

**ASSINATURA IMUNOISTOQUÍMICA DAS CÉLULAS
MIOEPITELIAIS EM NEOPLASIAS BENIGNAS DE
GLÂNDULAS SALIVARES**

HELEN BARBARA STAMBONI

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

Área de Concentração: Oncologia

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

Co-orientadora: Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Stamboni, Helen Barbara

Assinatura imunoistoquímica das células mioepiteliais em neoplasias benignas de glândulas salivares / Helen Barbara

Stamboni - São Paulo, 2018.

64p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientadora: Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Descritores: 1. Imuno-Histoquímica/Immunohistochemistry. 2. Mioepitelioma/Myoepithelioma. 3. Neoplasias das Glândulas Salivares/Salivary Gland Neoplasms. 4. Adenoma Pleomorfo/Adenoma, Pleomorphic. 5. Adenoma/Adenoma. 6. Proteínas do Citoesqueleto/Cytoskeletal Proteins.

DEDICATÓRIA

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: Mérin

Meus Afilhados: Evellyn e Davi

AGRADECIMENTOS

A Deus por ser o centro da minha vida. Sem Deus eu não teria conseguido, conciliar problemas de saúde e cirurgia durante o estudo não foi fácil.

A Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, minha orientadora, por ter me dado essa oportunidade.

A Katia pelos ensinamentos no uso do laboratório.

A Ana Maria R. Alves Kuninari, coordenadora da Pós-graduação pela compreensão e pelas palavras de incentivo sempre. A Luciana Pitombeira Castelano, Cássia e Karla pela atenção e orientações.

A Suely Francisco, supervisora da biblioteca, pelo auxílio e suporte nos momentos finais.

A Fabio Albuquerque Marchi pela análise de Bioinformática.

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 Elen, Agatha e Malu por tornar a convivência mais agradável no CIPE e a Ágatha também pela ajuda nas figuras.

Aos meus pais e minha irmã por nunca deixarem eu desistir.

A Capes por me auxiliar financeiramente.

RESUMO

Stamboni HB. **Assinatura imunoistoquímica das células mioepiteliais em neoplasias benignas de glândulas salivares**. São Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas e comportamento clínico diverso. A grande variação no padrão histológico das lesões benignas de glândulas salivares muitas vezes é atribuída à presença de células mioepiteliais que apresentam padrões distintos em cada neoplasia: o mioepitelioma (M) é composto predominantemente por células mioepiteliais, o adenoma de células basais (ACB) é composto predominantemente por células epiteliais e o adenoma pleomórfico (AP) composto por variações de células mioepiteliais e epiteliais. O objetivo desse trabalho foi avaliar a expressão de um painel de proteínas do citoesqueleto (citoceratina 14 (CK14), vimentina, actina de músculo liso (AML), calponina e caldesmon), da matriz extracelular (colágeno) e proteína PLAG1, em neoplasias benignas das glândulas salivares por meio de técnica imunoistoquímica. Para tanto foram selecionadas 28 amostras de AP, 3 de M, 5 de ACB e 3 amostras de glândulas salivares histologicamente normais. A proteína CK14 foi predominantemente expressa no adenoma pleomórfico e adenoma de células basais. A AML foi expressa em todos os casos de adenoma pleomórfico e sua expressão foi menos frequente no adenoma de células basais e mioepitelioma. Caldesmon e vimentina foram expressas em todos os casos de AP, M e ACB. A proteína calponina foi expressa em todos os casos de mioepitelioma e adenoma de células basais e frequentemente positiva no adenoma pleomórfico. Colágeno tipo IV foi raramente expresso nos casos de adenoma pleomórfico e no adenoma de células basais. PLAG1 foi expressa na maioria dos tumores. Utilizando análise de clusterização hierárquica não foi possível classificar os diferentes tumores benignos de

glândula salivar. A análise estatística demonstrou que a AML é mais expressa em adenoma pleomórfico e que existe uma associação entre a expressão das proteínas calponina e PLAG1. Nossos resultados sugerem que o mioepitelioma, adenoma pleomórfico e adenoma de células basais representam espectros histológicos de um mesmo tumor.

SUMMARY

Stamboni HB. **[Immunohistochemical signature of myoepithelial cells in benign neoplasms of salivary glands]**. Sao Paulo; 2018. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Salivary gland tumors comprise a heterogeneous group of lesions, presenting different histological characteristics and diverse clinical behavior. The large variation in the histological pattern of benign lesions of the salivary glands is often attributed to the presence of myoepithelial cells presenting distinct patterns in each neoplasia: myoepithelioma is predominantly composed of myoepithelial cells, basal cell adenoma is composed predominantly of epithelial cells and pleomorphic adenoma composed of variations of myoepithelial and epithelial cells. The aim of this work was to determine a myoepithelial cell signature in benign salivary gland neoplasms using a panel of cytoskeleton proteins (cytokeratin, vimentin, smooth muscle actin, calponin and caldesmon), extracellular matrix protein (collagen) and PLAG1 protein by means of immunohistochemical technique. For this purpose 28 samples of pleomorphic adenoma, 3 of myoepithelioma, 5 of basal cell adenoma and 3 samples of histologically normal salivary glands were selected. CK14 protein was predominantly expressed in pleomorphic adenoma and basal cell adenoma. Smooth muscle actin was expressed in all cases of pleomorphic adenoma and its expression was less frequent in basal cell adenoma and myoepithelioma. Caldesmon and vimentin were expressed in all cases of pleomorphic adenoma, myoepithelioma and basal cell adenoma. Calponin protein was expressed in all cases of myoepithelioma and basal cell adenoma and frequently positive in pleomorphic adenoma. Type IV collagen was rarely expressed in cases of pleomorphic adenoma and basal cell adenoma. PLAG1 was expressed in the majority of the tumors. Using hierarchical clustering analysis it was not possible to classify the different benign tumors of the salivary gland. Statistical analysis

demonstrated that smooth muscle actin is more expressed in pleomorphic adenoma and that there is an association between the expression of the calponin and PLAG1 proteins. Our results suggest that myoepithelioma, pleomorphic adenoma, and basal cell adenoma represent histological spectra of the same tumor.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação da estrutura da glândula salivar, indicando a localização dos ácinos, ductos, células mioepiteliais e região de origem de alguns tumores mais frequentes.....	2
Figura 2	Imagem ilustrativa da porção secretora de uma glândula salivar.....	3
Figura 3	Imagem ilustrativa da célula mioepitelial.....	16
Figura 4	Aspectos histopatológicos de tumores benignos de glândulas salivares.....	25
Figura 5	Expressão das proteínas citoceratina 14, actina de músculo liso e caldesmon em tumores benignos das glândulas salivares.....	29
Figura 6	Expressão das proteínas vimentina, calponina e colágeno IV em tumores benignos das glândulas salivares.....	30
Figura 7	Expressão da proteína PLAG1 em amostras de glândula salivar.....	34
Figura 8	Perfil de expressão de proteínas nas amostras de adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais e glândulas salivares histologicamente normais.....	35

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Características das células Mioepiteliais.....	4
Quadro 2	Características do Adenoma Pleomórfico, Adenoma de Células Basais e Mioepitelioma de Glândula Salivar.....	9
Quadro 3	Proteínas do citoesqueleto utilizadas para a caracterização de células mioepiteliais neoplásicas.....	12
Quadro 4	Expressão de Proteínas da Matriz Extracelular para a caracterização de células mioepiteliais neoplásicas.....	13
Quadro 5	Anticorpos primários, clones, procedência, diluição, recuperação antigênica, controles positivos e padrão de marcação.....	22

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores benignos de glândula salivar: adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais.....	26
Tabela 2	Imunoexpressão das proteínas em amostras de adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais.....	31
Tabela 3	Distribuição das proteínas citoceratina 14, vimentina, actina de músculo liso, calponina, caldesmon, colágeno tipo IV em amostras de glândula salivar.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

α-AML	Alfa Actina Músculo liso
ACB	Adenoma de Células Basais
AME	Actina Músculo Específica
AML	Actina Músculo Liso
AP	Adenoma Pleomórfico
CK	Citoceratina
CK5	Citoceratina 5
CK14	Citoceratina 14
HHF35	Muscle Actin Specific Monoclonal Antibody
h-Caldesmon	Hight Molecular weight isoform
MIO	Mioepitelioma
PLAG 1	Pleomorphic Adenoma gene 1

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Glândula Salivar e Células Mioepiteliais	1
1.2	Tumores de Glândula Salivar	5
1.3	Caracterização dos Tumores de Glândula Salivar com diferenciação Mioepitelial por Imunoistoquímica.....	10
1.4	Justificativa.....	17
2	OBJETIVOS	18
2.1	Objetivo Geral.....	18
2.2	Objetivos Específicos	18
3	MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1	Casuística.....	19
3.2	Imunoistoquímica	20
3.3	Análise de Clusterização Hierárquica.....	22
3.4	Análise Estatística	23
4	RESULTADOS	24
4.1	Casuística.....	24
4.2	Dados Demográficos, Clínicos e Patológicos.....	24
4.3	Imunoistoquímica	26
4.4	Expressão de PLAG1	33
4.5	Análise de Clusterização Hierárquica.....	34
4.6	Análise Estatística	36
5	DISCUSSÃO	38
6	CONCLUSÃO	49
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

ANEXOS

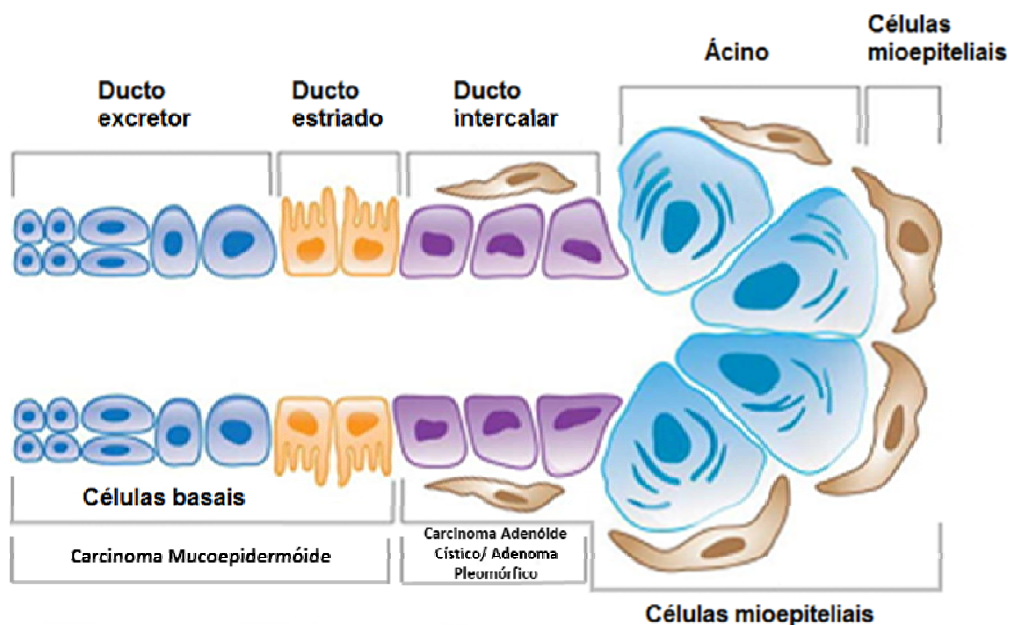
Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP

1 INTRODUÇÃO

1.1 GLÂNDULA SALIVAR E CÉLULAS MIOEPITELIAIS

As glândulas salivares são divididas anatomicamente em glândulas salivares maiores, que incluem as parótidas, submandibulares e sublinguais; e menores que consistem de 600 a 1000 glândulas independentes, encontradas na cavidade oral, tonsilas palatinas, faringe e laringe (MILLETICH 2010; DE PAULA et al. 2017).

Histologicamente, as glândulas salivares se desenvolvem de forma similar, a partir do epitélio bucal na vida fetal, possuem 3 tipos de porções secretoras (mucosas, serosas e mistas) e 3 tipos de ductos (intercalados, estriados e excretores). A estrutura do sistema ductal é composta por células luminais e não-luminais (células basais e células mioepiteliais) (ELLIS e AUCLAIR 2008; IANEZ et al. 2010; MILLETICH 2010; DE PAULA et al. 2017) (Figura 1).



Fonte: Modificado de ADAMS et al. (2014)

Figura 1 – Representação da estrutura da glândula salivar, indicando a localização dos ácidos, ductos, células mioepiteliais e região de origem de alguns tumores mais frequentes.

A morfogênese da glândula salivar divide-se em vários estágios, iniciando a partir da proliferação do epitélio até atingir a formação de botões terminais e a diferenciação celular em túbulos terminais e pró-acinares. As células mioepiteliais se desenvolvem simultaneamente à citodiferenciação das células acinares e são caracterizadas pela agregação de microfilamentos e presença de actina, miosina, e filamentos intermediários (YAKU 1983; TUCKER 2007; LOURENÇO et al. 2007; LOURENÇO et al. 2008; IANEZ et al. 2010).

As células mioepiteliais são de origem ectodérmica, encontradas no epitélio glandular, como uma camada fina da membrana basal, normalmente abaixo das células luminiais; consistem de 4 a 8 processos que se ramificam

envolvendo a unidade secretora, a parte final da glândula e ductos (RAUBENHEIMER et al. 1987; BALACHANDER et al. 2015; SHAH et al. 2016) (Figura 2). Estão envolvidas na morfogênese da glândula salivar e diferenciação celular, são células contráteis e desempenham papel importante na expulsão da saliva, regulam a troca eletrolítica e controlam o metabolismo glandular; atuam na propagação do estímulo neural, na síntese da membrana basal e da matriz extracelular. Têm função primordial na gênese do tumor, sendo capazes de se transformar em diversos tipos histológicos e produzir diferentes padrões arquiteturais, agem como supressores tumorais, inibindo invasão e angiogênese e são consideradas componentes principais de vários tumores de glândulas salivares (CASELITZ et al. 1986; BATSAKIS e EL-NAGGAR 1999; FOSCHINI et al. 2000; DEUGNIER et al. 2002; ZARBO 2002; CHITTURI et al. 2015; BALACHANDER et al. 2015; SHAH et al. 2016). As características das células mioepiteliais estão descritas no Quadro 1.

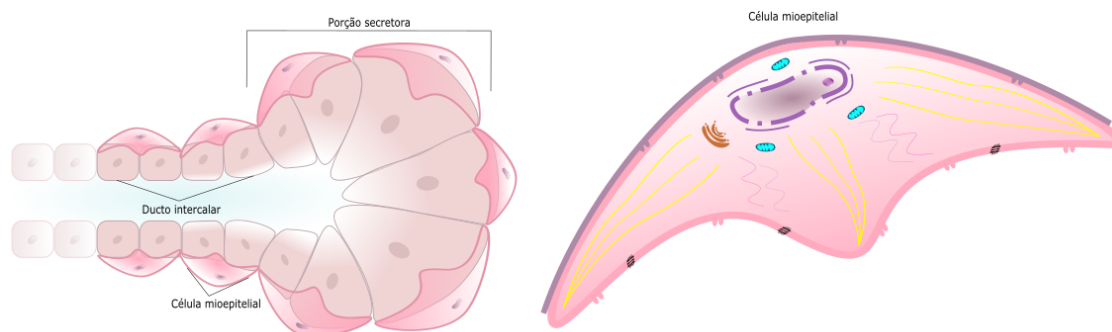


Figura 2 - Imagem ilustrativa da porção secretora de uma glândula salivar. Representação esquemática da estrutura de uma glândula salivar demonstrando sua porção secretora envolvida em células mioepiteliais.

Quadro 1 - Características das células mioepiteliais

CÉLULAS MIOEPITELIAIS		
Origem	Ectodérmica	BALACHANDER et al. 2015;
Atividade fisiológica	Células de contração, expulsão da saliva, regulação da troca eletrolítica, controle do metabolismo glandular, propagação do estímulo neural, síntese da membrana basal e matriz extracelular, supressão tumoral, anti-invasivo, participam da morfogênese da glândula, diferenciação celular	RAUBENHEIMER et al. 1987; ZARBO 2002; DEUGNIER et al. 2002; BALACHANDER et al. 2015; SHAH et al. 2016.
Participação no tumor	Produz diferentes padrões arquiteturais, diferenciação citológica e da matriz extracelular, metaplasia, capacidade de se transformar em diversos tipos histológicos	CASELITZ et al. 1986; ARAÚJO et al. 1994; BATSAKIS e EL-NAGGAR et al. 1999; ZARBO 2002; DEUGNIER et al. 2002; RODRIGUES JÚNIOR 2008; CHITTURI et al. 2015; BALACHANDER et al. 2015; SHAH et al. 2016.
Localização	Tecidos secretores normais/Epitélio glandular: glândulas salivares maior e menor, lacrimal, sudorípara, mama, próstata, esôfago e glândulas produtoras de muco da traquéia	CHITTURI et al. 2015
Localização histológica	Envolvem a unidade secretora, a parte final da glândula e ductos	BALACHANDER et al. 2015; CHITTURI et al. 2015
Características morfológicas	<ul style="list-style-type: none"> - Angular ou Basaloide: pequeno núcleo hiper cromático e citoplasma eosinofílico - Epitelióides: Células poligonais com núcleo vesicular e amplo citoplasma; - Células Claras: Citoplasma claro devido ao glicogênio - Células fusiformes: alongadas, fusiformes com citoplasma pálido; - Células Plasmocitóides (células hialinas): citoplasma brilhante eosinofílico com núcleos excêntricos. 	BALACHANDER et al. 2015; CHITTURI et al. 2015; SHAH et al. 2016
Padrões estruturais	<ul style="list-style-type: none"> - Padrão Mixoide: produção abundante de matriz condromixóide - Padrão Sólido (não mixóide): as células estão dispostas em forma de ninhos, folhas envolvidas por uma matriz hialinizada, - Padrão Reticular: padrão de anastomose, contendo células epitelióide e mioepiteliais, - Padrão Microcístico ou pseudocístico: presença de vários tamanhos de espaços císticos formados por acúmulo de matriz mixóide com nichos de células tumorais, <p>Padrão Cribriforme ou Pseudoglandular: agrupamentos de células epitelióides formam estruturas cribriformes e pseudocística devido a sua produção de matriz mixóide.</p>	DARDICK et al. 1983, 1990; REDDER et al. 2013; CHITTURI et al. 2015
Se divide em duas porções	<ul style="list-style-type: none"> - Filamentosa: proteínas do citoesqueleto e matriz extracelular - Não filamentosa: grânulos de glicogênio e poucos glóbulos de gordura neutra, porém nenhum produto secretório. 	BALACHANDER et al. 2015
Padrão histológico nas neoplasias	<ul style="list-style-type: none"> - Aspecto Plasmocitóide: grande quantidade de filamentos intermediários, - Aspecto Fusiforme: pequena quantidade de microfilamentos com corpos densos (diferenciação do tipo músculo liso), - Aspecto Poligonal: aspecto epitelial e exibe junções intercelulares do tipo desmossomos ou formam grupos com metaplasia escamosa 	DARDICK et al. 1983, 1990; RODRIGUES JÚNIOR 2008; SHAH et al. 2016

1.2 TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR

As neoplasias de glândulas salivares constituem um amplo espectro de doenças com comportamento morfológico e biológico variável, benigno ou maligno, e devido a sua natureza rara e heterogênea, esses tumores frequentemente apresentam difícil diagnóstico (ARAÚJO et al. 2000; GILLESPIE et al. 2012; SHAH et al. 2016). Surgem geralmente como uma massa de crescimento lento e assintomático, mas podem ocorrer sinais e sintomas de acordo com a localização do tumor, tais como: infecção, hemorragia, dor, paralisia facial, sinusite e rinite, disfagia, tosse e sensação de corpo estranho (XIMENES FILHO et al. 2002; GILLESPIE et al. 2012).

Cerca de 67,7 a 84,0% dos tumores de glândula salivar originam-se na parótida, 10 a 23% na submandibular e os demais casos na sublingual e glândulas salivares menores (SANTOS et al. 2003; LIMA et al. 2005; ITO 2005; GILLESPIE et al. 2012). Os tipos de neoplasia benigna mais comuns de glândulas salivares são: adenoma pleomórfico, mioepitelioma, tumor de Warthin ou cistoadenoma papilar linfomatoso, oncocitoma, adenoma de células basais; e os tipos de neoplasia maligna são: carcinoma mucoepidermóide, carcinoma adenóide cístico, carcinoma de células acinares, carcinoma epitelial-mioepitelial, carcinoma ex-adenoma pleomórfico, adenocarcinoma polimórfico de baixo grau, carcinoma de células escamosas, sarcoma e linfoma (BARNES et al. 2005).

A grande variação no padrão histológico das lesões benignas de glândulas salivares muitas vezes é atribuída à presença de células

mioepiteliais que apresentam padrões distintos em cada neoplasia. A variedade citológica, o padrão estrutural e matriz extracelular produzida pelas células mioepiteliais neoplásicas podem ocorrer de forma isolada ou em conjunto com outros componentes tumorais, e as lesões mostram que a diferenciação das células mioepiteliais neoplásicas podem ser classificadas em: 1) tumor benigno com participação completa/predominante de células mioepiteliais neoplásicas – adenoma pleomórfico e mioepitelioma; 2) tumor benigno com participação parcial das células mioepiteliais neoplásicas – adenoma de células basais (YU et al. 1998; ZARBO et al. 2000; SIMPSON 2002; CHITTURI et al. 2015).

O adenoma pleomórfico é um tumor benigno que corresponde a 2/3 de todas as neoplasias da parótida e macroscopicamente possui uma cápsula fibrosa bem definida (DAY et al. 2004). O tratamento do adenoma é cirúrgico e a radioterapia pode ser utilizada, em alguns casos, no tratamento de múltiplas recorrências (DAY et al. 2004). É raro o desenvolvimento de malignidade, mas quando ocorre é denominado carcinoma ex-adenoma pleomórfico, e está entre os tumores mais agressivos das glândulas salivares, levando à 30 a 50% de mortalidade em 5 anos, e em alguns casos pode originar metástases à distância (GHANEM et al. 2016). Estruturalmente, o adenoma pleomórfico é formado por uma proliferação de elementos ductais (células epiteliais) e células mioepiteliais (responsáveis pela produção da matriz extracelular), dispostas em estroma bastante variável (DARDICK et al. 1983; VALSTAR et al. 2017, LOPES et al. 2017).

O adenoma de células basais, também considerado um adenoma monomórfico, é um tumor benigno, formado por células arredondadas sobre uma delgada membrana basal. Representa uma lesão rara, não agressiva, caracterizada pela presença de células basalóides monomórficas sem componente mixocondróide, pela integridade da lâmina basal, diminuição do número de mitoses e apresenta vários padrões de crescimento (tubular, trabecular, cribriforme, sólido e membranoso) (REGESE e SCIUBBA 1993; ELLIS e AUCLAIR 2008; RAJASENTHIL e RAVI 2014). Geralmente, é encapsulado ou bem circunscrito (CHAUDHRY et al. 1983, DARDICK et al. 1983, 1992). Segundo MARGARITescu et al. (2005), o adenoma de células basais foi relacionado com outras variações de adenomas de glândula salivar, como o adenoma pleomórfico e mioepitelioma, e sugeriram que esses tumores tem uma origem em comum, provavelmente dos ductos intercalados e a proporção dos tipos celulares, o arranjo citoarquitetural e a quantidade de produção de matriz extracelular pode ser a diferenciação entre eles (MARGARITescu et al. 2005; ZARBO et al. 2000).

O mioepitelioma é uma neoplasia benigna rara, de natureza mioepitelial, compreendendo 7% dos tumores de glândulas salivares, ocorrendo principalmente na parótida (LEE et al. 2005). A lesão apresenta variado padrão de crescimento morfológico: sólido, mixóide ou reticular com diferenciação mioepitelial, onde a arquitetura e o tipo celular não alteram o prognóstico da doença (LEE et al. 2005; JAEGER et al. 1997). O mioepitelioma é composto quase que completamente por células mioepiteliais e as formações ductais estão ausentes ou muito raras

(SCIUBBA e BRANNON 1982; BARNES et al. 1985). Evolui como um tumor de crescimento lento e seu tamanho varia de 1 a 5 cm de diâmetro. Geralmente, é encapsulado e bem delimitado. Para considerar o diagnóstico histopatológico de mioepitelioma puro, o componente epitelial deve ser menor que 5-10%, e o estroma fibromixóide deve estar ausente (a presença deste estroma indica adenoma pleomórfico).

Uma alteração genética frequentemente encontrada no adenoma pleomórfico é o rearranjo envolvendo o gene *PLAG1* (do inglês, *Pleomorphic Adenoma Gene 1*). O gene *PLAG1* localiza-se na região cromossômica 8q12 e codifica um fator de transcrição. Os genes *CTNNB1*, *CHCHD7*, *LIFR* e *TCEA1* podem se fundir ao *PLAG1* e sua ativação transcricional leva a um aumento de sua expressão promovendo a ativação de vias de sinalização que regulam a proliferação celular e a tumorigênese, resultando em hiperexpressão da proteína *PLAG1* nesses tumores (KATABI et al. 2018).

A fusão pode ser identificada por RT-PCR, FISH, CISH e, mais recentemente, por imunistoquímica. Alteração em *PLAG1* já foi descrita em até 92% dos adenomas pleomórficos, considerando as diferentes técnicas de detecção (KATABI et al. 2018; AVADHANI et al. 2016; KATABI et al. 2015; MATSYUAMA et al. 2011). Contudo, outros tumores de glândula salivar também podem apresentar alteração em *PLAG1*.

Estudos sugerem que a presença dessa alteração possa ser utilizada para a identificação desses tumores (MARTINS et al. 2005; FOO et al. 2016; AVADHANI et al. 2016). Contudo, ainda é controverso se outros tumores com participação de células mioepiteliais também apresentam esse

rearranjo (MATSYUAMA et al. 2011; BARNES et al. 2005; EL-NAGGAR et al. 1999).

O Quadro 2 descreve algumas características do adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma.

Quadro 2 - Características do adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma de glândula salivar

TUMORES BENIGNOS DE GLÂNDULA SALIVAR COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL			
	ADENOMA DE CÉLULAS BASAIS	ADENOMA PLEOMÓRFICO	MIOEPITELIOMA
Componente Celular	Células epiteliais e células basaloides monomórficas sem componente mixocondróide; Componente parcial de células mioepiteliais. (REGESE e SCIUBBA 1993; ZARBO et al. 2000; SMULLIN et al. 2004; MARGARITescu et al. 2005, LI et al. 2014)	Células epiteliais e mioepiteliais; Componente mioepitelial: células anguladas, plasmocitóides, fusiformes, clara, oncocíticas e produtoras de muco; Componente epitelial: cordões, ilhas, ductos e estruturas císticas; Componente estromal: mixocondróide (DARDICK et al. 1983; NEVES et al. 2007)	Componente mioepitelial: células fusiformes, plasmocitóides, epitelíóide ou claras em componente ductal ou raros; Componente epitelial menor que 5-10%, com células do tipo fusiforme, plasmocitóides, epitelíóides ou clara (SCIUBBA e BRANNON 1982; BARNES et al. 1985; KANEDA et al. 1994; MICHAL et al. 1996; JAEGER et al. 1997; LEE et al. 2005;)
Origem	Possível origem no ducto intercalado (MARGARITescu et al. 2005)	Possível origem no ducto intercalado (NEVES et al. 2007)	Possível origem no ducto intercalado (MARGARITescu et al. 2005)
Padrão de crescimento	Vários padrões de crescimento: tubular, cribriforme, sólido e membranoso (BHAGAT SINGH et al. 2015)	Padrão morfológico: tubular, trabecular, cribriforme, sólido e membranoso (ZARBO et al. 2000; NAZEER et al. 2014)	Padrão de crescimento: sólido, mixóide e reticular (JAEGER et al. 1997; LEE et al. 2005)

1.3 CARACTERIZAÇÃO DOS TUMORES DE GLÂNDULA SALIVAR COM DIFERENCIAÇÃO MIOEPITELIAL POR IMUNOISTOQUÍMICA

Em relação às glândulas salivares, a expressão de várias proteínas tem sido avaliada para a caracterização das células tumorais e estabelecimento de diferenças entre os tipos de neoplasias (ARAÚJO et al. 1994, 2000; RAITZ e ARAÚJO 2004; RODRIGUES JÚNIOR 2008; BALACHANDER et al. 2015; CHITTURI et al. 2015).

Considerando as células mioepiteliais, a expressão de vimentina, calponina, S-100, GFAP, miosina, desmina, citoceratinas, actina de músculo liso (α -AML), entre outras tem sido empregada para sua identificação. Contudo, um marcador universal para as células mioepiteliais normais e neoplásicas ainda não foi identificado (ARAÚJO et al. 1994, 2000; FOSCHINI et al. 2000; RAITZ e ARAÚJO 2004; RODRIGUES JÚNIOR 2008; IANEZ et al. 2010; BALACHANDER et al. 2015; CHITTURI et al. 2015; SHAH et al. 2016; MUTLU et al. 2017). Nos Quadros 3 e 4 estão descritas algumas proteínas que são utilizadas para a identificação das células mioepiteliais neoplásicas.

A citoceratina, vimentina, actina de músculo liso, calponina e caldesmon são proteínas do citoesqueleto, o qual é definido como uma estrutura formada por uma rede complexa de proteínas que proporciona o suporte estrutural da célula e mobilidade das organelas intracelulares, além de compor uma estrutura para movimentação e separação de cromossomos

durante a divisão celular. Dessa forma, essas proteínas são fundamentais para a mobilidade celular e determinam a forma da célula (MARTINS et al. 2002; SANDBO et al. 2016; XIANG et al. 2017).

O colágeno é uma proteína da matriz extracelular, que é uma estrutura composta por várias proteínas que oferecem condições para o crescimento e diferenciação celular, favorecendo a sobrevivência dos tecidos. Sua constituição por proteínas fibrosas e glicoproteínas proporciona adesão célula-célula e célula-matriz. No ambiente tumoral, pode contribuir para os processos de invasão e metástase (PEREIRA et al. 2005; DESHMUKH et al. 2016).

Quadro 3 - Proteínas do citoesqueleto utilizadas para a caracterização de células mioepiteliais neoplásicas

PROTEÍNAS DO CITOESQUELETO			
Proteína	Tipo de Tumor Benigno	Localização da expressão da proteína	Referências
AME (Actina Músculo Específica)	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma	Células externas das estruturas glandulares; células mioepiteliais normais e pode ser parcial ou totalmente substituída pela vimentina nas células mioepiteliais neoplásicas	NATHRATH et al. 1982; SCIUBBA e BRANNON 1982; HARA et al. 1983; SATO et al. 1984; ARAÚJO e ARAÚJO 1990; ARAÚJO et al. 1994; TAKAI et al. 1995; ARAÚJO e SOUSA 1996; MACHADO DE SOUSA et al. 2001; RAITZ e ARAÚJO 2004.
Actina	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma e Adenoma de células basais	Parcial ou totalmente substituída pela vimentina no adenoma de células basais e mioepitelioma, e encontrada fora dos ductos e células poligonais no adenoma pleomórfico	ARAÚJO et al. 1994; TAKAI et al. 1995; IANEZ et al. 2010; DE PAULA et al. 2017.
α-SMA (alfa actina músculo liso)	Adenoma Pleomórfico, adenoma de células Basais e Mioepitelioma	Células fusiformes, não luminais de estruturas ductais	FOSCHINI et al. 2000; OGAWA 2003; FURUSE et al. 2005; RODRIGUES JÚNIOR 2008; MARTINEZ et al. 2012, MARTINEZ et al. 2015.
HHF35	Mioepitelioma, Adenoma Pleomórfico	Células fusiformes, não luminais de estruturas ductais, áreas mixódes	FRANQUEMONT e MILLS 1993; MACHADO DE SOUSA et al. 2001; CAVALCANTE et al. 2007; RODRIGUES JÚNIOR 2008
CK5	Adenoma Pleomórfico	Células não luminais	FRANQUEMONT e MILLS 1993, OGAWA et al. 1999, OGAWA et al. 2000, OGAWA 2003.
CK14	Adenoma Pleomórfico, Adenoma de Células Basais	Fusiformes, epitelióides, plasmocitóide, células externas das estruturas glandulares	ARAÚJO e ARAÚJO 1990; FRANQUEMONT e MILLS 1993; ARAÚJO e SOUSA 1996; OGAWA et al. 1999; OGAWA et al. 2000; MACHADO DE SOUSA et al. 2001; OGAWA 2003; RAITZ e ARAÚJO 2004; SILVEIRA et al. 2006
Vimentina	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma, Adenoma de Células Basais, Adenoma epitelial-mioepitelial	Todos os tipos celulares, células não luminais, estruturas ductais e áreas condromixóides	ARAÚJO e ARAÚJO 1990; FRANQUEMONT e MILLS 1993; ARAÚJO et al. 1994; TAKAI et al. 1995; ARAÚJO e SOUSA 1996; ARAÚJO et al. 2000; MACHADO DE SOUSA et al. 2001; OGAWA 2003; FURUSE et al. 2005; SILVEIRA et al. 2006; RODRIGUES JÚNIOR 2008; DEIHIMY et al. 2008, MARTINEZ et al. 2015, MUTLU et al. 2017.
Calponina	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma, Adenoma de células Basais	Células plasmocitóides, poligonais, Células fusiformes e plasmocitóides, não luminais de estruturas ductais, células periféricas dos lençóis em casos sólidos	GIMONA et al. 1990; FOSCHINI et al. 2000; OGAWA 2003; FURUSE et al. 2005; CAVALCANTE et al. 2007; RODRIGUES JÚNIOR 2008; IANEZ et al. 2010; DE PAULA et al. 2017.
Caldesmon	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma, Adenoma de Células Basais	Células mioepiteliais	FOSCHINI et al. 2000; OGAWA 2003; FURUSE et al. 2005; RODRIGUES JÚNIOR 2008; IANEZ et al. 2010; DE PAULA et al. 2017.
S-100	Mioepitelioma, Adenoma Pleomórfico	Células fusiformes, poligonais e plasmocitóides	FRANQUEMONT e MILLS 1993; OGAWA 2003; FURUSE et al. 2005; DEIHIMY et al. 2008.
Desmina	Mioepitelioma	Células mioepiteliais fusiformes	FRANQUEMONT e MILLS 1993; OGAWA 2003.

Quadro 4 - Proteínas da matriz extracelular utilizadas para a caracterização de células mioepiteliais neoplásicas

PROTEÍNAS DA MATRIZ EXTRACELULAR			
Proteínas	Tipo de Tumor Benigno	Localização da expressão da proteína	Referências
Laminina	Adenoma Pleomórfico	Estruturas ductiformes e tubulares, na periferia de grupos de células sólidas, aparecendo como uma cada contínua ou não e algumas vezes focal, e em todos os tipos de estroma, células mioepiteliais fusiformes	CASELITZ 1987; SAKU et al. 1990; CHENG et al. 1991; SKALOVA e LEIVO 1992; FELIX et al. 1999; RAITZ et al. 2003; RAITZ e ARAÚJO 2004.
Fibronectina	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma	Estruturas tubulares, na periferia de grupos de células sólidas, aparecendo como uma cada contínua ou não e algumas vezes focal, e em todos os tipos de estroma, células mioepiteliais fusiformes	RAITZ et al. 2003; MARTINEZ et al. 2012; MARTINEZ et al. 2015
Tenascina	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma	Em torno de estruturas epiteliais ductais, estroma hialino, Estruturas tubulares, na periferia de grupos de células sólidas, aparecendo como uma cada contínua ou não e algumas vezes focal, e em todos os tipos de estroma, células mioepiteliais plasmocitóides	SOINI et al. 1992; SUNARDHI-WIDYPUTRA E VAN DAME 1993; SHRESTHA et al. 1994; SHINTANI et al. 1997; RAITZ et al. 2003.
Colágeno tipo I e IV	Adenoma Pleomórfico, Mioepitelioma e Adenoma de Células basais	Estruturas ductais e tubulares, na periferia de grupos de células sólidas, aparecendo como uma cada contínua ou não e algumas vezes focal, e em todos os tipos de estroma, células mioepiteliais fusiformes	CASELITZ 1987; SKALOVA e LEIVO 1992; FELIX et al. 1999; RAITZ et al. 2003; MARTINEZ et al. 2012; MARTINEZ et al. 2015.

As citoceratinas (CK) são proteínas dos filamentos intermediários das células epiteliais associadas com a diferenciação e organização do citoesqueleto, sendo expressas em células epiteliais específicas dependendo do seu estágio de diferenciação. Em glândulas normais, a citoceratina é positiva em células mioepiteliais dos ductos intercalares e em células basais do ducto excretor. A presença desta, permite que as células constituam uma rede elástica que as une com a membrana basal para resistir ao estresse mecânico, além de contribuir para a cito-arquitetura e integridade estrutural, realizando a ancoragem dessas células após a diferenciação (FUCHS e CLEVELAND 1998). A marcação de CK14 nas

células externas das estruturas glandulares supõe que esse seja o momento em que o tumor melhor reproduza o segmento do ducto intercalado da glândula salivar normal, indicando um maior grau de diferenciação da neoplasia (RAITZ e ARAÚJO 2004).

A vimentina é um filamento intermediário encontrado nas células de origem mesenquimal e neuroectodermal, que está relacionado com miofilamentos e células de adesão (ARAÚJO e ARAÚJO 1990; GUSTAFSSON et al. 1998).

ARAÚJO e ARAÚJO (1990) e MACHADO DE SOUSA et al. (2001) não detectaram vimentina no parênquima de glândulas salivares normais em desenvolvimento ou adultas, e consideraram esse filamento como um dos indicadores mais precoces da diferenciação mioepitelial no adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma epitelial-mioepitelial, adenoma de células basais, carcinoma adenóide cístico, carcinoma epitelial-mioepitelial e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade. ARAÚJO et al. (1994) também mostraram que as células mioepiteliais permanecem expressando vimentina, sugerindo que nos tumores de glândula salivar a célula mioepitelial raramente alcança completa diferenciação. Segundo RODRIGUES JÚNIOR (2008), a vimentina foi o melhor marcador de células mioepiteliais neoplásicas nos casos de adenoma pleomórfico, mioepitelioma e carcinoma adenóide cístico, seguido por α -AML (α -actina músculo liso) e calponina no adenoma pleomórfico e carcinoma adenóide cístico.

Contudo, a vimentina não é um marcador exclusivo de célula mioepitelial neoplásica, pois a mesma é necessária para migração de

células epiteliais em processos patológicos e fisiológicos, e pode ser expressa por outras células originárias do ducto intercalar (ARAÚJO et al. 2000).

A calponina é uma proteína que se liga à actina, calmodulina e tropomiosina, sendo encontrada nos tecidos musculares lisos (TANIGUCHI 2005; LIU e JIN 2016). Ela participa do citoesqueleto das células musculares lisas, desempenhando papel na regulação da contração do músculo (TAKAI et al. 1995; LIU e JIN, 2016). Segundo GIMONA et al. (1990), a calponina se acumula durante a diferenciação e desaparece durante a proliferação das células musculares lisas, sugerindo que essa proteína é potencialmente útil como marcador de diferenciação do músculo liso.

A proteína caldesmon é uma proteína reguladora que se liga à actina, miosina, tropomiosina e calmodulina (PRITCHARD e MOODY 1986). A isoforma h-caldesmon (do inglês, *high molecular weight isoform*) é encontrada em células da musculatura lisa. Essa proteína parece ter, como a calponina, um papel regulador na contração muscular, impossibilitando ou favorecendo a interação e o deslizamento sobre a actina e miosina, e sua localização é quase que exclusivamente no domínio contrátil da célula muscular lisa (SOBUE e SELLERS 1991; CARMICHAEL et al. 1994).

Em glândula salivar normal, alguns estudos mostram um papel da matriz extracelular na morfogênese e diferenciação, particularmente a laminina e o colágeno tipo IV (BATSAKIS 1980; KIBBEY et al. 1992). E em tumores de glândula salivar, observa-se a participação da laminina e do

colágeno tipo IV no estroma do adenoma pleomórfico e no carcinoma adenoide cístico (CHENG et al. 1991; SAKU et al. 1990).

Neste estudo, foram empregados marcadores considerados clássicos nos estudos das células mioepiteliais, a saber: citoceratina 14 (CK14), actina de músculo liso alfa (AML), vimentina, h-caldesmon, calponina e colágeno IV (Figura 3).

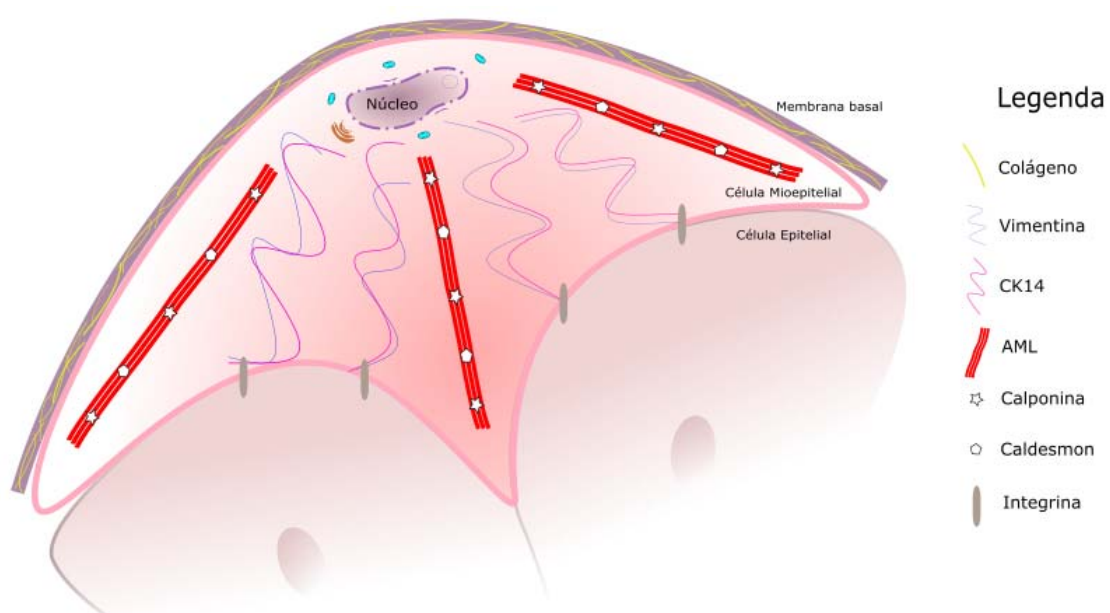


Figura 3 - Imagem ilustrativa da célula mioepitelial. Representação esquemática da estrutura de uma célula mioepitelial e proteínas utilizadas na sua caracterização.

1.4 JUSTIFICATIVA

Há um espectro de lesões de glândulas com variável composição de células mioepiteliais e que apresentam padrões histológicos distintos: predominância de células mioepiteliais no mioepitelioma e adenoma pleomórfico e participação parcial das células mioepiteliais no adenoma de células basais. Essas variações histológicas implicam em dificuldades no diagnóstico e nomenclatura para esses tumores. Diversos estudos têm sido realizados visando a identificação de células mioepiteliais em glândulas salivares para auxiliar no diagnóstico morfológico desses tumores. Contudo, os estudos avaliam poucos marcadores isoladamente e um marcador apropriado para as células mioepiteliais em condições normais e neoplásicas ainda não está definido. Uma alteração genética frequentemente encontrada no adenoma pleomórfico é o rearranjo envolvendo o gene PLAG1 (do inglês, *Pleomorphic Adenoma Gene 1*). Contudo, ainda é controverso se outros tumores com participação de células mioepiteliais também apresentam esse rearranjo. Dessa forma, o estudo de proteínas expressas pelas células mioepiteliais em neoplasias benignas das glândulas salivares utilizando um painel de proteínas do citoesqueleto, proteína da matriz extracelular e proteína PLAG1, poderia levar à determinação de um painel de marcadores para a identificação dos diferentes tumores de glândula salivar bem como fornecer informações sobre o papel dessas células no processo de tumorigênese desses tumores.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliação da expressão de um painel de proteínas de citoesqueleto, proteína da matriz extracelular e da proteína PLAG1 em neoplasias benignas das glândulas salivares

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar por imunistoquímica a expressão das proteínas citoceratina 14, vimentina, actina de músculo liso, calponina, caldesmon, colágeno IV e PLAG1 em amostras de adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma
- Verificar se os tumores benignos de glândula salivar com participação diferencial das células mioepiteliais podem ser classificados de acordo com o perfil de expressão dessas proteínas
- Associar a expressão das proteínas com características demográficas, clínicas e patológicas

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo retrospectivo, onde foram selecionadas neoplasias benignas de origem em glândulas salivares maiores e menores, com sabida participação de componente mioepitelial: 28 amostras de adenoma pleomórfico (11 com predomínio de material mixóide e 17 com predomínio celular), 3 amostras de mioepitelioma e 5 amostras de adenoma de células basais. Como controles do estudo, 3 amostras de glândulas salivares histologicamente normais, provenientes de margens cirúrgicas, foram incluídas. Todos os espécimes utilizados na pesquisa foram provenientes de pacientes submetidos à biópsia/cirurgia no período de 1980 a 2016 no A.C.Camargo Cancer Center, e com material fixado em formalina e embocado em parafina armazenado no arquivo do Departamento de Anatomia Patológica desta Instituição. Foram incluídos neste estudo casos com confirmação diagnóstica revista por dois patologistas e foram excluídos os casos que apresentaram blocos de parafina com material suficiente. Dados clínico-demográficos e características histopatológicas de cada caso foram estudados nos prontuários arquivados no SAME do A.C.Camargo Cancer Center.

Os cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina de cada caso foram analisadas, com o auxílio de um patologista, para checagem das

estruturas glandulares presentes e seleção do material a ser utilizado na pesquisa. Após a escolha dos fragmentos a serem utilizados na pesquisa, os blocos de parafina foram separados e cortes histológicos desse material, com 3 μ m de espessura, foram submetidos à técnica de imunohistoquímica.

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C.Camargo Cancer Center em 10/11/2015 (protocolo número 2103/15) (Anexo 1).

3.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Os espécimens preparados foram desparafinizados em 3 banhos de xilol por 5 minutos. O tecido foi re-hidratado em soluções de etanol/água e as lâminas lavadas em água.

A recuperação antigênica, que é um processo que resulta na exposição de epítomos antigênicos do material, foi realizada por tratamento com calor na presença de: citrato de sódio pH 6.0 ou EDTA/Tris pH 9.0, utilizando-se panela de pressão, de acordo com a padronização de cada anticorpo primário (Quadro 5).

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

Em seguida, realizado o bloqueio de proteínas inespecíficas utilizando-se a solução *Protein Block* (Dako) por 20 minutos. As lâminas

foram, então incubadas por 1 hora em temperatura ambiente com o anticorpo específico.

O complexo antígeno-anticorpo foi visualizado por meio do sistema de detecção *HiDef* (Cell Marque). 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 positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado. Os controles negativos das reações foram realizados por meio de incubação dos cortes histológicos com soro primário não reagente. As reações para os anticorpos vimentina, actina músculo liso, caldesmon e colágeno tipo IV foram realizadas em sistema automatizado Ventana (Roche). As reações foram analisadas em microscópio óptico convencional por 2 pesquisadores e foram consideradas positivas quando as células analisadas nos espécimes apresentavam coloração castanho-dourada; a positividade foi analisada morfolologicamente de acordo com a área dos cortes estudados e os dados foram tabulados de forma descritiva e semi-quantitativa. 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 focal (10% - <33% das células marcadas), 2, positivo difuso (>33% - 90%) e positivo forte (>90%) (Adaptado de PRASAD et al. 2008). Na análise descritiva foi avaliada a localização da marcação (núcleo, citoplasma, membrana) e o padrão de marcação (difuso, focal).

Quadro 5 - Anticorpos primários, clones, procedência, diluição, recuperação antigênica, controles positivos e padrão de marcação

Soro primário	Clone	Procedência	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
Calponina	EP798Y	Cell Marque	1:100	EDTA/Tris pH9,0, panela de pressão 15'	Mama	Citoplasma
Caldesmon	E89	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Intestino	Citoplasma
Actina Músculo liso	1A4	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Útero	Citoplasma
Vimentina	V9	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Placenta	Citoplasma
Citoceratina 14	LL002	Cell Marque	1:500	Citrato pH6,0, panela de pressão 15'	Carcinoma espinocelular	Citoplasma
Colágeno tipo IV	CIV22	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Pulmão	Membrana Basal
PLAG1	3B7	Novus Biologicals	1:100	EDTA/Tris pH9,0, panela de pressão 15'	Adenoma pleomórfico	Nuclear

3.3 ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

Para fins de análise de clusterização hierárquica não supervisionada, a expressão das proteínas foi categorizada de forma semi-quantitativa (conforme descrição no item 3.2). Para a construção da clusterização hierárquica foi utilizada a função heatmap.2 disponível no pacote gplots (versão 3.0.1) e obtido no repositório bioconductor (<https://www.bioconductor.org/>). O programa utilizado nessa análise foi o R (<https://www.r-project.org/>).

3.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de associação das variáveis qualitativas foi avaliada pelo teste qui-quadrado ou exato de Fisher quando apropriado. O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o software SPSS (versão 20).

4 RESULTADOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram selecionados 36 pacientes diagnosticados com tumores benignos das glândulas salivares, correspondendo a 28 casos de adenoma pleomórfico, 5 casos de adenoma de células basais e 3 casos de mioepitelioma. Imagens representativas de alguns casos selecionados podem ser observadas na Figura 2.

4.2 DADOS DEMOGRÁFICOS, CLÍNICOS E PATOLÓGICOS

Os dados demográficos, clínicos e patológicos foram coletados e estão descritos na Tabela 1. As informações disponíveis dos pacientes com adenoma pleomórfico mostram que 19 pacientes eram mulheres e 9 homens, com a idade variando entre 12 e 78 anos de idade (média das idades = 40,6 anos). O local mais frequentemente acometido foi a parótida. Onze casos apresentaram padrão histológico pouco celular, com predominância mixóide e 17 casos apresentaram padrão celular, com predominância de lençóis de células mioepiteliais de fenótipo plasmocitóide.

Das informações disponíveis dos pacientes com mioepitelioma, 2 eram do sexo masculino e 1 do sexo feminino, com a idade variando entre 35 e 62 anos de idade (média das idades = 44,0 anos).

Das informações disponíveis dos pacientes com adenoma de células basais, 2 eram do sexo masculino e 3 do sexo feminino, com a idade variando entre 23 e 79 anos de idade (média das idades = 54,0 anos). Todos os casos acometeram a parótida.

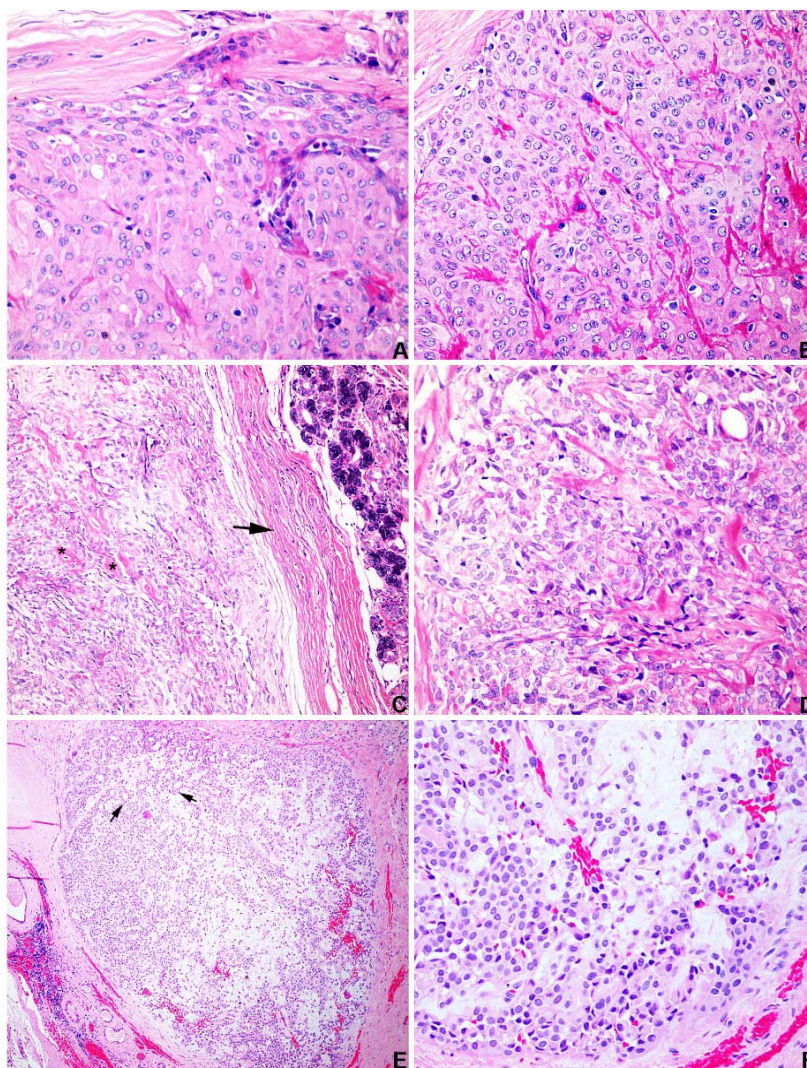


Figura 4 - Aspectos histopatológicos de tumores benignos de glândulas salivares. A e B, adenoma de células basais. Neoplasia basalóide encapsulada. Células neoplásicas com núcleo basofílico e citoplasma amplo; C e D, mioepitelioma. Neoplasia encapsulada (seta) composta majoritariamente por células mioepiteliais de citoplasma claro. Em algumas regiões notam-se formações hialinas (asterisco); E e F, adenoma pleomórfico. Neoplasia bem delimitada composta por células mioepiteliais, formações ductais (E, seta) e estroma hialino e frouxo (mixóide). Células epiteliais de fenótipo plasmocitóide.

Tabela 1 - Características demográficas, clínicas e patológicas dos pacientes com tumores benignos de glândula salivar: adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais

Característica	Categoria	Adenoma pleomórfico	Mioepitelioma	Adenoma de células basais
		Número de pacientes (%)	Número de pacientes (%)	Número de pacientes (%)
Gênero	Masculino	9 (34,1)	2 (70,0)	2 (40,0)
	Feminino	19 (67,9)	1 (30,0)	3 (60,0)
Raça	Branca	16 (57,1)	1 (33,3)	1 (20,0)
	Não branca	4 (14,3)	0 (0,0)	1 (20,0)
	N/D*	8 (28,6)	2 (66,7)	3 (60,0)
Idade	Média	40,6	44,0	54,0
	Mediana	40,5	35,0	55,0
Localização	Parótida	18 (64,3)	2 (66,7)	5 (100,0)
	Submandibular	6 (21,4)	0 (0,0)	0 (0,0)
	Glândulas salivares menores	4 (14,3)	1 (33,3)	0 (0,0)

*, informação não disponível

4.3 IMUNOISTOQUÍMICA

As reações imunoistoquímicas foram realizadas para as proteínas do citoesqueleto: citoceratina 14, vimentina, actina, caldesmon e calponina; e a proteína da matriz extracelular: colágeno tipo IV (Figuras 3 e 4 e Tabela 2).

No adenoma pleomórfico a **citoceratina 14** foi detectada nas células epiteliais e mioepiteliais ao redor das estruturas ductiformes. Nas áreas mais mixóides da neoplasia a expressão dessa proteína foi observada nas células mioepiteliais de fenótipo estrelado e plasmocitóide. No mioepitelioma raras células foram positivas e no adenoma de células basais a positividade foi

observada nas células basais. Nas glândulas salivares histologicamente normais a citoceratina 14 foi expressa nas estruturas ductiformes.

A **actina de músculo liso** foi positiva nas células mioepiteliais ao redor das estruturas ductiformes no adenoma pleomórfico. A positividade foi observada nas células com fenótipo estrelado e fusiforme. Já as células plasmocitóides não apresentaram expressão dessa proteína. No mioepitelioma a positividade foi observada na periferia próxima à cápsula tumoral. No adenoma de células basais a positividade foi observada ao redor das estruturas ductiformes e raras células mioepiteliais isoladas foram positivas. Nas glândulas salivares histologicamente normais a expressão foi observada em estruturas ductiformes.

A proteína **caldesmon** foi expressa nas células mioepiteliais (estreladas e fusiformes) ao redor das estruturas ductiformes no adenoma pleomórfico. No mioepitelioma foi expressa nas células mioepiteliais e no adenoma de células basais foi expressa nas células basais. Nas glândulas salivares histologicamente normais a expressão de caldesmon não foi detectada.

A proteína **vimentina** foi amplamente expressa nas células mioepiteliais em todos os tumores avaliados. As células luminiais não apresentaram expressão dessa proteína. Nas glândulas salivares histologicamente normais a expressão foi observada nas células mioepiteliais.

A proteína **calponina** apresentou uma expressão focal ao redor das estruturas ductiformes e também em agrupamentos isolados de células

mioepiteliais no adenoma pleomórfico. No mioepitelioma foi observada expressão em células mioepiteliais isoladas ao redor de estruturas ductiformes. No adenoma de células basais foi observada expressão ao redor das estruturas ductiformes, especialmente em células de fenótipo estrelado. Nas glândulas salivares histologicamente normais a expressão foi observada nas células mioepiteliais.

A proteína **colágeno IV** foi pouco positiva nos tumores estudados, apresentando expressão focal ao redor de estruturas ductiformes no adenoma pleomórfico e no adenoma de células basais. Nas glândulas salivares histologicamente normais a expressão foi observada na membrana basal ao redor dos ácinos.

O resultado da expressão das proteínas nos amostras de glândula salivar está sumarizado na Tabela 3.

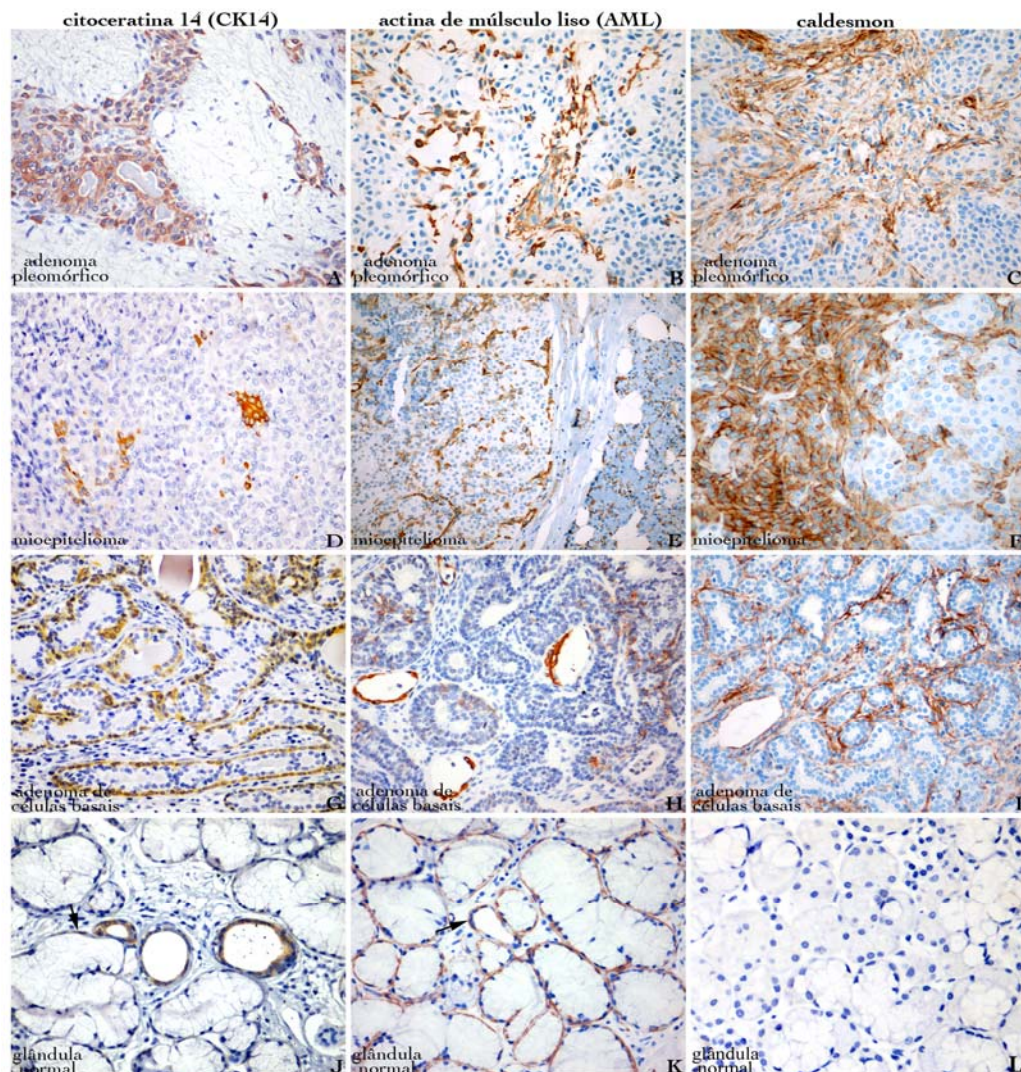


Figura 5 - Expressão das proteínas citoceratina 14, actina de músculo liso e caldesmon em tumores benignos das glândulas salivares. A, D, G, J: expressão de citoceratina 14 (CK14). A, presença de CK14 no citoplasma de células epiteliais e mioepiteliais plasmocitóides no adenoma pleomórfico (x400); D, pequena ilha de células epiteliais positivas para CK14 no mioepitelioma (x400); G, células basais positivas para CK14 no adenoma de células basais (x200); J, presença de CK14 nos ductos excretores extra lobulares e em algumas células mioepiteliais ao redor das unidades acinares (x400); B, E, H, K: expressão de actina de músculo liso (AML). B, presença de positividade para AML em células fusiformes e estreladas no adenoma pleomórfico (x400); E, presença difusa de células positivas para AML no mioepitelioma (x200); H, presença focal de células positivas para AML ao redor das estruturas luminiais (x400); K, expressão forte de AML nas células mioepiteliais ao redor das unidades acinares e ductos intercalares (seta) (x400); C, F, I, L: caldesmon. C, presença difusa de positividade para caldesmon nas células mioepiteliais estreladas e fusiformes (x400); F, presença de positividade nas células mioepiteliais com fenótipo fusiforme e estrelado no mioepitelioma (x400); I, presença de células positivas ao redor das unidades neoplásicas ductiformes (x400); L, a proteína caldesmon não foi detectada nos espécimes de glândulas salivares normais utilizadas como controles (x200).

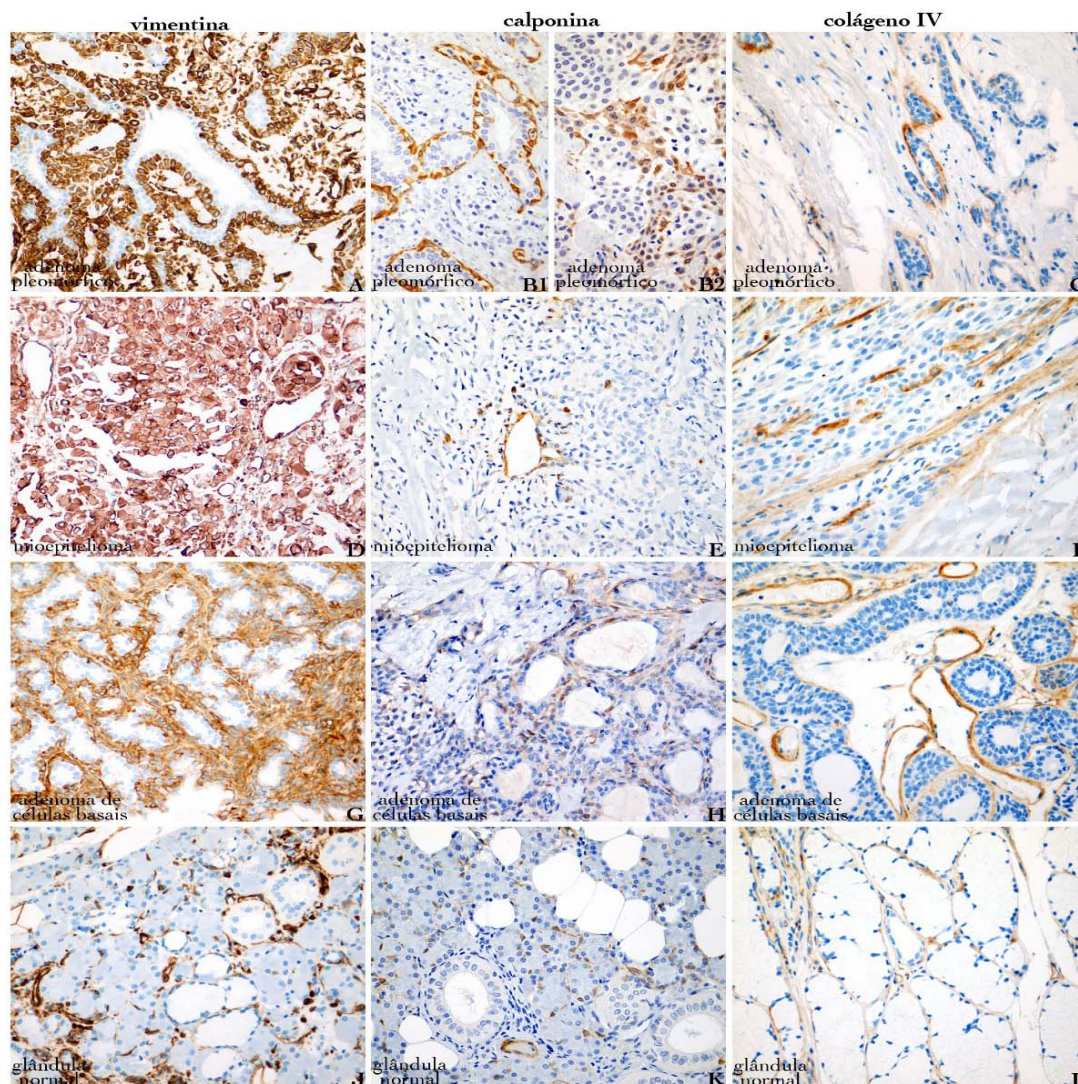


Figura 6 - Expressão das proteínas vimentina, calponina e colágeno IV em tumores benignos das glândulas salivares. A, D, G, J: expressão de vimentina. Em A, D e G expressão difusa de vimentina nas células mioepiteliais do adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais. Em J, expressão de vimentina nas células mioepiteliais que contornam as unidades acinares e ductos intercalares da glândula salivar normal. B1 e 2, E, H, K: expressão de calponina. B1 e B2, presença de positividade para calponina nas células mioepiteliais que contornam as unidades ductais neoplásicas; em E, raras células mioepiteliais positivas para calponina no mioepitelioma; H, positividade para calponina no adenoma de células basais, ao redor de estruturas ductiformes; K, positividade para calponina nas paredes de pequenos vasos na glândula salivar normal; C, F, I, L: expressão de colágeno IV: colágeno IV detectado principalmente na parede dos vasos sanguíneos dos tumores estudados e nas glândulas salivares normais consideradas como controles no estudo. (Aumento original de todas as fotomicrografias: x400).

Tabela 2 - Imunoexpressão das proteínas em amostras de adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais

Proteína	Tecido	Positivo	Negativo	Total de amostras (número/%)*
Citoceratina 14	Adenoma pleomórfico	22 (91,7%)	02 (8,3%)	24 (100,0%)
	Mioepitelioma	01 (33,3%)	02 (66,7%)	03 (100,0%)
	Adenoma de células basais	05 (100,0%)	00 (0,0%)	05 (100,0%)
Actina de músculo liso	Adenoma pleomórfico	24 (100,0%)	00 (0,0%)	24 (100,0%)
	Mioepitelioma	01 (33,3%)	02 (66,7%)	03 (100,0%)
	Adenoma de células basais	02 (50,0%)	02 (50,0%)	04 (100,0%)
Caldesmon	Adenoma pleomórfico	17 (77,3%)	05 (22,7%)	22 (100,0%)
	Mioepitelioma	03 (100,0%)	00 (0,0%)	03 (100,0%)
	Adenoma de células basais	04 (80,0%)	01 (20,0%)	05 (100,0%)
Vimentina	Adenoma pleomórfico	23 (100,0%)	00 (0,0%)	23 (100,0%)
	Mioepitelioma	03 (100,0%)	00 (0,0%)	03 (100,0%)
	Adenoma de células basais	03 (100,0%)	00 (0,0%)	03 (100,0%)
Calponina	Adenoma pleomórfico	18 (72,0%)	07 (28,0%)	25 (100,0%)
	Mioepitelioma	03 (100,0%)	00 (0,0%)	03 (100,0%)
	Adenoma de células basais	03 (100,0%)	00 (0,0%)	03 (100,0%)
Colágeno IV	Adenoma pleomórfico	05 (25,0%)	15 (75,0%)	20 (100,0%)
	Mioepitelioma	00 (0,0%)	02 (100,0%)	02 (100,0%)
	Adenoma de células basais	03 (60,0%)	02 (40,0%)	05 (100,0%)
Plag1	Adenoma pleomórfico	22 (84,6%)	4 (15,4%)	26 (100,0%)
	Mioepitelioma	03 (100,0%)	00 (0,0%)	03 (100,0%)
	Adenoma de células basais	03 (60,0%)	02 (40,0%)	05 (100,0%)

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

Tabela 3 - Distribuição das proteínas citoceratina 14, vimentina, actina de músculo liso, calponina, caldesmon, colágeno tipo IV em amostras de glândula salivar

	Adenoma Pleomórfico	Mioepitelioma	Adenoma de Células Basais	Glândula Salivar Normal
Citoceratina 14	Células epiteliais e mioepiteliais ao redor de estruturas ductiformes	Raras células foram positivas	Células basais	Estruturas Ductiformes
Actina de Músculo liso	Células mioepiteliais ao redor de estruturas ductiformes	Células mioepiteliais na periferia próximo à cápsula tumoral	Ao redor de estruturas ductiformes e em raras células mioepiteliais isoladas	Estruturas Ductiformes
Caldesmon	Células mioepiteliais estreladas e fusiformes ao redor de estruturas ductiformes	Células mioepiteliais	Células basais	Não foi detectada
Vimentina	Células mioepiteliais	Células mioepiteliais	Células mioepiteliais	Células Mioepiteliais
Calponina	Expressão focal ao redor de estruturas ductiformes e agrupamentos isoalados de células mioepiteliais	Células mioepiteliais ao redor de estruturas ductiformes	Células mioepiteliais ao redor de estruturas ductiformes	Células Mioepiteliais
Colágeno IV	Focal ao redor de estruturas ductiformes	Ausência de expressão	Focal ao redor de estruturas ductiformes	Membrana Basal ao redor dos ácinos
PLAG1	Expressão nuclear no parênquima tumoral	Expressão nuclear no parênquima tumoral	Expressão nuclear no parênquima tumoral	Ausência de expressão

4.4 EXPRESSÃO DE PLAG1

A expressão da proteína PLAG1 (utilizada como um indicativo da presença da translocação envolvendo o gene PLAG1) foi investigada por imunohistoquímica nos 36 casos de tumores benignos de glândula salivar em estudo prévio do grupo (dados não publicados). Aumento de expressão de PLAG1 foi observado em 22 (84,6%) dos 26 casos de adenoma pleomórfico avaliáveis; nos 3 (100,0%) casos de mioepitelioma e em 3 (60,0%) dos 5 casos de adenoma de células basais. Nos 2 casos de glândulas salivares histologicamente normais avaliáveis não foi observado o aumento de expressão da proteína. Imagem representativa dessa análise pode ser observada na Figura 7.

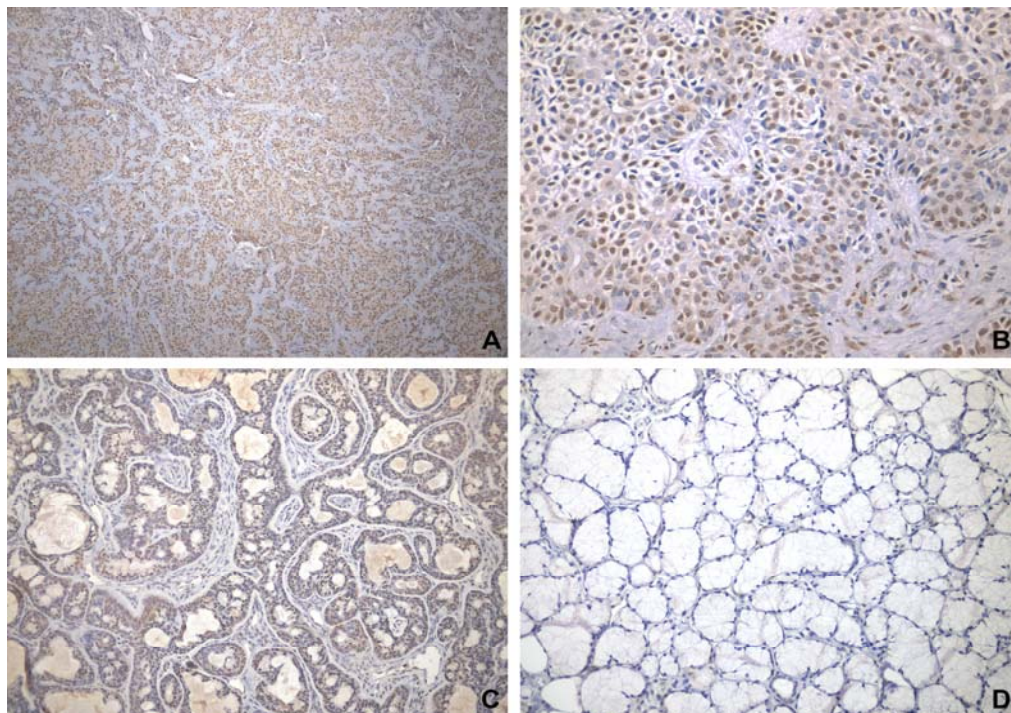


Figura 7 - Expressão da proteína PLAG1 em amostras de glândula salivar. A, expressão de PLAG1 em mioepitelioma; B, expressão de PLAG1 em adenoma pleomórfico; C, expressão de PLAG1 em adenoma de células basais; D, ausência de expressão de PLAG1 em glândula salivar histologicamente normal.

4.5 ANÁLISE DE CLUSTERIZAÇÃO HIERÁRQUICA

A fim de verificar se o perfil de expressão das proteínas citoceratina 14, vimentina, actina, caldesmon, calponina e colágeno tipo IV era capaz de diferenciar os tumores benignos de glândula salivar com participação distinta do componente mioepitelial (adenoma pleomórfico versus mioepitelioma versus adenoma de células basais) foi realizada uma análise de clusterização hierárquica, considerando os valores de expressão semi-quantitativos e a presença/ausência de expressão de PLAG1 (Figura 8).

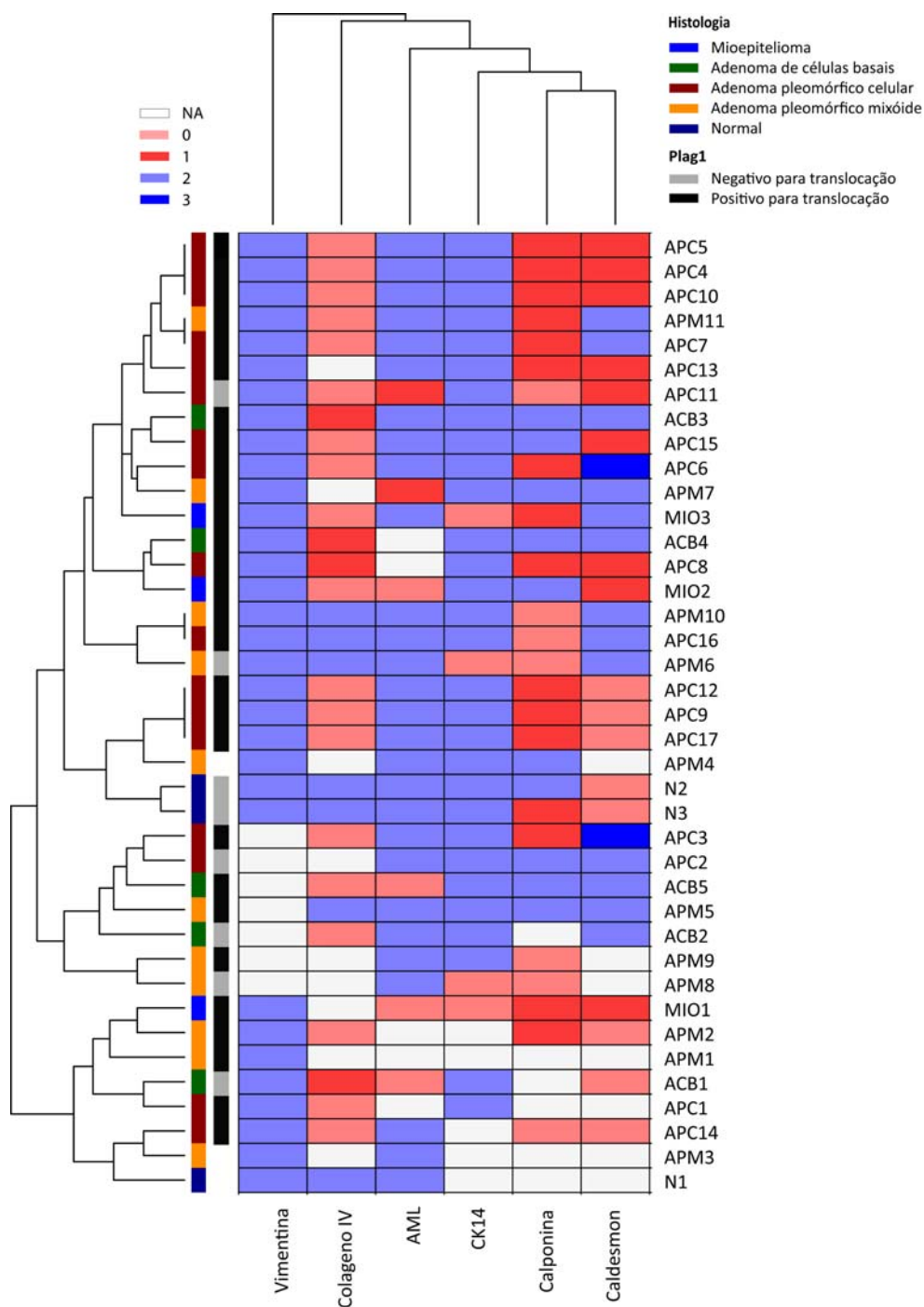


Figura 8 - Perfil de expressão de proteínas nas amostras de adenoma pleomórfico, mioepitelioma, adenoma de células basais e glândulas salivares histologicamente normais. Rosa, ausência de expressão; vermelho, positivo focal; azul claro, positivo difuso; azul escuro, positivo forte; branco, expressão não avaliável. Dendrograma baseado na expressão das proteínas vimentina, colágeno IV, actina de músculo liso (AML), citoceratina 14 (CK14), calponina e caldesmon.

Foi observada a formação de 2 *clusters*. Um *cluster* contendo 8 amostras (1 mioepitelioma, 1 adenoma de células basais, 5 adenomas pleomórficos e 1 glândula salivar histologicamente normal) denominado cluster A e outro contendo 31 amostras (2 mioepiteliomas, 4 adenomas de células basais, 23 adenomas pleomórficos e 2 glândulas salivares histologicamente normais) denominado cluster B.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Comparando-se a expressão das proteínas nos diferentes tumores, foi observada uma maior expressão da proteína AML nos casos de adenoma pleomórfico ($p=0,001$). A proteína CK14 foi mais expressa nos casos de adenoma de células basais e adenoma pleomórfico. Contudo, não houve associação estatisticamente significativa ($p=0,062$).

Considerando-se as variáveis demográficas, clínicas e patológicas não houve associação estatisticamente significativa das proteínas com nenhuma das características avaliadas. Foi observado que os casos de adenoma pleomórfico mais celulares apresentam menor expressão de colágeno. Contudo, não houve associação estatisticamente significativa ($p=0,073$).

Comparando-se a expressão das proteínas entre si, foi observada uma associação estatisticamente significativa ($p=0,031$) entre a expressão de calponina e PLAG1.

Considerando a análise de clusterização hierárquica, foi observado que o *cluster* B apresentou maior expressão da proteína caldesmon quando comparado com o *cluster* A ($p= 0,018$). A proteína AML também foi mais expressa no *cluster* B. Contudo, não houve associação estatisticamente significativa ($p=0,070$).

5 DISCUSSÃO

Os tumores de glândulas salivares compreendem um grupo heterogêneo de lesões, apresentando diferentes características histológicas. De incidência variável, apresentam-se com relativa similaridade clínica (LIMA et al. 2005; OGAWA et al. 2008). A variedade histológica apresentada por essas lesões tem sido atribuída ao componente mioepitelial das mesmas (BATSAKIS et al. 1983; ELLIS e AUCLAIR 1996; REDDER et al. 2013; CHITTURI et al. 2015; BALACHANDER et al. 2015; SHAH et al. 2016).

O mioepitelioma, o adenoma pleomórfico e o adenoma de células basais são tumores benignos, derivados da porção intercalar das glândulas salivares e cujo componente mioepitelial se destaca (LIMA et al. 2005; OGAWA et al. 2008; MENDENHALL et al. 2008; LINGAM et al. 2011; JO 2015; WILSON et al 2016; SEETHALA 2017; SEETHALA e STENMAN 2017). Contudo, cada tipo histológico exibe algumas particularidades, e devido às suas características histológicas, ainda há controvérsia na literatura se esses tumores representam lesões diferentes ou representam um espectro de uma mesma lesão (MARGARITescu et al. 2005; NEVES et al. 2007; DEIHIMY et al. 2008).

Estudos têm sido realizados visando a identificação de células mioepiteliais em tumores de glândula salivar. Os marcadores imunoistoquímicos para as células mioepiteliais incluem os marcadores das proteínas de músculo liso (alfa-actina de músculo liso (α -AML), miosina, h-

caldesmon e calponina), os marcadores de filamentos inermediários (CK14, 5, 17, vimentina) entre outros (RAITZ e ARAÚJO 2004; OGAWA 2003; IANEZ et al. 2010; REDDER et al. 2013; BALACHANDER et al. 2015; CHITTURI et al. 2015; SHAH et al. 2016). Contudo, um marcador apropriado para as células mioepiteliais em condições normais e neoplásicas ainda não está definido.

Os marcadores avaliados na pesquisa foram empregados por serem considerados clássicos nos estudos das células mioepiteliais, e serão discutidos individualmente a seguir, associando-se ao contexto clínico-patológico dos pacientes.

Em nosso estudo, foi observada expressão de **citoceratina 14 (CK14)** em todos os tumores e na glândula salivar histologicamente normal. CK14 foi mais expressa no adenoma de células basais. Contudo, esse resultado não foi estatisticamente significativo. O mioepitelioma apresentou rara positividade. Outros estudos também demonstraram expressão variável de CK14 em mioepitelioma (FRANQUEMONT e MILLS 1993; RAITZ e ARAÚJO 2004; ARAÚJO et al. 2000; SILVEIRA et al. 2006). A presença de CK14 permite que as células constituam uma rede elástica que as unem com a membrana basal para resistir ao estresse mecânico, além de contribuir para a citoarquitetura e integridade estrutural, onde a CK14 realiza a ancoragem das células mioepiteliais e basais do ducto excretor (FUCHS e CLEVELAND 1998).

Com relação ao adenoma pleomórfico, no qual observamos positividade de CK14 nas células epiteliais e mioepiteliais, esses resultados

também foram observados por RAITZ e ARAÚJO (2004) e OGAWA et al. (2000).

Nos casos de adenoma de células basais, CK14 foi positiva em células basais. Já MACHADO DE SOUSA et al. (2001), descreveu ausência de expressão em áreas sólidas do adenoma de células basais, sendo observada positividade em estruturas ductiformes. MONTALLI et al. (2014) observaram expressão de CK14 em células mioepiteliais do adenoma de células basais.

Considerando a glândula salivar normal, nossos resultados concordam com FUCHS e CLEVELAND (1998) que encontraram expressão de CK14 nos ductos excretorios, e também observaram nas células mioepiteliais dos ductos intercalares. ARAÚJO et al. (2000) observaram a expressão de CK14 na glândula salivar normal.

Em nosso estudo observamos expressão variável de **actina músculo liso (AML)**: predominante no adenoma pleomórfico, em 50% dos casos de adenoma de células basais e em cerca de 30% dos casos de mioepitelioma, sendo a expressão de AML associada ao adenoma pleomórfico.

RODRIGUES JÚNIOR (2008), observaram expressão dessa proteína em algumas células fusiformes, expressão ocasional em células plasmocitóides e poligonais e expressão variável em áreas mixóide do mioepitelioma. Já SILVEIRA et al. (2006), descreveram ausência de AML em amostras de mioepiteliomas.

Considerando o adenoma pleomórfico, nossos resultados também estão de acordo com RODRIGUES JÚNIOR (2008) e FURUSE et al. (2005).

RODRIGUES JÚNIOR (2008) observaram ainda expressão ocasional em células poligonais e em áreas mixóides, e expressão negativa em células plasmocitóides, luminais, em áreas condróide e em metaplasia escamosa. Já ZAIB et al. (2014) observaram que a maioria dos casos de adenoma pleomórfico não apresentaram expressão de AML.

O adenoma de células basais apresentou raras células mioepiteliais isoladas positivas para AML, concordando com os resultados de MACHADO DE SOUSA et al. (2001). SILVEIRA et al. (2006), ao contrário, observaram que a AML foi frequentemente expressa nesse tumor. ZARBO et al. (2000) observaram expressão de AML no adenoma de células basais e BHAGAT SINGH et al. (2015) observaram expressão fraca a moderada de AML nos casos de adenoma de células basais e adenoma pleomórfico.

ARAÚJO et al. (1994) não observaram positividade para actina no adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma, sugerindo que esta proteína seria parcialmente substituída por vimentina nas células mioepiteliais neoplásicas, pois a vimentina foi observada em todas as neoplasias estudadas por estes autores. TAKAI et al. (1995) e OGAWA et al. (2000), também observaram expressão negativa ou variável no adenoma pleomórfico e mioepitelioma.

Expressão de AML também foi observada nas glândulas salivares histologicamente normais, concordando com o estudo de DARDICK et al. (1992) e IANEZ et al. (2010). Segundo CHITTURI et al. (2015) e BALACHANDER et al. (2015), a expressão de actina de músculo liso nas células mioepiteliais tumorais tem sido procedimento diagnóstico padrão.

Caldesmon foi predominantemente expressa nos tumores de glândula salivar avaliados em nosso estudo. Já RODRIGUES JÚNIOR (2008) não observaram a expressão dessa proteína em mioepitelioma e adenoma pleomórfico. OGAWA et al. (2000) observaram rara expressão de caldesmon em adenoma pleomórfico. Já FURUSE et al. (2005) também não observaram essa proteína nos casos de adenoma pleomórfico sugerindo que a expressão ocorra em células bem diferenciadas.

Em nosso estudo não foi observada a expressão de caldesmon nas glândulas normais. OGAWA et al. (2000) observaram expressão variável dessa proteína em glândulas normais.

A **vimentina** foi amplamente expressa em todos os tumores avaliados em nosso estudo. Considerando os mioepiteliomas, muitos estudos demonstram expressão de vimentina (FRANQUEMONT e MILLS 1993; ARAÚJO et al. 1994, 2000; TAKAI et al. 1995; FURUSE et al. 2005; SILVEIRA et al. 2006; CAVALCANTE et al. 2007). SILVEIRA et al. (2006) observaram vimentina em todos os tipos celulares, concordando com ARAÚJO et al. (2000).

Diversos estudos utilizando como modelo o adenoma pleomórfico observaram expressão de vimentina na maioria das células não luminais, fusiformes, plasmocitóides, poligonais, em áreas mixóide e condróide e ausência de expressão em área de metaplasia escamosa e células luminais (ARAÚJO et al. 1994, 2000; FURUSE et al. 2005; CAVALCANTE et al. 2007; RODRIGUES JÚNIOR 2008; DEIHIMY et al 2008).

ARAÚJO et al. (1994), observaram no adenoma de células basais que a vimentina foi presente em grande número de células não luminais e marcação mais evidente de vimentina foi vista nas células mioepiteliais modificadas, hialinas ou plasmocitóides do adenoma pleomórfico e mioepitelioma. Segundo ARAÚJO et al. (2000), a vimentina está sempre presente em células mioepiteliais neoplásicas, porém, não é marcador exclusivo dessas células pois pode ser expressa por outras células originárias do ducto intercalar.

Em nosso trabalho, foi observada a expressão de vimentina nas células mioepiteliais que contornam as unidades acinares e ductos intercalares da glândula salivar histologicamente normal. Ao contrário, ARAÚJO e ARAÚJO (1990) não detectaram vimentina no parênquima da glândula normal, sugerindo que esse filamento seja um dos indicadores precoces da diferenciação mioepitelial neoplásica, baseado na observação de sua presença em todas as neoplasias de glândula salivar com participação da célula mioepitelial (ARAÚJO et al. 1994; FURUSE et al. 2005; CAVALCANTE et al. 2007). As glândulas salivares histologicamente normais utilizadas em nosso estudo são provenientes de margens cirúrgicas, portanto, apesar de histologicamente normais podem apresentar alguma alteração molecular.

A expressão de **calponina**, uma proteína músculo liso específica, foi predominantemente observada nos tumores de glândula salivar avaliados em nosso estudo.

Nos casos de mioepitelioma, foi observada expressão de calponina em células mioepiteliais isoladas ao redor de estruturas ductiformes, concordando com os resultados de RODRIGUES JÚNIOR (2008), que também observaram calponina em células não luminais, fusiformes, plasmocitóides, poligonais, concordando com CAVALCANTE et al. (2007) e FURUSE et al. (2005).

Em nosso estudo, a expressão de calponina nos casos de adenoma pleomórfico foi observada em padrão focal ao redor das estruturas ductiformes e também em agrupamentos isolados de células mioepiteliais. Outros estudos mostram que essa proteína pode ser observada em células não luminais, fusiformes, poligonais e plasmocitóides (FURUSE et al. 2005; CAVALCANTE et al. 2007; RODRIGUES JÚNIOR 2008).

Já nos casos de adenoma de células basais, a expressão de calponina foi observada ao redor das estruturas ductiformes, especialmente em células de fenótipo estrelado. ZARBO et al. (2000) observaram expressão de calponina no adenoma de células basais e BHAGAT SINGH et al. (2015) também observaram expressão moderada a forte de calponina nos casos de adenoma de células basais e adenoma pleomórfico.

Nas glândulas salivares histologicamente normais foi observada expressão de calponina nas células mioepiteliais. IANEZ et al. (2010) também observaram essa proteína na maioria das células mioepiteliais das glândulas salivares normais, tanto na região periacinar quanto na periferia dos ductos intercalares.

A proteína **colágeno tipo IV** é a principal componente da lâmina basal. Em nosso estudo, colágeno IV foi amplamente observada na parede dos vasos sanguíneos. Considerando as áreas tumorais, foi observada de forma focal ao redor de estruturas ductiformes no adenoma pleomórfico e no adenoma de células basais. Os casos de adenoma pleomórfico menos celularizados apresentaram menor expressão de colágeno IV. Contudo, esse resultado não foi estatisticamente significativo. Nos casos de mioepitelioma não foi observada expressão de colágeno IV nas áreas tumorais.

RAITZ et al. (2003) observaram a expressão de colágeno tipo IV ao redor de agrupamentos celulares e acompanhando os vasos sanguíneos nos casos de mioepitelioma. No adenoma pleomórfico a expressão foi observada ao redor de estruturas tubulares e na periferia de agrupamentos celulares sólidos. Nos casos de adenoma de células basais a expressão foi observada em agrupamentos celulares no subtipo sólido e delineando as trabéculas no subtipo trabecular. FELIX et al. (1999) também observaram expressão de colágeno IV circundando agregados celulares no adenoma pleomórfico. Já SKALOVA e LEIVO (1992) observaram expressão de colágeno IV nos casos de mioepitelioma, adenoma pleomórfico e adenoma de células basais.

Em nosso estudo, por imunistoquímica, observamos aumento de expressão de **PLAG1** em amostras de adenoma pleomórfico, mioepitelioma e adenoma de células basais.

AVADHANI et al. (2016) também observaram aumento de expressão de PLAG1 em amostras de adenoma de células basais. Já MATSYUAMA et al. (2011) não observaram positividade para PLAG1 em amostras de adenoma de células basais. KATABI et al. (2015) observaram que os rearranjos nos genes *PLAG1* ou *HMGA2* eram mais frequentes nos casos de adenoma pleomórfico com maior componente mixóide quando comparado com os tumores mais celularizados. Contudo, não foi avaliada a expressão imunohistoquímica de PLAG1. Em nosso estudo, observamos que casos de adenoma pleomórfico mais celulares apresentaram uma frequência maior de expressão de PLAG1 por imunohistoquímica quando comparado com os casos de adenoma pleomórfico com maior componente mixóide.

Por outro lado, KATABI et al. (2018) comparando os dados de expressão imunohistoquímica de PLAG1 e alterações genéticas identificadas por FISH em tumores de glândula salivar, sugeriram que a imunohistoquímica para PLAG1 apresenta alta sensibilidade, mas não especificidade na predição da fusão gênica. Dessa forma, a presença da fusão gênica nas amostras de adenoma de células basais e mioepitelioma em nosso estudo deve ser confirmada por outra técnica, para excluir que o aumento de expressão de PLAG1 seja devido a outros mecanismos, como já sugerido por MATSYUAMA et al. (2011).

Considerando os dados demográficos, clínicos e patológicos, não foi observada associação com a expressão das proteínas. Já considerando a expressão das proteínas entre si, foi observada associação entre a expressão de calponina e PLAG1.

A fim de verificarmos se os casos de mioepitelioma, adenoma pleomórfico e adenoma de células basais poderiam ser classificados de acordo com o perfil de expressão das proteínas avaliadas em nosso estudo foi realizada uma análise de clusterização hierárquica. Essa abordagem metodológica tem sido empregada tradicionalmente em estudos de expressão gênica e de microRNAs. Contudo, diversos estudos têm demonstrado a sua utilização para análise de perfis proteicos na tentativa de se identificar subgrupos de tumores baseado em seu sítio de origem, fenótipo, comportamento biológico e prognóstico (PRASAD et al. 2008; CLARK et al. 2011; BEGNAMI et al. 2012; COUTINHO-CAMILLO et al. 2017). Considerando o perfil de expressão de proteínas avaliadas em nosso estudo, não foi possível separar as amostras em grupos de mioepitelioma, adenoma pleomórfico e adenoma de células basais. Foram observados dois agrupamento distintos. Um desses agrupamentos apresentou maior expressão de caldesmon e AML, mas era composto pelos diferentes tumores.

É importante salientar que a análise de clusterização é bastante utilizada para estudo de variáveis contínuas e no nosso caso utilizamos a expressão das proteínas de forma categorizada, mesma abordagem utilizada por PRASAD et al. (2008). Devemos considerar também, a casuística pequena avaliada em nosso estudo, especialmente para o mioepitelioma e adenoma de células basais que são tipos histológicos mais raros, o que pode interferir na análise desse tipo de abordagem metodológica.

O estudo desenvolvido demonstrou que todas as neoplasias derivadas do ducto intercalar das glândulas salivares incluídas na pesquisa apresentaram um marcante componente mioepitelial com características fenotípicas bastantes similares. A vimentina se mostrou um marcador presente em todos os tumores, seguida da calponina, caldesmon e AML, sugerindo que essas proteínas possam ser utilizadas na identificação das células mioepiteliais. Contudo, não são marcadores específicos dessas células.

Os resultados da análise de imunohistoquímica e análise de clusterização sugerem que essas lesões representem espectros histológicos de um mesmo tumor. Contudo, outros estudos, com uma casuística maior, são necessários para a validação dessa hipótese.

6 CONCLUSÃO

- 1 As proteínas citoceratina 14, vimentina, actina de músculo liso, calponina, caldesmon e colágeno tipo IV foram expressas em padrão variável nas células mioepiteliais do adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma da glândula salivar
- 2 A análise de clusterização hierárquica demonstrou que adenoma pleomórfico, adenoma de células basais e mioepitelioma da glândula salivar não podem ser classificados baseado no perfil de expressão dessas proteínas nos diferentes tumores estudados
- 3 A proteína AML foi frequentemente mais expressa nos casos de adenoma pleomórfico em relação ao mioepitelioma e adenoma de células basais e houve associação da expressão das proteínas calponina e PLAG1

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams A, Warner K, Nör JE. Salivary gland cancer stem cells. **Oral Oncol** 2014; 49:845-53.

Araújo VC, Araujo NS. Vimentin as a marker of myoepithelial cells in salivary gland tumors. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 1990; 247:252-5.

Araújo VC, Carvalho YR, Araújo NS. Actin versus vimentin in myoepithelial cells of salivary gland tumors: a comparative study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1994; 77:387-94.

Araújo VC, Sousa SOM. Expression of different keratins in salivary gland tumors. **Oral Oncol Eur J Cancer** 1996; 32B:14-18.

Araújo VC, de Souza SO, Carvalho YR, de Araújo NS. Application of immunohistochemistry to the diagnosis of salivary gland tumors. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2000; 8:195-202.

Avadhani V, Cohen C, Siddiqui MT. PLAG1: an immunohistochemical marker with limited utility in separating pleomorphic adenoma from other basaloid salivary gland tumors. **Acta Cytol** 2016; 60:240-5.

Balachander N, Masthan KMK, Aravindha babu N, Anbazhagan V. Myoepithelial cells in pathology. **J Pharm Bioallied Sci** 2015; 7:190-3.

Barnes L, Appel BN, Perez H, El-Attar AM. Myoepitheliomas of the head and neck: case report and review. **J Surg Oncol** 1985; 28:21-8.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. **Pathology and genetics of head and neck tumours: salivary glands**. 3rd ed. Lyon: IARC; 2005. (WHO Classification of Tumours, v.9, IARC WHO Classification of Tumours, n° 9).

Batsakis JG. Salivary gland neoplasia: An outcome of modified morphogenesis and cytodifferentiation. **Oral Surg Med Oral Pathol** 1980; 49:229-32.

Batsakis JG, Kraeme B, Sciubba JJ. The pathology of head and neck tumors: the myoepithelial cell and its participation in salivary gland neoplasia, part 17. **Head Neck Surg** 1983; 5:222-33.

Batsakis JG, El-Naggar AK. Myoepithelium in salivary and mammary neoplasms is host-friendly. **Adv Anat Pathol** 1999; 6:218-26.

Begnami MD, Fregnani JH, Brentani H, et al. Identification of protein expression signatures in gastric carcinomas using clustering analysis. **J Gastroenterol Hepatol** 2012; 27:378-84.

Bhagat Singh AD, Majumdar S, Ghosh AK, Gandhi L, Choudaha N, Sharma I, Pal SP. Basal cell adenoma-clinicopathological, immunohistochemical analysis and surgical considerations of a rare salivary gland tumor with review of literature. **Niger J Surg** 2015; 21:31-4.

Carmichael JD, Winder SJ, Walsh MP, Kargacin GJ. Calponin and smooth muscle regulation. **Can J Physiol Pharmacol** 1994; 72:1415-9.

Caselitz J, Walther B, Wustron J, Seifert G, Weber K, Osborn M. A monoclonal antibody that detects myoepithelial cells in exocrine glands, basal cells in other epithelial and basal and suprabasal cells in certain hyperplastic tissues. **Virchows Arch** 1986; 409:725-38.

Caselitz J. Basal membrane antigen as tumor markers. **Curr Top Pathol** 1987; 77:223-43.

Cavalcante RB, Lopes FF, Ferreira AS, Freitas RA, Souza LB. Immunohistochemical expression of vimentin, calponin and HHF-35 in salivary gland tumors. **Braz Dent J** 2007; 18:192-7.

Chaudhry AP, Cutler LS, Satchidanand S, labay G, Sunderraj M. Ultrastructure of monomorphic adenoma (ductal type) of the minor salivary glands. **Arch Otolaryngol** 1983; 109:118-22.

Cheng J, Saku T, Okabe H, Furthmayr H. Basement membranes in adenoid cystic carcinoma. **Cancer** 1991; 69:2631-9.

Cherng S, Young J, Ma H. Alpha-Smooth Muscle Actin (α -SMA). **J Am Sci** 2008; 4:7-9.

Chitturi RT, Veeravarmal V, Nirmal RM, Reddy BVR. Myoepithelial cells (MEC) of the salivary glands in health and tumours. **J Clin Diag Res** 2015, 9:14-8.

Clark SE, Warwick J, Carpenter R, et al. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. **Br J Cancer** 2011; 104:120-7

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Puga RD, et al. Profile of apoptotic proteins in oral squamous cell carcinoma: a cluster analysis of 171 cases. **Applied Cancer Res** 2017; 37:2

Dardick I, van Nostrand AWP, Jeans D, Rippstein P, Edwards V. Pleomorphic adenoma, I: ultrastructural organization of "epithelial" regions. **Hum Pathol** 1983; 14:780-97.

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

Dardick I, Lytwyn A, Bourne AJ, Byard RW. Trabecular and solid-cribriform types of basal cell adenoma: a morphologic study of two cases of an unusual variant of monomorphic adenoma. **Oral Surg** 1992; 73:75-83.

Day TA, Deveikis J, Gillespie B, et al. Salivary Glands Neoplasms. **Curr Treat Options Oncol** 2004; 5:11-26.

de Paula F, Teshima THN, Hsieh R, Souza MM, Nico MMS, Lourenço SV. Overview of human salivary glands: Highlights of morphology and developing processes. **Anat Rec (Hoboken)** 2017; 300:1180-8.

Deihimi P, Mahzooni P, Torabinia N. Study of myoepithelial cell markers in pleomorphic adenoma and mucoepidermoid carcinoma of salivary glands. **Dent Res J** 2008; 3:1-9.

Deshmukh SN, Dive AM, Moharil R, Munde P. Enigmatic insight into collagen. **J Oral Maxillofac Pathol** 2016; 20:276-83.

Deugnier MA, Teuliere JA, Faraldo MF, Thiery JP, Glukhova MA. The importance of being a Myoepithelial cell. **Breast Cancer Res** 2002; 4:224-30.

Ellis GL, Auclair PL. **Tumors of the salivary glands**. Washington, DC, Armed Forces Institute of Pathology; 2008. (Atlas of Tumor Pathology, 4th series, Fascicle 9)

El-Naggar AK, Lovell M, Callender DL, Ordonez NG, Killary AM. Cytogenetic analysis of a primary salivary gland myoepithelioma. **Cancer Genet Cytogenet** 1999; 113:49-53.

Felix A, Rosa CJ, Fonseca I, Cidadão A. Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: an immunohistochemical study. **Hum Pathol** 1999; 30:964-9.

Foo WC, Jo VY, Krane JF. Usefulness of translocation-associated immunohistochemical stains in the fine-needle aspiration diagnosis of salivary gland neoplasms. **Cancer Cytopathol** 2016; 124:397-405.

Foschini MP, Scarpellini F, Gown A, Eusebi V. Differential expression of myoepithelial markers in salivary, sweat and mammary glands. **Int J Surgical Pathol** 2000; 8:29-37.

Franquemont DW, Mills SE. Plasmacytoid monomorphic adenoma of salivary glands: absence of myogenous differentiation and comparison to spindle cell myoepithelioma. **Am J Surg Pathol** 1993; 17:146-53.

Fuchs E, Cleveland DW. Structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. **Science** 1998; 279:514-19.

Furuse C, Sousa SO, Nunes FD, Magalhães MH, Araújo VC. Myoepithelial cell markers in salivary gland neoplasms. **Int J Surg Pathol** 2005; 13:57-65.

Ghanem YA, Mizrachi A, Popovtzer A, Ghanem NA, Feinmesser R. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland: institutional experience and review of the literature. **J Surg Oncol** 2016; 114:714-8.

Gillespie MB, Albergotti WG, Eisele DW. Recurrent salivary gland cancer. **Curr Treat Options Oncol** 2012; 13:58-70.

Gimona M, Herzog M, Vandekerckhove J, Small JV. Smooth muscle specific expression of calponin. **FEBS Lett** 1990; 274:159-62.

Gustafsson H, Kjorell U, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE. Distribution of intermediate filament proteins in developing and adult salivary glands in man. **Anat Embryol** 1988; 178:343-51.

Hara K, Tlo M, Takeuchi J, Tijima S, Endo T, Hidaga H. Distribution of S-100 protein in normal salivary glands and salivary gland tumors. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol** 1983; 401:237-49.

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

Ito FA. Salivary Gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 496 cases. **Int J Maxillofacial Surg** 2005, 34:5333-6.

Jaeger RG, de Oliveira PT, Jaeger MM, de Araújo VC. Expression of smooth-muscle in cultured cells from human plasmocytoid myoepithelioma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1997; 84:663-7.

Jo VY. Myoepithelial tumors: an update. **Surg Pathol Clin** 2015; 8:445-66.

Kaneda T, Minami M, Ozawa K, et al. Imaging tumors of the minor salivary glands. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1994; 77:385-90.

Kanner WA, Galgano MT, Atkins KA. Podoplanin expression in basal and myoepithelial cells: utility and potential pitfalls. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2010; 18:226-30.

Katabi N, Ghossein R, Ho A, et al. Consistent PLAG1 and HMGA2 abnormalities distinguish carcinoma ex-pleomorphic adenoma from its de novo counterparts. **Hum Pathol** 2015; 46:26-33.

Katabi N, Xu B, Jungbluth AA, et al. PLAG1 immunohistochemistry is a sensitive marker for pleomorphic adenoma: a comparative study with PLAG1 genetic abnormalities. **Histopathology** 2018; 72:285-93.

Kibbey MC, Royce LS, Dym M, Baum BJ, Kleinman HK. Glandular-like morphogenesis of the human submandibular tumor cell line A253 on basement membrane components. **Exp Cell Res** 1992; 198:343-51.

Lee MW, Nam SY, Choi HJ, Choi JH, Moon KC, Koh JK, Myoepithelioma of parotid gland presenting as infra-auricular subcutaneous mass. **J Cutan Pathol** 2005; 32:240-4.

Li B, Zhou CX, Jia SN. Basal cell adenoma of salivary glands with a focal cribriform pattern: clinicopathologic and immunohistochemical study of 19 cases of a potential pitfall for diagnosis. **Ann Diagn Pathol** 2014; 18:5-9.

Lima SS, Soares AF, Amorim RFB, Freitas RA. Perfil epidemiológico das neoplasias de glândulas salivares: análise de 245 casos. **Rev Bras Otorrinolaringol** 2005, 71:335-40.

Lingam RK, Dagher AA, Nigar E, Abbas SA, Kumar M. Pleomorphic adenoma (benign mixed tumour) of the salivary glands: its diverse clinical, radiological, and histopathological presentation. **Br J Oral Maxillofac Surg** 2011; 49:14-20.

Liu R, Jim J-P. Calponin isoforms CNN1, CNN2 and CNN3: regulators for actin cytoskeleton functions in smooth muscle and non- muscle cells. **Gene** 2016; 585:143-53.

Lopes MLDS, Barroso KMA, Henriques ACG, Santos JN, Martins MD, Souza LB. Pleomorphic adenomas of the salivary glands: retrospective multicentric study of 130 cases with emphasis on histopathological features. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2017; 274:543-51.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, Uyekita SH, Soares FA. Human Salivary gland branching morphogenesis: morphological localization of claudins and its parallel relation with developmental stages revealed by expression of cytoskeleton and secretion markers. **Histochem Cell Biol** 2007; 128:361-9.

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

Machado de Sousa SO, Araújo NS, Corrêa L, Soubhia AMP, Araújo VC. Immunohistochemical aspects of basal cell adenoma and canalicular adenoma of salivary glands. **Oral Oncol** 2001; 37:365-68.

Margaritescu CL, Mercur V, Mogoanta L, et al. Salivary gland basal cell adenomas-immunohistochemical evaluation of four cases and review of the literature. **Rom J Morphol Embryol** 2005; 46:29-40.

Martinez EF, Demasi APD, Napimoga MH, et al. In vitro influence of the extracellular matrix in myoepithelial cells stimulated by malignant conditioned medium. **Oral Oncol** 2012; 48:102-9.

Martinez EF, Demasi APD, Napimoga MH, et al. Myoepithelial cells from pleomorphic adenoma are not influenced by tumor conditioned media from breast ductal adenocarcinoma and melanoma cells: An in vitro study. **Oncol Lett** 2015; 9:313-17.

Martins C, Fonseca I, Roque L, Pereira T, Ribeiro T, Bullerdiek J, Soares J. PLAG1 Gene alterations in salivary gland pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: a combined study using chromosome banding, in situ hybridization and immunocytochemistry. **Mod Pathol** 2005; 18:1048-55.

Martins MD, Araújo VC, Raitz R, Araújo NS. Expression of cytoskeleton proteins in developing human minor salivary glands. **Eur J Oral Sci** 2002; 110:316-21.

Matsuyama A, Hisaoka M, Nagao Y, Hashimoto H. Aberrant PLAG1 expression in pleomorphic adenomas of the salivary gland: a molecular genetic and immunohistochemical study. **Virchows Arch** 2011; 458:583-92.

Mendenhall WM, Mendenhall CM, Werning JW, Malyapa RS, Mendenhall NP. Salivary gland pleomorphic adenoma. **Am J Clin Oncol** 2008; 31:95-9.

Michal M, Skalova A, Simpson RHW, Rychterova V, Leivo I. Clear cell malignant mucoepithelioma of salivary glands. **Histopathology** 1996; 28:309-15.

Milletich I. Introduction to salivary glands: structure, function and embryonic development. **Front Oral Biol** 2010; 14:1-20.

Montalli VA, Martinez E, Tincani A, et al. Tubular variant of basal cell adenoma shares immunophenotypical features with normal intercalated ducts and is closely related to intercalated duct lesions of salivary gland. **Histopathology** 2014; 64:880-9.

Mutlu A, Ozturk M, Akpınar G, Kasap M, Kanli A. Proteomic analysis of pleomorphic adenoma of the human parotid gland. **Eur Arch Otorhinolaryngol** 2017; 274:3183-95.

Nathrath WBJ, Wilson PD, Trejdosiewicz LK. Immunohistochemical localization of keratin and luminal epithelial antigen in myoepithelial and luminal epithelial cells of mammary and salivary gland tumors. **Pathol Res Pract** 1982; 175: 279-88.

Nazeer J, Prakash V, Mandal S, Prakash A. Myoepithelial cells: structure, function and role in tumor formation. **Int J Dent Health Sci** 2014; 1:155-60.

Neves JC, Lima MCA, Sobral AP. A clinicopathologic study of 106 pleomorphic adenomas of the major salivary glands. **J Bras Patol Med Lab** 2007; 43:347-354.

Ogawa AI, Takemoto LE, Navarro PL, Hesbiki RE. Salivary glands neoplasms. **Arq Int Otorrinolaringol** 2008; 12:409-18.

Ogawa Y, Toyosawa S, Ishida T, Ijuhin N. Keratin 14 immunoreactive cells in pleomorphic adenomas and adenoid cystic carcinomas of salivary glands. **Virchows Arch** 2000; 437:58-68.

Ogawa Y, Yamaychi S, Ohnishi A, Ito R, Ijuhin N. Immunohistochemistry of myoepithelial cells during development of the rat salivary glands. **Anat Embryol** 1999; 200:215-28.

Ogawa Y. Immunohistochemistry of myoepithelial cells in the salivary glands. **Progr Histochem Cytochem** 2003; 38:343-426.

Pereira ALA, Veras SSL, Silveira EJD, et al. O papel das proteínas da Matriz extracelular e das metaloproteases em carcinomas de cabeça e pescoço: uma atualização bibliográfica. **Rev Bras Otorrinolaringol** 2005; 71:81-6.

Prasad AR, Saveria AT, Gown AM, Zarbo RJ. The myoepithelial immunophenotype in 135 benign and malignant salivary gland tumors other than pleomorphic adenoma. **Arch Pathol Lab Med** 1999; 123.

Prasad ML, Barbacioru CC, Rawal YB, Husein O, Wen P. Hierarchical cluster analysis of myoepithelial/basal cell markers in adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. **Mod Pathol** 2008; 21:105-14.

Pritchard K, Moody CJ. Caldesmon: a calmodulin-binding actin-regulatory protein. **Cell Calcium** 1986; 7:309-27.

Raitz R, Araújo VC. Estudo do estado de diferenciação da células mioepiteliais nas neoplasias de glândula salivar. **Acta Scient Health Sci** 2004; 26:345-50.

Raitz R, Martins MD, Araújo VC. A study of the extracellular matrix in salivary gland tumors. **J Oral Pathol Med** 2003; 32:290-6.

Rajasenthil V, Ravi A. Basal cell adenoma of the parotid gland-a rare entity. **Indian J Surg** 2014; 76:408-10.

Raubenheimer Ej, van Niekerek JP, Hauman CHJ. Salivary myoepithelium: distribution, structure, functions and pathologic proliferations. **J DASA** 1987; 42:631-37.

Redder CP, Kandagal VS, Vibhute N, Ingaleshwar PS, Shetty SJ, Ahamad S. Myoepithelial cells: Current perspectives in salivary gland tumors. **Clin Cancer Investig J** 2013; 2:101-5.

Regese JA, Sciubba JJ. **Oral pathology**. Philadelphia, PA: Saunders; 1993. Salivary gland diseases; p.270–1.

Rodrigues Júnior NC. **Estudo Imunoistoquímico da Expressão de Actina, vimentina, calponina e caldesmona no Adenoma Pleomórfico, mioepitelioma, adenocarcinoma polimorfo de baixo grau de malignidade e carcinoma adenóide cístico de glândulas salivares.** São José dos Campos; 2008. [Dissertação de Mestrado-Faculdade de Odontologia de São Jose dos Campos-Universidade Estadual Paulista].

Saku T, Cheng J, Okabe H, Koyama Z. Immunolocalization of basement membrane molecules in the stroma of salivar gland pleomorphic adenoma. **J Oral Pathol Med** 1990; 19:208-14.

Sandbo N, Smolyaninova LV, Orlov SN, Dulim NO. Controlo f myofibroblast differentiation and function by cytoskeletal signaling. **Biochemistry (Moscow)** 2016; 81:1698-1708.

Santos GC, Martins MR, Pellacani LB, Vieira ACT, Nascimento LA, Abrahão M. Neoplasia de glândulas salivares: estudo de 119 casos. **J Bras Patol Med Lab** 2003; 39:371-5.

Sato M, Hayashi Y, Yoshida H, Yanagawa T, Yura Y, Nitta T. Search for specific markers of neoplastic epithelial duct and myoepithelial cell lines established from human salivary gland and characterization of their growth in vitro. **Cancer** 1984; 54:2959-67.

Sciubba JJ, Brannon RB. Myoepithelioma of salivary glands: report of 23 cases. **Cancer** 1982; 49:562-72.

Seethala RR, Stenman G. Update from the 4th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumours: tumors of the salivary gland. **Head Neck Pathol** 2017; 11:55-67.

Seethala RR. Basaloide/blue salivary gland tumors. **Mod Pathol** 2017; 30:84-95.

Shah AA, Mulla AF, Mayank M. Pathophysiology of myoepithelial cells in salivary glands. **J Oral Maxillofac Pathol** 2016; 20:480-90.

Shintani S, Alcade RE, Matsymura T, Terakado N, Extracellular matrices expression in invasion área of adenoid cystic carcinoma of salivar glands. **Cancer Lett** 1997; 116:9-14.

Shrestha P, Sumitomo S, Ogata K, et al. Immunoreactive tenascin in tumors of salivar glands: evidence for enhanced expression in tumor stroma and production by tumor cells. **Eur J Cancer B Oral Oncol** 1994; 30B:393-9.

Silveira EJD, Pereira LAP, Fontora MC, Souza LB, Freitas RA. Mioepitelioma de glândula salivar menor: uma análise imunohistoquímica de quatro casos. **Rev Bras Otorrinolaringol** 2006; 72:528-32.

Simpson RHW. Myoepithelial tumours of the salivary glands. **Curr Diagn Pathol** 2002; 8:328-37.

Skalova A, Leivo I. Basement membrane proteins in salivary gland tumors. Distribution of type IV collagen and laminin. **Virchows Arch Pathol** 1992; 420:425-31.

Smullin SE, Fielding AF, Susarla SM, Pringle G, Eichstaedt R. Canalicular adenoma of the palate: case report and literature review. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2004; 98:32-6.

Sobue K, Sellers JR. Caldesmon, a novel regulatory protein in smooth muscle and nonmuscle actomyosin systems. **J Biol Chem** 1991; 266:12115-8.

Soini Y, Aakko P, Virtanen I, Veli-Pekka L. Tenascin in salivary gland tumors. **Virchows Arch Pathol Anat Histopathol** 1992; 421:217-22.

Sunardhi-Widyaputra S, van Dame B. Immunohistochemical expression of tenascin in normal human salivary glands and in pleomorphic adenomas. **Path Res Pract** 1993; 189:138-43.

Takai Y, Dardick I, Mackay A, Burford-Mason A, Mori M. Diagnostic criteria for neoplastic myoepithelial cells in pleomorphic adenomas and myoepitheliomas. Immunocytochemical detection of muscle-specific actin, cytokeratin 14, vimentin and glial fibrillary acidic protein. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1995; 79:330-41.

Taniguchi S. Suppression of cancer phenotypes through a multifunctional actin-binding protein, calponin, that attacks cancer cells and simultaneously protects the host from invasion. **Cancer Sci** 2005; 96:738-46.

Tsuneki M, Maruyama S, Yamazaki M, et al. Podoplanin is a novel myoepithelial cell marker in pleomorphic adenoma and other salivary gland tumors with myoepithelial differentiation. **Virchows Arch** 2013; 462:297-305.

Tucker AS. Salivary gland development. **Semin Cell Dev Biol** 2007; 18:237-44.

Valstar MH, de Ridder M, van den Broek EC, et al. Salivary gland Pleomorphic Adenoma in the Netherlands: a nation wide observational study of primary tumor incidence, malignant transformation, recurrence and risk factors for recurrence. **Oral Oncol** 2017; 66:93-99.

Wilson TC, Ma D, Tilak A, Tesdahl B, Robinson RA. Next-Generation sequencing in salivary gland basal cell adenocarcinoma and basal cell adenoma. **Head Neck Pathol** 2016; 10:494-500.

Xiang C, Chen J, Fu P. HGF/Met Signaling in cancer invasion: the impact on cytoskeleton remodeling. **Cancers (Basel)** 2017; 9:44.

Ximenes Filho JA, Imamura R, Sennes LU. Neoplasias benignas das glândulas salivares. **Rev Arq Int Otorrinolaringol** 2002; 6:225-32.

Yaku Y. Ultrastructural studies on development of human fetal salivary glands. **Arch Histol Jnp** 1983; 46:677-90.

Yu GY, Ussmueller J, Donath K. Histogenesis and developmente of membranous basal cell adenoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 1998; 86:446-55.

Zaib N, Mushtaq S, Mamoon N, Akhter N, Ayaz B. Immunohistochemical pattern of pleomorphic adenoma, polymorphous low grade adenocarcinoma and adenoid cystic carcinoma in minor salivary glands. **J Dent (Tehran)** 2014; 11:38-46.

Zarbo RJ, Prasad AR, Regese JA, Gown AM, Savera AT. Salivary Gland Basal Cell and Canalicular Adenomas: Immunohistochemical demonstration of myoepithelial cell participation and morphogenetic considerations. **Arch Pathol Lab Med** 2000; 124:401-5.

Zarbo RJ. Salivary gland neoplasia: a review for the practicing pathologist. **Mod Pathol** 2002; 15:298-323.

Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa – CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 13 de novembro de 2015.

À
Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo,
Aluna: Helen Barbara Stamboni (Doutorado)

Ref: Projeto de Pesquisa nº. 2103/15
“Assinatura imunoistoquímica das células mioepiteliais em neoplasias benignas de glândulas salivares.”

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 10/11/2015, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de 20/10/2015, **aprovaram** a realização do projeto e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Declaração Sobre os Dados Coletados, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre Uso e Destino do Material Biológico, Publicação dos Dados e Propriedade das Informações Geradas;
- Declaração Sobre a Publicação dos Dados de Pesquisa Utilizando Amostras Fornecidas e Processadas pelo Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Infraestrutura e Instalações do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE);
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Núcleo de Cabeça e Pescoço;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Biobanco do AC Camargo Cancer Center;
- Cronograma do Estudo;
- Orçamento Financeiro Detalhado.

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

Atenciosamente,


Dr. Jefferson Luiz Gross

1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1