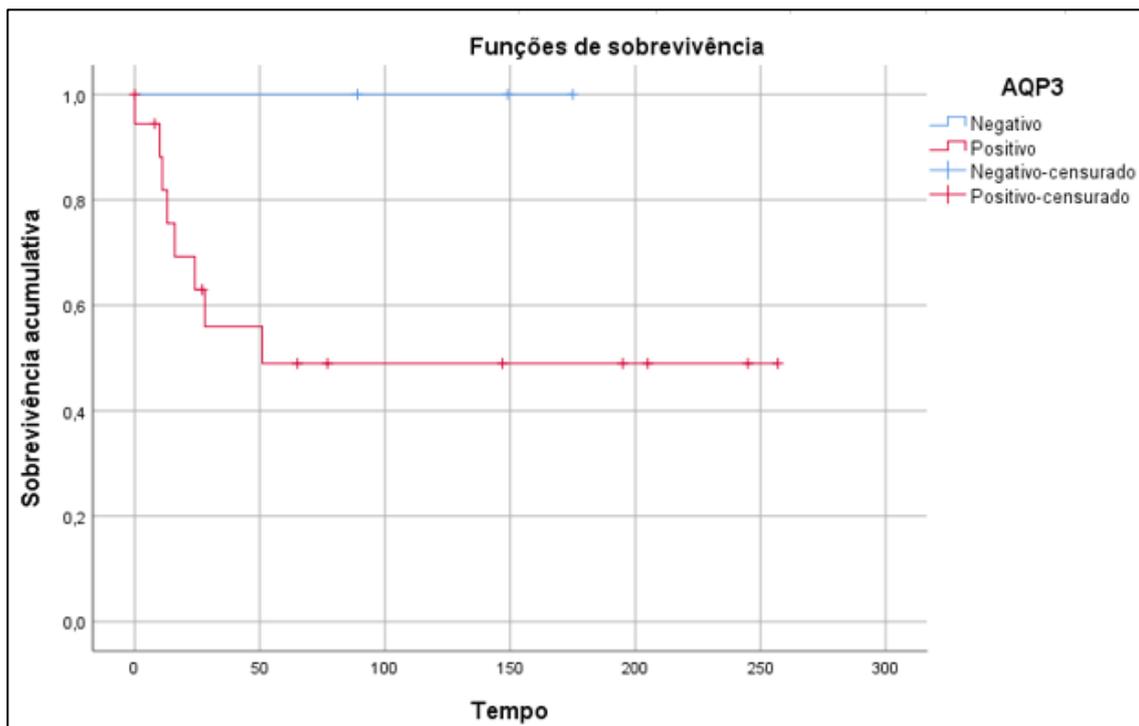


Figura 9 - Curva de sobrevida em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para a expressão da proteína AQP3. A taxa de sobrevida global em 5 anos foi de 100,0% para pacientes negativos para AQP3 e de 49,0% para pacientes positivos para AQP3 ($p=0,153$).

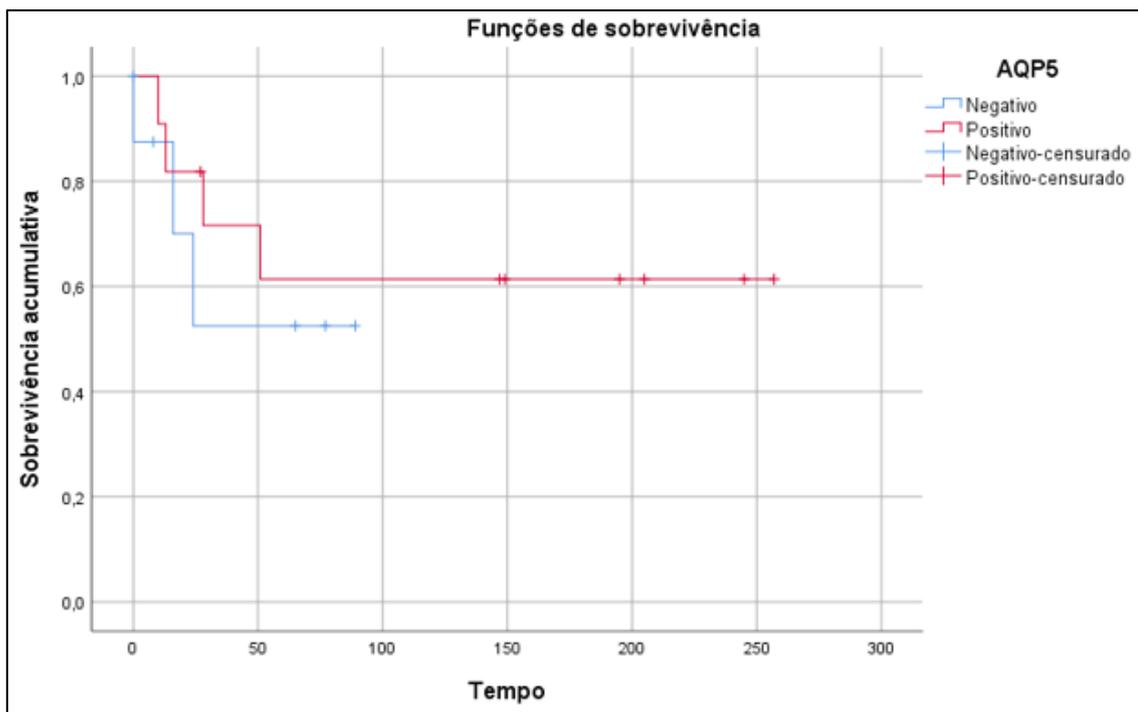


Figura 10 - Curva de sobrevivência em pacientes com carcinoma mucoepidermóide positivos ou negativos para a expressão da proteína AQP5. A taxa de sobrevivência global em 5 anos foi de 52,5% para pacientes negativos para AQP5 e de 61,4% para pacientes positivos para AQP5 ($p= 0,574$).

5 DISCUSSÃO

As aquaporinas (AQPs) são proteínas transmembrânicas envolvidas no controle do movimento de água transcelular e transepitelial, transporte de fluidos e migração celular. Seu papel tem sido estudado nas glândulas salivares humanas (GRESZ et al. 2001; DE PAULA et al. 2017) e alterações na sua função podem contribuir para a disfunção da glândula salivar observada na Síndrome de Sjögren primária, uma doença crônica autoimune que destrói as glândulas salivares, diminuindo o fluxo salivar (BEROUKAS et al. 2002; TZARTOS et al. 2017). Contudo, pouco se sabe sobre o papel das aquaporinas nos tumores malignos de glândula salivar (NIU et al. 2012; ISHIMOTO et al. 2012; TAN et al. 2014).

O carcinoma mucoepidermóide (MEC) é o tumor maligno mais comum das glândulas salivares. É composto por combinações de células mucosas, intermediárias e epidermóides (MCHUGH et al. 2012; COCAPELAZ et al. 2015). O diagnóstico do carcinoma mucoepidermóide representa um grande desafio devido à sua diversidade morfológica. O comportamento biológico incerto, diante da graduação histológica (baixo, intermediário e alto grau) também representa um desafio para a proposta terapêutica e que pode implicar na implementação de um tratamento agressivo para tumores que apresentariam um comportamento mais indolente (SEETHALA 2009; KATABI et al. 2014).

A determinação de quais aquaporinas estão presentes na glândula salivar normal é o primeiro passo para se compreender sua atividade no desenvolvimento de tumores. A localização das AQPs para os tipos de células da glândula é necessária para revelar sua relevância fisiológica (AURE et al. 2014). De uma forma geral, as AQPs 1, 3 e 5 estão presentes nas glândulas salivares e em todas as fases do desenvolvimento e podem estar relacionadas com a regulação do volume celular, transporte transepitelial, proliferação, morte celular durante o desenvolvimento das glândulas salivares (GRESZ et al. 2001; LARSEN et al. 2009; LARSEN et al. 2011; DE PAULA et al. 2017).

Em nosso estudo, a **AQP1** foi observada nas células endoteliais dos vasos que permeiam o carcinoma mucoepidermóide e na rede de vasos que irriga a glândula salivar histologicamente normal. DE PAULA et al. (2017) demonstraram a expressão de AQP1 nas células acinares, como também em capilares e supostas células mioepiteliais. Em contraste, outros estudos em glândulas humanas adultas, mostraram AQP1 em células mioepiteliais em torno de ácinos e ductos intercalares (GRESZ et al. 2001; BEROUKAS et al. 2002). A presença da AQP1 nas células endoteliais dos vasos sangüíneos e células mioepiteliais sugerem que a expressão de AQP1 possa ser importante para o transporte de água dos vasos sangüíneos para a glândula salivar, ajudando na formação do futuro fluido salivar (DE PAULA et al. 2017).

Tem havido um crescente reconhecimento de que os canais iônicos e os transportadores estão relacionados com a neovascularização através da

mediação da ativação, proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais (PREVARSKAYA et al. 2010; BECCHETTI 2011; TOMITA et al. 2017). A AQP1 pode desempenhar um papel importante na interface entre o microambiente tumoral e as células tumorais (TOMITA et al. 2017). CLAPP e ESCALERA (2006), propuseram que a permeabilidade aumentada dos vasos, facilitada pela AQP1, aumenta o transporte celular de água e inicia a cascata angiogênica, isso é suportado pelo fato que a inibição de AQP1 promove uma falha na angiogênese (NICO e RIBATTI 2010).

O aumento da expressão de AQP1 foi associada a pior prognóstico em câncer de mama (QIN et al. 2016), câncer de pulmão (WEI e DONG 2015; YUN et al. 2016), câncer de cólon (YOSHIDA et al. 2013) e câncer de próstata (PARK e YOON 2017). No carcinoma adenoide cístico (CAC), TAN et al. (2014) observaram hipometilação na região promotora do gene que codifica a AQP1 e hiperexpressão do RNA mensageiro. A hipermetilação de AQP1 está associada a melhor sobrevida. Contudo, a expressão de AQP1 não foi associada ao prognóstico dos pacientes. Em estudo prévio do mesmo grupo, foi demonstrado hiperexpressão de AQP1 também por imunistoquímica, sendo observada expressão forte e consistente de AQP1 em todas as amostras avaliadas. Também foi demonstrado que o silenciamento de AQP1 inibe o crescimento das células tumorais, sugerindo que AQP1 poderia representar um potencial alvo terapêutico (SHAO et al. 2011).

Em nosso estudo, a **AQP3** foi expressa nas células epidermóides e mucosas do carcinoma mucoepidermóide. Nas glândulas salivares

histologicamente normais a AQP3 foi expressa nas células mioepiteliais e ductais. Nas glândulas salivares em desenvolvimento, DE PAULA et al. (2017) observaram a expressão de AQP3 na membrana basolateral dos ácinos serosos e mucosos, onde desempenha um papel específico no desenvolvimento da glândula salivar e na secreção fluida. Essa expressão de AQP3 também é observada na fase adulta da glândula salivar (GRESZ et al. 2001; BEROUKAS et al. 2002; WANG et al. 2003; DELPORTE 2014). ICHIYAMA et al. (2018), também observaram expressão de AQP3 na membrana basolateral das células acinares e em células ductais em glândulas salivares menores.

Na literatura, não foi observada a expressão de AQP3 nas células mioepiteliais, somente expressão de AQP1 (GRESZ et al. 2001; BEROUKAS et al. 2002). Apesar da principal função da célula mioepitelial ser contrátil, argumenta-se que a alta permeabilidade da membrana à água poderia contribuir para que a presença das células mioepiteliais nos ácinos não constituam uma barreira para o fluxo de água nos espaços intercelulares laterais (GRESZ et al. 2001).

Estudos têm sugerido que expressão de AQP3 está associada aos processos de migração, proliferação e invasão no câncer (MARLAR et al. 2017). HARA-CHIKUMA e VERKMAN (2008a) observaram que a hiperexpressão de AQP3 facilita a proliferação celular em cultura de queratinócitos humanos. HUANG et al. (2017), demonstraram que a hiperexpressão de AQP3 pode promover o desenvolvimento do adenocarcinoma ductal de pâncreas. A hiperexpressão de AQP3 em

carcinoma epidermóide de esôfago foi associada à progressão do tumor e prognóstico (KUSAYAMA et al. 2011).

Em carcinoma oral de células escamosas (SCC), MATSUO e KAUANO (2014) demonstraram que a expressão de AQP3 é um fator prognóstico independente para metástase linfática. Nesse caso, a diminuição da expressão de AQP3 está associada a um comportamento mais agressivo do tumor, sugerindo que a AQP3 esteja associada ao processo de diferenciação celular e não proliferação celular. BREYER et al. (2017), demonstraram que a perda de AQP3 foi associada ao pior prognóstico em pacientes com carcinoma urotelial de bexiga.

No nosso estudo observamos que os pacientes sem expressão de AQP3 apresentaram uma melhor sobrevida. Contudo, esses resultados não apresentaram significância estatística. NIU et al. (2012) também observaram expressão de AQP3 em carcinoma mucoepidermóide e em outros tumores de glândula salivar, embora não tenham observado associação com características clínicas. Já ISHIMOTO et al. (2012), não observaram expressão de AQP3 no carcinoma adenoide cístico em contraste com NIU et al. (2012) que observaram positividade de AQP3 nesses tumores. Cabe ressaltar que o estudo de NIU et al. (2012) avaliaram somente 7 casos de carcinoma mucoepidermóide.

NIU et al. (2012) discutem que a maioria dos tumores com alta expressão de AQP3 também expressavam AQP3 nos tecidos normais, sugerindo que o metabolismo da água via AQP3 seria mantido durante o processo de transformação neoplásica na maioria dos tecidos humanos.

Dessa forma, AQP3 não representaria um marcador específico para neoplasias epiteliais benignas ou malignas, limitando assim, seu uso como marcador diagnóstico.

Em nosso estudo, a **AQP5** foi expressa nas células mucosas do carcinoma mucoepidermóide. Nas glândulas salivares histologicamente normais a AQP5 foi expressa nas estruturas acinares, corroborando os dados da literatura (GRESZ et al. 2001; NAKAMURA et al. 2013; DE PAULA et al. 2017).

A AQP5 é uma das principais aquaporinas encontradas nas glândulas salivares, desempenhando um papel fundamental para o desenvolvimento, homeostase e secreção salivar (DE PAULA et al. 2017; GRESZ et al. 2001). Estudo de SAPMAZ et al. (2016) em modelo animal demonstrou nível elevado de AQP5 em idade avançada, o que estaria associado com o envelhecimento da glândula salivar e a um mecanismo compensatório para aumentar a secreção salivar.

No câncer, a expressão de AQP5 parece estar relacionada com os processos de migração, proliferação e diferenciação celular. Hiperexpressão de AQP5 foi observada no carcinoma ductal de mama, em associação à ocorrência de metástases e pior prognóstico (JUNG et al. 2011; JENSEN et al. 2017). No câncer de pulmão, a hiperexpressão de AQP5 também foi relacionada a proliferação, migração e metástase (ZHANG et al. 2010), como também no câncer cervical (ZHANG et al. 2012), câncer de ovário (YANG et al. 2011a; YAN et al. 2014) e no carcinoma hepatocelular (HE et al. 2017). Resultados semelhantes foram encontrados no câncer colorretal

(KANG et al. 2008; WOO et al. 2008; WANG et al. 2012), onde a hiperexpressão de AQP5 foi associada à diferenciação, estágio tumoral e ocorrência de metástases.

Em contraste, SEKINE et al. (2012) demonstraram que a hiperexpressão de AQP5 nos carcinomas do trato biliar está associada a uma maior sobrevida em relação ao grupo com baixa expressão. No nosso estudo, também observamos uma tendência de melhor sobrevida para os pacientes com expressão de AQP5, embora esse resultado não seja estatisticamente significativo.

ISHIMOTO et al. (2012), observaram baixa expressão de AQP5 no carcinoma adenóide cístico (CAC) em comparação com glândulas sem neoplasia. No entanto foi observada hiperexpressão de AQP5 no carcinoma epidermóide (CEC) de língua, sugerindo que AQP5 possa apresentar diferentes funções no CAC e CEC.

Alguns estudos têm demonstrado pior prognóstico associado à alterações na expressão de mais de uma aquaporina. Hiperexpressão de AQP1 e AQP5 está associada à pior pronóstico em carcinomas de pulmão, tracto gastrointestinal, sarcomas de partes moles (MACHIDA et al. 2011; LEHNERDT et al. 2015; SHIMASAKI et al. 2017). LIU et al. (2013) observaram expressão de AQP3 e AQP5 no carcinoma epidermóide de esôfago associada à pior prognóstico. LEHNERDT et al. (2015) também observaram pior prognóstico associado à expressão de AQP1 e AQP5 no carcinoma de células epidermóides de faringe. No nosso estudo, não

observamos associação da expressão das aquaporinas no carcinoma mucoepidermóide.

As aquaporinas fazem parte de uma família com 13 membros, sendo a expressão dessas AQPs diferente nos diversos tecidos. Da mesma forma, tanto o aumento da expressão das aquaporinas (KUSAYAMA et al. 2011; WEI e DONG 2015; QIN et al. 2016; HUANG et al. 2017; JENSEN et al. 2017), assim como a diminuição da expressão (MATSUO e KAUANO 2014; BREYER et al. 2017;) tem sido associado a um pior prognóstico nos diferentes tumores. O papel das aquaporinas no câncer já vem sendo descrito, no entanto, o mecanismo exato de como elas agem ainda não está esclarecido. As aquaporinas geralmente potencializam os processos de invasão e metástase, atuando na angiogênese, adesão célula-célula e célula-matriz e o conhecimento sobre o envolvimento das aquaporinas nesses processos pode futuramente auxiliar no desenvolvimento de novas terapias para o câncer (MACHIDA et al. 2011; PAPADOPOULOS e SAADOUN 2015; WANG et al. 2015; ZHENG et al. 2016; HE et al. 2017; XIA et al. 2017; DE LESO e YOLL 2018). Outros estudos sugerem que as aquaporinas exerçam um efeito pró-diferenciação nas células tumorais, ou seja, a diminuição da expressão das aquaporinas estaria associada a tumores menos diferenciados e mais agressivos (BOLLAG et al. 2007; MATSUO e KAUANO 2014; RUBENWOLF et al. 2015). VOSS et al. (2011), demonstraram que a expressão AQP3 em carcinoma epidermóide de pele era irregular e que áreas com diminuição da imunorreatividade de AQP3 eram positivas para Ki-67.

Deve-se levar em consideração que a controvérsia na expressão das aquaporinas nos diferentes estudos pode ser explicada em parte pelos diferentes protocolos utilizados na literatura (anticorpos monoclonais x policlonais, clones diferentes, procedimento manual x procedimento automatizado, critérios de análise diferentes).

Nossos resultados sugerem que pacientes com ausência de expressão de AQP3 e presença de expressão de AQP5 apresentam uma melhor sobrevida global. Contudo, esses resultados não se mostraram estatisticamente significativos, provavelmente devido ao pequeno número de casos avaliados.

Em nosso estudo, observamos uma predominância dos tumores em glândulas salivares menores. Esse resultado pode ser explicado pelo fato dos casos terem sido coletados em uma única Instituição, representarem um pequeno número de amostras, e por se tratar de uma amostra de conveniência. Contudo, alguns estudos têm demonstrado incidência do carcinoma mucoepidermóide similar entre a parótida e glândulas salivares menores (OLIVEIRA et al. 2009; LIMA et al. 2005) enquanto outros apontam uma predominância da glândula parótida (MCHUGH et al. 2012).

Observamos também que a presença de recidiva e invasão vascular são fatores que estão associados à diminuição da taxa de sobrevida global em 5 anos dos pacientes. Nossos resultados também sugerem uma diminuição da taxa de sobrevida global em 5 anos dos pacientes com tumores com alto grau histológico, com presença de comprometimento de linfonodos e com presença de metástase, embora não sejam

estatisticamente significativos. Esses fatores clínicos e patológicos já foram demonstrados na literatura como fatores de pior prognóstico em pacientes com carcinoma mucoepidermóide (GUEVARA-CANALES et al. 2016; XU et al. 2017; GOEL et al. 2017).

No presente estudo não houve associação das proteínas AQP1, AQP3 e AQP5 com características demográficas, clínicas e patológicas do carcinoma mucoepidermóide. No entanto, podemos hipotetizar que a expressão das aquaporinas poderia estar envolvida no processo tumoral do carcinoma mucoepidermóide: por sua expressão nos vasos sanguíneos, AQP1 poderia contribuir para o fornecimento de nutrientes essenciais para sustentar o crescimento do tumor (CLAPP e ESCALERA 2006; NICO e RIBATTI 2010; TOMITA et al. 2017). AQP3 poderia atuar no metabolismo tumoral, fornecendo energia pela captação de glicerol, regulador chave do ATP celular, essencial para biossíntese celular e conseqüentemente, divisão e proliferação celular (HARA-CHIKUMA e VERKMAN 2008 a e b; DIREITO et al. 2016). Já a AQP5 no carcinoma mucoepidermoide poderia estar mais envolvida no processo de diferenciação celular.

De forma geral, nosso estudo apresentou resultados inéditos sobre a expressão de aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide. Contudo, a avaliação de outras proteínas dessa família torna-se importante, considerando que a expressão das aquaporinas possa estar associada ou mesmo a expressão de uma aquaporina pode compensar a ausência de outra. Estudos *in vitro* também são necessários para se avaliar o papel das aquaporinas no desenvolvimento do carcinoma mucoepidermóide.

6 CONCLUSÃO

- A expressão das aquaporinas AQP1, AQP3 e AQP5 foi observada nas amostras provenientes dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide: a AQP1 foi expressa na parede dos vasos que permeiam o tumor, a AQP3 foi expressa nas células epidermóides e mucosas do carcinoma mucoepidermóide e a AQP5 foi expressa nas células mucosas do carcinoma mucoepidermóide.
- Não foi observada associação da expressão das aquaporinas AQP3 e AQP5 com as características demográficas, clínicas e patológicas.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Agre P, Preston GM, Smith BL, et al. The archetypal molecular channel. **Am J Physiology - Renal Physiol** 1993; 265:463-76.

Agre P, Bonhivers M, Borgnia MJ. The aquaporins, blueprints for cellular plumbing systems. **J Biol Chem** 1998; 273:14659-62.

Agre P. Aquaporin water channels (Nobel Lecture). **Angew Chemistry Int Ed** 2004; 43:4278-90.

Alos L, Lujan B, Castillo M, Nadal A, et al. Expression of membrane-bound mucins (MUC1 and MUC4) and secreted mucins (MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 and MUC7) in mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. **Am J Surg Pathol** 2005; 29:806-13.

Andry G, Hamoir M, Locati LD, Licitra L, Langendijk JA. Management of salivary gland tumors. **Expert Rev Anticancer Ther** 2012; 12:1161-8.

Aro K, Leivo I, Mäkitie AA. Management and outcome of patients with mucoepidermoid carcinoma of major salivary gland origin: a single Institution's 30-year experience. **Laryngoscope** 2008; 118:259-62.

Aure MH, Ruus AK, Galtung HK. Aquaporins in the adult mouse submandibular and sublingual salivary glands. **J Mol Histol** 2014; 45:69-80.

Badlani J, Gupta R, Balasubramanian D, Smith JI, Luk P, Clark J. Primary salivary gland malignancies: a review of clinicopathological evolution, molecular mechanisms and management. **ANZ J Surg** 2018; 88:152-7.

Becchetti A. Ion channels and transporters in cancer. 1. Ion channels and cell proliferation in cancer. **Am J Physiol Cell Physiol** 2011; 301:C255–C65.

Beroukas D, Hiscock J, Gannon BJ, Jonsson R, Gordon TP, Waterman SA. Selective down-regulation of aquaporin-1 in salivary glands in primary Sjögren's syndrome. **Lab Invest** 2002; 82:1547-52.

Bollag WB, Xie D, Zheng X, Zhong X. A potential role for the phospholipase D2-aquaporin-3 signaling module in early keratinocyte differentiation: production of a phosphatidylglycerol signaling lipid. **J Invest Dermatol** 2007; 127:2823-31.

Brandwein MS, Ivanov K, Wallace DI, et al. Mucoepidermoid carcinoma: a clinicopathologic study of 80 patients with special reference to histological grading. **Am J Surg Pathol** 2001; 25:835-45.

Breyer J, Otto W, Burger M, Hartmann A, Rubenwolf PC. Aquaporin 3 expression loss in urothelial carcinoma: association with tumor invasion depth, but not with grading? **Bladder Cancer** 2017; 3:31-4.

Chae YK, Kang SK, Kim MS, et al. Human AQP5 plays a role in the progression of chronic myelogenous leukemia (CML). **PLoS One** 2008a; 3:e2594.

Chae YK, Woo J, Kim MJ, Kang SK, Kim MS, Lee J, Lee SK, Gong G, Kim YH, Soria JC, Jang SJ, Sidransky D, Moon C. Expression of aquaporin 5 (AQP5) promotes tumor invasion in human non small cell lung cancer. **PLoS One** 2008b;3(5):e2162.

Chen Y, Tachibana O, Oda M, et al. Increased expression of aquaporin 1 in human hemangioblastomas and its correlation with cyst formation. **J Neurooncol** 2006; 80:219-25.

Chen MM, Roman SA, Sosa JA, Judson BL. Histologic grade as prognostic indicator for mucoepidermoid carcinoma: a population level analysis of 2400 patients. **Head Neck** 2013; 36:158-63.

Chen J, Wang T, Zhou YC, et al. Aquaporin 3 promotes epithelial-mesenchymal transition in gastric cancer **J Exp Clin Cancer Res** 2014; 33:38.

Chen R, Shi Y, Amiduo R, Tuokan T, Suzuk L. Expression and prognostic value of aquaporin 1, 3 in cervical carcinoma in women of Uygur ethnicity from Xinjiang, China. **PLoS One** 2014; 9:e98576.

Clapp C, Escalera GM. Aquaporin-1: a novel promoter of tumor angiogenesis. **Trends Endocrinol Metabol** 2006; 17:1-2.

Coca Pelaz A, Rodrigo JP, Triantafyllou A, et al. Salivary mucoepidermoid carcinoma revisited. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2015; 272:799-819.

Day RE, Kitchen P, Owen DS, et al. Human aquaporins: Regulators of transcellular water flow. **Biochimica Biophysica Acta** 2014; 1840:1492-506.

Delporte D, Steinfeld S. Distribution and roles of aquaporins in salivary glands. **Biochim Biophys Acta** 2006; 1758:1061-70.

Delporte D. Aquaporins in salivary glands and pancreas. **Biochimica Biophysica Acta** 2014; 1840:1524-32.

Delporte C, Bryla A, Perret J. Aquaporins in salivary glands: from basic research to clinical applications. **Int J Mol Sci** 2016; 17:166.

De Paula F, Teshima THN, Hsieh R, et al. The expression of water channel proteins during human salivary gland development: a topographic study of aquaporins 1, 3 and 5. **J Mol Histol** 2017; 48:329-36.

de Leso ML, Yool AJ. Mechanisms of aquaporin-facilitated cancer invasion and metastasis. **Front Chem** 2018; 6:135.

Direito I, Paulino J, Vigia E, Brito MA, Soveral G. Differential expression of aquaporin-3 and aquaporin-5 in pancreatic ductal adenocarcinoma. **J Surg Oncol** 2017; 115:980-96.

Dossani RH, Tefaghi HA, Lemonnier L, Mehta V, Jacobsohn JA, Guthikonda B. Mucoepidermoid carcinoma of palatal minor salivary glands with intracranial extension: a case report and literature review. **J Neurol Surg Rep** 2016; 77:e156-e9.

Fossdal G, Vik-Mo EO, Sandberg C, et al. Aqp 9 and brain tumour stem cells. **Sci World J** 2012; 2012:915176.

Fu D, Libson A, Miercke LJ, et al. Structure of a glycerol-conducting channel and the basis for its selectivity. **Science** 2000; 290:481-6.

Goel AN, Badran KW, Braun APG, Garrett AM, Long JL. Minor salivary gland carcinoma of the oropharynx: a population-based analysis of 1426 patients. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2017; 158:287-94.

Gonen T, Walz T. The structure of aquaporins. **Q Rev Biophys** 2006; 39:361-96.

Goode RK, Auclair PL, Ellis GL. Mucoepidermoid carcinoma of the major salivary glands: clinical and histopathologic analysis of 234 cases with evaluation of grading criteria. **Cancer** 1998; 82:1217-24.

Gresz V, Kwon TH, Hurley PT, et al. Identification and localization of aquaporin water channels in human salivary glands. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 2001; 281:G247–G54.

Groot BL, Grubmuller H. The dynamics and energetics of water permeation and proton exclusion in aquaporins. **Curr Opin Structural Biol** 2005; 15:176-83.

Guevara-Canales JO, Morales-Vadillo R, Guzmán-Arias G, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: a retrospective study of 51 cases and review of the literature. **Acta Odontol Latinoam** 2016; 29:230-8.

Guo X, Sun T, Yang M, Li Z, Li Z, Gao Y. Prognostic value of combined aquaporin 3 and aquaporin 5 overexpression in hepatocellular carcinoma. **Biomed Res Int** 2013; 2013:206525.

Hara-Chikuma M, Verkman AS. Physiological roles of glyceroltransporting aquaporins: the aquaglyceroporins. **Cell Mol Life Sci** 2006; 63:1386-92.

Hara-Chikuma M, Verkman AS. Prevention of skin tumorigenesis and impairment of epidermal cell proliferation by targeted aquaporin-3 gene disruption. **Mol Cell Biol** 2008a; 28:326-32.

Hara-Chikuma M, Verkman AS. Aquaporin-3 facilitates epidermal cell migration and proliferation during wound healing. **J Mol Med** 2008b; 86:221–31.

He Z, Dong W, Hu J, Ren X. AQP5 promotes hepatocellular carcinoma metastasis via NF-κB-regulated epithelial-mesenchymal transition. **Biochem Biophysical Res Commun** 2017; 490:343-8.

Hicks J, Flaitz C. Mucoepidermoid carcinoma of salivary glands in children and adolescents: assessment of proliferation markers. **Oral Oncol** 2000; 36:454-60.

Hocwald E, Korkmaz H, Yoo GH, et al. Prognostic factors in major salivary gland cancer. **Laryngoscope** 2001; 111:1434-9.

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

Hou SY, Li YP, Wang JH, et al. Aquaporin-3 inhibition reduces the growth of nslc cells induced by hypoxia. **Cell Physiol Biochem** 2016; 38:129-40.

Hu J, Verkman AS. Increased migration and metastatic potential of tumor cells expressing aquaporin water channels. **FASEB J** 2006; 20:1892-94.

Huang X, Huang L, Shao M. Aquaporin 3 facilitates tumor growth in pancreatic cancer by modulating mTOR signaling. **Biochem Biophys Res Commun** 2017; 486:1097-102.

Ichiyama T, Nakatani E, Tatsumi K, et al. Expression of aquaporin 3 and 5 as a potential marker for distinguishing dry mouth from Sjögren's syndrome. **J Oral Sc** 2018; 60:212-20.

Ishibashi K, Hara S, Kondo S. Aquaporin water channels in mammals. **Clin Exp Nephrol** 2009; 13:107-17.

Ishimoto S, Wada K, Usami Y, et al. Differential expression of aquaporin 5 and aquaporin 3 in squamous cell carcinoma and adenoid cystic carcinoma. **Int J Oncol** 2012; 41:67-75.

Jablonski EM, Mattocks MA, Sokolov E, et al. Decreased aquaporin expression leads to increased resistance to apoptosis in hepatocellular carcinoma, **Cancer Lett** 2007 250:36-46.

Jensen HH, Login FH, Park JY. Immunohistochemical evaluation of activated Ras and Rac1 as potential downstream effectors of aquaporin-5 in breast cancer in vivo. **Biochem Biophys Res Commun** 2017; 493:1210-6.

Jo YM, Park TI, Lee HY, Jeong JY, Lee WK. Prognostic significance of aquaporin 5 expression in non-small cell lung cancer. **J Pathol Trans Med** 2016; 50:122-8.

Jung HJ, Park JY, Jeon HS, Kwon TH. Aquaporin-5: a marker protein for proliferation and migration of human breast cancer cells, **PLoS One** 2011; 6:e28492.

Kang SK, Chae YK, Woo J, et al. Role of human aquaporin 5 in colorectal carcinogenesis, **Am J Pathol** 2008; 173:518-25.

Katabi N, Ghossein R, Ali S, et al. Prognostic features in mucoepidermoid carcinoma of major salivary glands with emphasis on tumour histologic grading. **Histopathology** 2014; 65:793-804.

Kozono D, Yasui M, King LS, Agre P. Aquaporin water channels atomic structure molecular dynamics meet clinical medicine. **J Clin Invest** 2002; 109:1395-9.

Krane CM, Goldstein DL. Comparative functional analysis of aquaporins/glyceroporins in mammals and anurans. **Mamm Genome** 2007; 18:452-62.

Kruse E, Uehlein N, Kaldenhoff R. The aquaporins. **Genome Biol** 2006; 7:206.

Kusayama M, Wada K, Nagata M, et al. Critical role of aquaporin 3 on growth of human esophageal and oral squamous cell carcinoma. **Cancer Sci** 2011; 102:1128-36.

Larsen HS, Ruus A-K, Galtung HK. Aquaporin expression patterns in the developing mouse salivary gland. **Eur J Oral Sci** 2009; 117:655-62.

Larsen HS, Aure MH, Peters SB, Larsen M, Messelt EB, Kanli Galtung H. Localization of AQP5 during development of the mouse submandibular salivary gland. **J Mol Histol** 2011; 42:71-81.

Lee SJ, Chae YS, Kim JG, et al. AQP5 expression predicts survival in patients with early breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2014; 21:375-83.

Lehnerdt GF, Bachmann HS, Adamzik M, et al. AQP1, AQP5, Bcl-2 and p16 in pharyngeal squamous cell carcinoma. **J Laryngol Otol** 2015; 129:580-6.

Li C, Li X, Wu L, Jiang Z. Elevated AQP1 expression is associated with unfavorable oncologic outcome in patients with hilar cholangiocarcinoma. **Technol Cancer Res Treat** 2017; 16:421-7.

Lima SS, Soares AF, de Amorim RF, et al. Epidemiologic profile of salivary gland neoplasms: analysis of 245 cases. **Braz J Otorhinolaryngol** 2005; 71:335-40.

Liu S, Zhang S, Jiang H, Yang Y, Jiang Y. Co-expression of AQP3 and AQP5 in esophageal squamous cell carcinoma correlates with aggressive tumor progression and poor prognosis. **Med Oncol** 2013; 30:636.

Loyola AM, Araújo VC, Sousa SO, Araújo NS. Minor salivary gland tumours: a retrospective study of 164 cases in a Brazilian population. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 1995; 31B:197-201.

Luukkaa H, Klemi P, Leivo I, Vahlberg T, Grenman R. Prognostic significance of Ki-67 and p53 as tumor markers in salivary gland malignancies in Finland: an evaluation of 212 cases. **Acta Oncol** 2006; 45:669-75.

Machida Y, Ueda Y, Shimasaki M, et al. Relationship of aquaporin 1, 3, and 5 expression in lung cancer cells to cellular differentiation, invasive growth, and metastasis potential. **Hum Pathol** 2011; 42:669-78.

Marlar S, Jensen HH, Login FH, Nejsum LN. Aquaporin-3 in cancer. **Int J Mol Sci** 2017; 18:2106.

Matsuki-Fukushima M, Fujita-Yoshigaki J, Murakami M, Katsumata Kato O, Yokoyama M, Sugiyama H. Involvement of AQP6 in the mercury-sensitive osmotic lysis of rat parotid secretory granules. **J Membr Biol** 2013; 246:209-14.

Matsuo K, Kawano K. Immunohistochemical distribution and morphometric analysis of aquaporin-3 in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg** 2014; 43:13-21.

Maugeri R, Schiera G, Di Liegro CM, Fricano A, Lacopino DG, Di Liegro I. Aquaporins and Brain tumors. **Int J Mol Sci** 2016; 17:1029.

Mccooy E, Sontheimer H. Expression, and function of water channels (Aquaporins) in Migrating Malignant Astrocytes. **Glia** 2007; 55:1034-43.

McHugh CH, Roberts DB, El-Naggar AK, et al. Prognostic factors in mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands. **Cancer** 2012; 118:3928-36.

Milano A, Longo F, Basile M, Iaffaioli RV, Caponigro F. Recent advances in the treatment of salivary gland cancers: emphasis on molecular targeted therapy. **Oral Oncol** 2007; 43:729-34.

Mobasheri A, Marples D. Expression of the AQP-1 water channel in normal human tissues: a semiquantitative study using tissue microarray technology. **Am J Physiol** 2004; 286:C529-37.

Moon C, Soria JC, Jang SJ, et al. Involvement of aquaporins in colorectal carcinogenesis. **Oncogene** 2003; 22:6699-703.

Musa-Aziz R, Chen LM, Pelletier MF, Boron WF. Relative CO₂/NH₃ selectivities of AQP1, AQP4, AQP5, AmtB, and RhAG. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2009; 106:5406-11.

Nagao T, Sugano I, Ishida Y, et al. Basal cell adenocarcinoma of the salivary glands: comparison with basal cell adenoma through assessment of cell proliferation, apoptosis, and expression of p53 and bcl-2. **Cancer** 1998; 82:439-47.

Nakamura M, Saga T, Watanabe K, et al. An immunohistochemistry-based study on aquaporin (AQP)-1, 3, 4, 5 and 8 in the parotid glands, submandibular glands and sublingual glands of Sjögren's syndrome mouse models chronically administered cevimeline. **Kurume Med J** 2013; 60:7-19.

Nico B, Ribatti D. Aquaporins in tumor growth and angiogenesis. **Cancer Lett** 2010; 294:135-8.

Nielsen S, King LS, Christensen BM, Agre P. Aquaporins in complex tissues. II. Subcellular distribution in respiratory and glandular tissues of rat. **Am J Physiol** 1997; 273:C1549-561.

Niu D, Kondo T, Nakazawa T, et al. Expression of aquaporin3 in human neoplastic tissues. **Histopathology** 2012; 61:543-51.

Oliveira FA, Duarte ECB, Taveira CT, et al. Salivary gland tumor: a review of 599 cases in Brazilian population. **Head Neck Pathol** 2009; 3:271-5.

Papadopoulos MC, Saadoun S, Verkman AS. Aquaporins and cell migration. **Pflugers Arch** 2008; 456:693-700.

Papadopoulos MC, Saadoun S. Key roles of aquaporins in tumor biology. **Biochim Biophys Acta** 2015; 1848:2576-83.

Park JY, Yoon G. Overexpression of aquaporin-1 is a prognostic factor for biochemical recurrence in prostate adenocarcinoma. **Pathol Oncol Res** 2017; 23:189-96.

Prevarskaya N, Skryma R, Shuba Y. Ion channels and the hallmarks of cancer. **Trends Mol Med** 2010; 16:107-21.

Qin F, Zhang H, Shao Y, et al. Expression of aquaporin1, a water channel protein, in cytoplasm is negatively correlated with prognosis of breast cancer patients. **Oncotarget** 2016; 7:8143-54.

Rapidis AD, Givalos N, Gakiopoulou H, et al. Mucoepidermoid carcinoma of the salivary glands: review of the literature and clinicopathologic analysis of 18 patients. **Oral Oncol** 2007; 43:130-6.

Ribatti D, Ranieri G, Annese T, Nico B. Aquaporins in cancer. **Biochim Biophys Acta** 2014; 1840:1550-3.

Rojec A, Praetorius J, Frokiaer J, Nielsen S, Fenton RA. A current view of the mammalian aquaglyceroporins. **Annu Rev Physiol** 2008; 70:301-27.

Rubenwolf P, Thomas C, Denzinger S, et al. Loss of AQP3 protein expression is associated with worse progression free and cancer specific survival in patients with muscle invasive bladder cancer. **World J Urol** 2015; 33:1959-64.

Sapmaz E, Uysal M, Tumer MK, et al. Investigation of age-related changes in the expression of aquaporin-1 and aquaporin-5 in the salivary glands of mice. **Acta Otolaryngol** 2016; 136:937-43.

Saadoun S, Papadopoulos MC, Davies DC, Krishna S, Bell BA. Increased aquaporin-1 water channel expression in human brain tumors. **Br J Cancer** 2002; 87:621-3.

Satooka H, Hara-Chikuma M. Aquaporin-3 controls breast cancer cell migration by regulating hydrogen peroxide transport and its downstream cell signaling. **Mol Cell Biol** 2016; 36:1206-18.

Sekine S, Shimada Y, Nagata T, et al. Prognostic significance of aquaporins in human biliary tract carcinoma. **Oncol Rep** 2012; 27:1741-7.

Shao C, Sun W, Tan M, et al. Integrated, genome-wide screening for hypomethylated oncogenes in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Clin Cancer Res** 2011; 17:4320-30.

Shi Z, Zhang T, Luo L, et al. Aquaporins in human breast cancer: identification and involvement in carcinogenesis of breast cancer. **J Surg Oncol** 2012; 106:267-72.

Schneider S, Kloimstein P, Pammer J, Brannath W, Grasl MCh, Erovic BM. New diagnostic markers in salivary gland tumors. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2014; 271:1999-2007.

Seethala RR. An update on grading of salivary gland carcinomas. **Head Neck Pathol** 2009; 3:69-77.

Shimasaki M, Kanazawab Y, Satoa K, Tsuchiyab H, Ueda Y. Aquaporin-1 and -5 are involved in the invasion and proliferation of soft tissue sarcomas. **Pathol Res Pract** 2018; 214:80-8.

Speight PM, Barret AW. Salivary gland tumours. **Oral Dis** 2002; 8:229-40.

Steinfeld S, Cogan E, King LS, Agre P, Kiss R, Delporte C. Abnormal distribution of aquaporin-5 water channel protein in salivary glands from Sjögren's syndrome patients. **Lab Invest** 2001; 81:143-8.

Sui H, Han BG, Lee JK, Walian P, Jap BK. Structural basis of water-specific transport through the AQP1 water channel. **Nature** 2001; 414:872-8.

Tan M, Shao C, Bishop JA, et al. Aquaporin-1 promoter hypermethylation is associated with improved prognosis in salivary gland adenoid cystic carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg** 2014; 150:801-7.

Tomita Y, Dorward H, Yool A, et al. Role of aquaporin 1 signalling in cancer development and progression. **Int J Mol Sci** 2017; 18:299.

Tradtrantip L, Tajima M, Li L, Verkman AS. Aquaporin water channels in transepithelial fluid transport. **J Med Invest** 2009; 56:179-84.

Tzartos JS, Stergiou C, Daoussis D, et al. Antibodies to aquaporins are frequent in patients with primary Sjogren's syndrome. **Rheumatology** 2017; 56:2114-22.

Vargas PA, Gerhard R, Araujo Filho VJ, et al. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 cases. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo** 2002; 57:271-6.

Vasconcelos AC, Nor F, Meurer L, et al. Clinicopathological analysis of salivary gland tumors over a 15-year period. **Braz Oral Res** 2016; 30:e2.

Verkman AS. More than Just water channels: unexpected cellular roles of aquaporin. **J Cell Sci** 2005; 118:3225-32.

Verkman AS, Hara-Chikuma M, Papadopoulos MC. Aquaporins-new players in cancer biology. **J Mol Med** 2008; 86:523-9.

Verkman AS. Knockout models reveal new aquaporin functions. **Handb Exp Pharmacol** 2009; 190:359-81.

Verkman AS. Aquaporins in clinical medicine. **Annu Rev Med** 2012; 63:303-16.

Verkman AS, Anderson MO, Papadopoulos MC. Aquaporins: important but elusive drug targets. **Nat Rev Drug Discov** 2014; 13: 259-77.

Voss KE, Bollag RJ, Fussell N, By C, Shee-han DJ, Bollag WB. Abnormal aquaporin-3 protein expression in hyperproliferative skin disorders. **Arch Dermatol Res** 2011; 303: 591-600.

Wang W, Hart PS, Piesco NP, Lu X, Gorry MC, Hart TC. Aquaporin expression in developing human teeth and selected orofacial tissues. **Calcif Tissue Int** 2003; 72:222-7.

Wang P, Ni RY, Chen MN, Mou KJ, Mao Q, Liu YH. Expression of aquaporin-4 in human supratentorial meningiomas with peritumoral brain edema and correlation of VEGF with edema formation. **Genet Mol Res** 2011; 10:2165-71.

Wang W, Li Q, Yang T, et al. Expression of AQP5 and AQP8 in human colorectal carcinoma and their clinical significance. **J Surg Oncol** 2012; 10:242.

Wang J, Feng L, Zhu Z, et al. Aquaporins as diagnostic and therapeutic targets in cancer: how far we are? **J Transl Med** 2015; 13:96.

Watanabe T, Fujii T, Oya T, et al. Involvement of aquaporin-5 in differentiation of human gastric cancer cells. **J Physiol Sci** 2009; 59:113-22.

Wellner RB, Redman RS, Swaim WD, Baum BJ. Further evidence for AQP8 expression in the myoepithelium of rat submandibular and parotid glands. **Pflug Arch** 2006; 451:642-5.

Wei XB, Dong JC. Aquaporin 1 promotes the proliferation and migration of lung cancer cell in vitro. **Oncol Rep** 2015; 34:1440-8.

Woo J, Lee J, Kim MS, et al: The effect of aquaporin 5 overexpression on the Ras signaling pathway. **Biochem Biophys Res Commun** 2008; 367:291-8.

Xia J, Wang H, Li S, et al. Ion channels or aquaporins as novel molecular targets in gastric cancer. **Mol Cancer** 2017; 16:54.

Xu W, Wang Y, Qi X, et al. Prognostic factors of palatal mucoepidermoid carcinoma: a retrospective analysis based on a double-center study. **Sci Rep** 2017; 7:43907.

Yan CX, Zhu Y, Zhang X, Chen X, Zheng W, Yang J. Down-regulated aquaporin 5 inhibits proliferation and migration of human epithelial ovarian cancer 3AO cells. **J Ovarian Res** 2014; 7:78.

Yang JH, Yu YQ, Yan CX. Localisation and expression of aquaporin subtypes in epithelial ovarian tumours. **Histol Histopathol** 2011a; 26:1197-205.

Yang JH, Yan CX, Chen XJ, Zhu YS. Expression of aquaglyceroporins in epithelial ovarian tumours and their clinical significance. **J Int Med Res** 2011b; 39:702-11.

Yoshida T, Hojo S, Sekine S, et al. Expression of aquaporin-1 is a poor prognostic factor for stage II and III colon cancer. **Mol Clin Oncol** 2013; 1:953-8.

Yool AJ. Functional domains of aquaporin-1: Keys to physiology and targets for drug Discovery. **Curr Pharm Des** 2007; 13:3212-21.

Yun S, Sun PL, Jin Y, et al. Aquaporin 1 is an independent marker of poor prognosis in lung adenocarcinoma. **J Pathol Transl Med** 2016; 50:251-7.

Zhang Z, Chen Z, Song Y, Zhang P, Hu J, Bai C. Expression of aquaporin 5 increases proliferation and metastasis potential of lung cancer. **J Pathol** 2010; 221:210-20.

Zhang T, Zhao C, Chen D, Zhou Z. Overexpression of AQP5 in cervical cancer: correlation with clinicopathological features and prognosis. **Med Oncol** 2012; 29:1998-2004.

Zheng H-H, Xu G-X, Guo J, Fu L-C, Yao Y. Aquaporin-1 down regulation associated with inhibiting cell viability and inducing apoptosis of human lens epithelial cells. **Int J Ophthalmol** 2016; 9:15-20.

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



COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua reunião de **19/09/2017**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2433/17** intitulado: **“Avaliação da expressão de aquaporinas em carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar.”**

Pesquisador responsável: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo.
Aluna: Mérin Barbara Satamboni (Doutorado).

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 22 de novembro de 2017.

Atenciosamente,



Dra. Sandra Cáires Serrano
2ª. Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com carcinoma mucoepidermóide de glândula salivar

Caso	Gênero	Raça	Idade	Grau	Local	Invasão vascular	Invasão perineural	Comprometimento de linfonodos	Recidiva	Metástase	Estado atual
1	Masculino	Branca	56	Baixo	Parótida				Não	Não	Vivo sem doença
2	Feminino	Branca	41	Baixo	Parótida				Não	Não	Vivo sem doença
3	Feminino	Branca	14		Parótida	Sim	Não	Sim	Sim	Sim	Morto por câncer
4	Masculino	Branca	49	Intermediário	Glândulas menores	Não	Sim	Sim	Não	Não	Morto outras causas
5	Masculino	Branca	75	Baixo	Glândulas menores				Não	Não	Morto por câncer
6	Masculino	Branca	65	Intermediário	Glândulas menores	Não	Não	Sim	Não	Não	Vivo sem doença
7	Masculino	Branca	48	Baixo	Parótida						
8	Masculino	Não branca	36	Baixo	Parótida	Não	Não	Não	Não	Não	Morto outras causas
9	Feminino	Branca	55	Alto	Sublingual				Não	Não	Vivo sem doença
10	Masculino	Branca	60	Alto	Parótida	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Morto por câncer
11	Masculino	Não branca	13	Baixo	Glândulas menores	Não	Não	Não	Não	Não	Vivo sem doença
12	Feminino	Branca	47	Alto	Glândulas menores	Não	Não		Sim		Vivo sem doença
13	Feminino	Branca	55	Intermediário	Glândulas menores		Sim	Sim		Não	Morto outras causas
14	Masculino	Branca	65	Alto	Glândulas menores	Sim	Sim	Sim	Sim	Sim	Morto por câncer
15	Feminino	Branca	23	Intermediário	Glândulas menores	Não	Não				Vivo sem doença
16	Masculino	Branca	31	Baixo	Glândulas menores	Não	Não	Não			Vivo sem doença
17	Feminino	Branca	27	Baixo	Glândulas menores	Não	Não	Sim	Não	Não	Vivo sem doença
18	Masculino	Branca	48	Alto	Parótida	Não	Sim	Sim	Sim	Sim	Morto por câncer
19	Feminino	Branca	49	Alto	Glândulas menores	Sim	Não	Não	Não	Não	Morto por câncer
20	Masculino	Branca	8	Baixo	Parótida	Não	Sim	Não	Não	Não	Vivo sem doença
21	Feminino	Branca	24	Baixo	Glândulas menores	Não	Não				Vivo sem doença
22	Masculino	Branca	53	Alto	Parótida	Não	Não	Sim	Não	Sim	Vivo sem doença
23	Feminino	Branca	59	Baixo	Glândulas menores	Não	Não	Sim	Sim	Não	Morto por câncer
24	Feminino	Branca	81	Baixo	Glândulas menores	Não	Não	Não	Não	Não	Morto por câncer