

**AVALIAÇÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-
TRONCO NO ADENOMA PLEOMÓRFICO: ESTUDO
DE MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS E
MOLECULARES**

RENATA CAROLINA FRAGA IANEZ

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

Área de concentração: Oncologia

**Orientadora: Dr^a. Silvia Vanessa Lourenço
Co-orientadora: Dr^a. Marcilei E. C. Buim**

**São Paulo
2011**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

lanez, Renata Carolina Fraga

Avaliação da presença de marcadores de células-tronco no adenoma pleomórfico: estudo de marcadores imunoistoquímicos e moleculares /Renata Carolina Fraga lanez, 2011.

95p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Orientador: Silva Vanessa Lourenço

Descritores: 1. IMUNOISTOQUÍMICA. 2. CÉLULAS-TRONCO. 3. ADENOMA/fisiopatologia. 4. LIPOMA PLEOMÓRFICO. 5. BIOLOGIA MOLECULAR. 6. MARCADORES BIOLÓGICOS.

**“Nunca se afaste de seus sonhos,
pois se eles se forem,
você continuara vivendo,
mas terá deixado de existir”.**

Charles Chaplin

DEDICATÓRIA

Aos meu Pais,

especialmente a minha mãe que sempre esteve ao meu lado, acreditando em meu potencial. Maior incentivadora de todos os meus projetos e objetivos de vida;

A Minha Família e namorado,

Por toda compreensão, carinho e apoio;

A minha Tia/Avó Dirce Rodrigues (*in memorian*),

que tanto me aconselhou nos momentos difíceis;

Ao meu Tio e grande amigo Flavio Leite,

por toda ajuda e todas as palavras que me impulsionaram a crescer em todos os momentos;

À Minha Orientadora Dra Silvia,

por acreditar em mim, até quando eu mesma duvidei. Pelo exemplo de orientadora, sempre disposta a ajudar e pela maneira zelosa como conduziu esse trabalho. Me ensinou a crescer enquanto profissional e ser humano. Hoje, além de orientadora, posso dizer que tenho uma grande AMIGA.

AGRADECIMENTOS

À Deus

por me iluminar, me guiar e me amparar em todos os momentos

À Dra Marcilei Buim

por toda cooperação e cuidado nesse trabalho, principalmente nas técnicas moleculares e estatística

À Dra Cláudia Malheiros

pela disponibilidade e ajuda incansável

Dra Dirce Lima

por toda ajuda cedida

À Nelize Lascane,

principalmente pela revisão ortográfica

Ao Dr. Fernando Soares,

pela oportunidade de aprendizado no laboratório de Anatomia Patológica do Centro Internacional de Pesquisa e Ensino (CIPE)

Ao Hospital A.C.Camargo,

especialmente ao Departamento de Anatomia Patológica, por ter proporcionado excelentes condições de realização para esse trabalho e aos técnicos Ivanildo, Fátima, Simone, Carlinhos e Severino que sempre me receberam de forma gentil e me ajudaram com blocos, lâminas e anticorpos.

Amigos da Pós- graduação,

Felipe Fidalgo, Juliana Badke, Karina Santiago, Marina Cannavan, Ribamar Junior e Sônia Nogueira pelo excelente trabalho em conjunto, pela companhia, pelos momentos de descontrações e “desabafos”

Colegas do laboratório do Departamento de Anatomia Patológica

Adriana Bulgareli, Alice Muglia, Andreza Queiroz, André Lavorato, Beatriz Maia, Carolina Castro, Fernanda Ayala, Gwentyth Freeman, Iara Rodrigues, Juliano Jampietro, Ligia Oliveira, Luciane Kagohara, Maria José Souza, Rodrigo Crespo, Thiago Soares, Yukie Sato, pela companhia durante esses anos e terem tornado nossos dias mais satisfatórios.

À Suely e todos da Biblioteca,

pela atenção nas pesquisas bibliográficas e na formatação da dissertação

Á Ana, Luciana e Vanuza, da pós-graduação,

Pela disponibilidade em todos os momentos e por sempre me receberem dispostas a ajudar

RESUMO

Ianez RCF. **Avaliação da presença de marcadores de células-tronco no adenoma pleomórfico: estudo de marcadores imunoistoquímicos e moleculares.** São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introdução: As neoplasias das glândulas salivares são lesões derivadas dos diversos segmentos glandulares e, de forma geral, se relacionam com estes pelas características fenotípicas e moleculares. Diversos são os marcadores protéicos e moleculares utilizados na pesquisa e na rotina diagnóstica para melhor compreender e classificar os diversos tipos de lesões derivadas dessas glândulas, principalmente aqueles que relacionem a histogênese e a possível presença de células-tronco no parênquima tumoral. O adenoma pleomórfico é uma neoplasia bifásica cujos elementos celulares (epiteliais e mioepiteliais) podem estar arranjados em uma grande variedade de padrões, em meio a um estroma complexo. Essa variação estrutural no adenoma pleomórfico sugere a participação das células-tronco ou multipotentes na composição tumoral. A origem do adenoma pleomórfico (a partir do ducto intercalado - onde residem as células tronco/multipotentes das glândulas salivares) reforçam essa hipótese. Assim, o nosso trabalho investigou a presença de células positivas para marcadores de células-tronco (CD24, CD44, CD133, c-Kit e Musashi-1) no adenoma pleomórfico e nas diferentes fases da morfogênese das glândulas salivares. **Material e Métodos:** Foram realizadas técnicas *in situ* - imunoistoquímica e técnicas moleculares (RT-PCR em tempo real) com a utilização de 101 casos diagnosticados como adenoma pleomórfico, sendo 55 amostras em parafina e 60 amostras em tecido congelado. Dessas, 14 eram amostras pareadas. Espécimes de glândulas salivares dissecadas de 20 fetos humanos também foram incluídos. **Resultados:** A análise imunoistoquímica mostrou que todos os fatores pesquisados foram positivos nos tumores incluídos no estudo.

Especificamente, observou-se positividade dos marcadores CD24, CD133 e c-kit nas células luminais das formações ductais. Já as células mioepiteliais mostraram-se positivas para CD44, Musashi-1 e em áreas focais para CD133 e c-kit. Além disso, foram observadas células positivas isoladas na matriz com metaplasia condróide e mixóide, tanto para o marcador CD133, como c-Kit. Nas glândulas salivares fetais, os marcadores estudados foram encontrados quase que exclusivamente na região do ducto intercalar. Os resultados do qRT-PCR mostraram um aumento da expressão dos marcadores CD44, c-Kit e Musashi-1 em relação ao tecido glandular normal. Já o CD24 e o CD133, apesar de serem expressos, não apresentaram um padrão específico de expressão em relação ao tecido normal, ou seja, apresentaram casos com expressão aumentada, diminuída e sem alteração. **Conclusão:** Células presentes no parênquima do adenoma pleomórfico expressaram, em padrões variados, os marcadores descritos em células-tronco, entretanto, não se pode afirmar que as células tumorais positivas possuam as mesmas características de células multipotentes.

SUMMARY

lanez RCF. **[Investigation of stem-cell markers in pleomorphic adenoma: immunohistochemical and molecular study]**. São Paulo; 2011. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Introduction: Salivary gland neoplasms are originated from the various salivary gland compartments; in general they are histologically related to these structures. Several protein and molecular markers are employed in both research and diagnosis in order to classify and understand histogenesis and other aspects of salivary gland neoplastic lesions. Pleomorphic adenoma is a common biphasic benign salivary gland neoplasm composed by epithelial and myoepithelial cells and a complex stroma. Its varied structural and architectural aspect suggests the participation of stem cells in the tumour composition. Additionally, pleomorphic adenoma originates from intercalated duct of salivary glands, a region reputed to host the regenerative/ stem-cell compartment of these glands. The present work investigated stem-cell markers (CD24, CD44, CD133, c-Kit e Musashi-1) in a biological model of pleomorphic adenoma and in specimens of developing human salivary glands using immunohistochemistry and real-time RT PCR. **Material and Methods:** One hundred and one cases of pleomorphic adenomas were included in the study –55 cases were paraffin embedded and 60 specimens were fresh frozen tissue. From the total of 101 cases, 14 were pared (paraffin embedded and frozen tissue). Salivary gland specimens dissected from 20 human foetuses were also used. **Results:** All cases of pleomorphic adenomas were positive for the stem-cell markers studied. Neoplastic luminal structures were positive for CD24, CD133 and c-kit. Modified myoepithelial cells were positive for CD44 and Musashi-1. In focal areas, isolated cells were positive for CD133 and c-kit. In foetal salivary glands, these markers were almost all restricted to the intercalated duct region. Increased expression of CD44, c-Kit and Musashi-1 stem-cell markers was observed in

pleomorphic adenoma specimens using real-time RT-PCR technique when compared with normal salivary gland controls. An specific expression pattern was not observed for CD24 and CD133, when compared with normal salivary gland tissue – in some cases of pleomorphic adenoma there was an increased expression of both factors, whilst in other cases their expression was decreased or not altered. **Conclusion:** Pleomorphic adenoma cells share similar markers with stem-cells, although it is not possible to confirm that neoplastic cells bear the same characteristics of multipotency.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Gel de agarose 2% representativo da análise por RT-PCR.....	33
Figura 2	Exemplos dos aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico.....	39
Figura 3	As fases do desenvolvimento das glândulas salivares.....	40
Figura 4	Imunoexpressão dos marcadores CD24 e CD44 no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta.....	45
Figura 5	Imunoexpressão dos marcadores c-Kit no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta.....	48
Figura 6	Imunoexpressão dos marcadores CD133 no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta.....	51
Figura 7	Imunoexpressão dos marcadores Musashi- 1 no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta.....	54
Figura 8	Perfil de expressão dos genes em adenoma pleomórfico por qPCR.....	56
Figura 9	Análise de expressão de RNAm de CD24 em adenoma pleomórfico.....	57

Figura 10	Análise de expressão de RNAm de CD44 em adenoma pleomórfico.....	58
Figura 11	Análise de expressão de RNAm de CD133 em adenoma pleomórfico.....	59
Figura 12	Análise de expressão de RNAm de c-Kit em adenoma pleomórfico.....	60
Figura 13	Análise de expressão de RNAm de Musashi-1 em adenoma pleomórfico.....	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Anticorpos utilizados e sua procedência.....	29
Tabela 2	Características Clínico-Demográfica dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico.....	37
Tabela 3	Perfil de expressão dos genes em adenoma pleomórfico por qPCR.....	56
Tabela 4	Análise de associação dos genes com as variáveis clínico-demográficas.....	63
Tabela 5	Análise de correção entre a expressão dos genes CD24, CD44, CD133, c-Kit e Musashi-1 em adenoma pleomórfico, por Real Time –PCR.....	65

LISTA DE ABREVIATURAS

18S	Sub-unidade menor de ribossomo de seres eucarióticos
β	“beta”. Segunda letra do alfabeto grego
μg	Unidade de medida de peso microgramas
μL	Unidade de medida de volume microlitros
μm	Unidade de medida de tamanho micrômetros
°C	Unidade de medida de temperatura graus celsius
%	Unidade de valor percentual
BM	banho-maria
CD	clouster of differentiation
cDNA	DNA complementar
cm	centímetros
CTs	<i>Cycle Thresholds</i>
DNA	Do inglês <i>desoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxirribonucléico
dNTP	Desoxirribonucleotídeo
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
HRP	Do inglês, “ <i>Horse Raddish Peroxidase</i> ”
mg	Unidade de medida de peso, miligramas
MgCl₂	Cloreto de magnésio
mM	Unidade de medida de concentração milimolar
mol/L	é a razão da quantidade de matéria do soluto (<i>mol</i>) por volume d solução (em <u>litros</u>)
ng	Unidade de medida de peso nanograma
p	Refere-se a probabilidade ou variabilidade amostral
pb	Pares de base
PBS	Do inglês “ <i>Phosphated buffered solution</i> ”, traduzido como solução salina fosfatada
PCR	Do inglês, <i>Polimerase Chain Reaction</i>
pH	potencial de hidrogênio iônico

PP	Panela de pressão
qPCR	Do inglês, <i>Quantitative Polymerase Chain Reaction</i>
rpm	rotações por minuto
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i> , traduzido como ácido ribonucléico
RNA_m	RNA mensageiro
RT-PCR	Do inglês, <i>Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction</i>
s	segundos
Tris	Tris-hidroximetil-aminometano

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1	Adenoma Pleomórfico	3
2.2	A Morfogênese das glândulas salivares.....	6
2.3	Células-Tronco	12
2.3.1	História das células-tronco tumorais	12
2.3.2	Definições atuais de células-tronco.....	13
2.3.3	Células-tronco e a origem das neoplasias	16
2.3.4	Identificação das células-tronco	18
2.3.5	Células-tronco e glândula salivar	21
3	OBJETIVOS.....	24
4	MATERIAIS E MÉTODOS	25
4.1	Seleção do material.....	25
4.1.1	Adenoma Pleomórfico	25
4.1.2	Glândulas salivares normais adultas e glândulas salivares em desenvolvimento	26
4.2	Imunoistoquímica	27
4.3	Técnicas Moleculares.....	30
4.3.1	Extração do RNA.....	30
4.3.2	Tratamento e quantificação das amostras com DNase	31
4.3.3	Síntese de cDNA e transcrição reversa	31
4.3.4	Controle de contaminação por DNA genômico	32
4.3.5	PCR em tempo real.....	33
4.4	Análise Estatística	34
5	RESULTADOS.....	36

5.1	Seleção dos casos	36
5.1.1	Dados clínico-demográficos	36
5.2	Análise Histopatológica	38
5.2.1	Imunoistoquímica	41
5.2.2	Análise da expressão gênica por Real time – PCR (qPCR)	56
5.2.3	Análise de associação dos genes com as variáveis clínico-demográficas	62
5.2.4	Análise de correlação entre os genes	64
5.2.5	Análise de correlação entre os genes e as proteínas estudadas.....	64
5.2.6	Análise de correlação entre proteínas e as variáveis clínico-demográficas	65
6	DISCUSSÃO	66
7	CONCLUSÕES	80
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

ANEXO

Anexo 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição

Anexo 2 Artigos publicados durante a pós-graduação

1 INTRODUÇÃO

As glândulas salivares são estruturas complexas formadas por um sistema de ductos e ácinos. A estrutura do sistema ductal é composta por células luminais e não-luminais (células basais e células mioepiteliais). As unidades secretoras acinares e os ductos intercalares são envolvidos pelas células mioepiteliais enquanto que as outras porções do sistema ductal contam com a presença das células basais (RAUBENHEIMER et al. 1987; REDMAN 1994). As neoplasias das glândulas salivares são derivadas dos diversos segmentos glandulares e, de forma geral, relacionam-se com estes pelas características fenotípicas e moleculares.

O aprimoramento da imunoistoquímica vem auxiliando sobremaneira o conhecimento da composição fenotípica de cada um desses compartimentos glandulares. Esses estudos também retratam detalhes a respeito da diferenciação das células luminais e não-luminais nas neoplasias das glândulas salivares e posicionam seu estado fenotípico na arquitetura complexa dos tumores, constituindo-se como uma ferramenta substancial no diagnóstico. Diversos são os marcadores protéicos e moleculares utilizados na pesquisa e na rotina diagnóstica para melhor se compreender e classificar os diversos tipos de lesões derivadas dessas glândulas (CHEUK e CHAN 2007). Muitos deles, entretanto, necessitam de estudos comprobatórios para seu emprego e ainda outros estão por ser identificados,

principalmente aqueles que relacionam a histogênese e a possível presença de células-tronco no parênquima tumoral.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ADENOMA PLEOMÓRFICO

Os tumores das glândulas salivares constituem cerca de 3% de todas as neoplasias de cabeça e pescoço. A maioria desses tumores compreende neoplasias benignas, das quais, cerca de 70% correspondem a adenomas pleomórficos (WAL et al. 1998; ITO et al. 2009).

O adenoma pleomórfico ocorre principalmente nas glândulas maiores (a parótida é a glândula mais acometida), mas também acomete as glândulas menores (mucosas), especialmente as localizadas no palato (LINGAM et al. 2011). Esta neoplasia predomina no sexo feminino, principalmente entre 3ª e a 4ª décadas de vida (ELLIS e AUCLAIR 1995). Apresentações clínicas, radiológicas e histológicas são diversas: podem ocorrer em diferentes localizações anatômicas e ter aspectos histopatológicos variados graças a diferentes proporções dos elementos epiteliais e mesenquimais, o que lhe garante o nome alternativo de tumor misto das glândulas salivares (LINGAM et al, 2011).

Clinicamente trata-se de uma massa nodular circunscrita de capsulação e tamanhos variáveis, que pode apresentar-se solitário, de crescimento lento, indolor, de comum recorrência e, raramente leva o paciente a óbito (MENDENHAIL et al. 2008; LINGAM et al. 2011). A excisão cirúrgica é o tratamento de escolha para o adenoma pleomórfico, que pode

crescer a proporções maiores, caso não sejam tratados. Assim, a longevidade e recidiva são fatores de risco de transformação maligna, que pode ocorrer de 3% a 4% dos casos (LINGAM et al, 2011).

Do ponto de vista microscópico, o adenoma pleomórfico é uma neoplasia bifásica, composta por células epiteliais e mioepiteliais arranjadas em uma grande variedade de padrões, em meio a um estroma escasso ou abundante, do tipo mucóide, fibroso, condróide, vascular ou mixocondróide. Há também uma grande variação na disposição celular, com formações celulares difusas e compactas até a apresentação de células isoladas; formações ductiformes e padrões trabeculares, basalóide e císticos são freqüentes (ELLIS e AUCLAIR 1995; ITO et al. 2009). Essas características de diversidade fenotípica dos componentes lhe conferem o aspecto histológico de pleomorfismo arquitetural (SEIFERT et al. 1990).

Estudos mostraram que a maioria dos adenomas pleomórficos são formados por proliferação de células mioepiteliais modificadas, de morfologia do tipo plasmocitóide, fusiforme, poligonal ou hialino. Em meio a esses agrupamentos celulares se fazem presentes estruturas ductiformes e estroma, geralmente do tipo hialino (REGEZI & BATSAKIS 1977).

Do ponto de vista citogenético o adenoma pleomórfico pode ser enquadrado em quatro grupos distintos (BULLERDIEK et al. 1993; CHEUK & CHAN 2007):

- 1) Tumores apresentando rearranjos de 8q12 (39% dos casos);
- 2) Tumores apresentando rearranjo de 12q13-15 (8% dos casos);

3) Tumores apresentando alterações clonais esporádicas não envolvendo 8q12 ou 12q13-15 (23% dos casos);

4) Tumores com cariótipo aparentemente normal (30% dos casos).

Os estudos moleculares de receptores de andrógenos indicam que as células que compõem o estroma e as células epiteliais dos adenomas pleomórficos são clonais e se originam da mesma célula progenitora. A hipótese desse tumor possuir em sua composição células-tronco com capacidade multipotente também pode eventualmente explicar seu pleomorfismo arquitetural e o comportamento recidivante.

A histogênese do adenoma pleomórfico ainda é debatida nos entre diversos autores na literatura, e duas teorias têm sido utilizadas para explicar a origem do tumor: a primeira postula que o adenoma pleomórfico é o resultado de expansão clonal de uma única célula pluripotente; outros autores consideram que o adenoma pleomórfico e outros tipos de neoplasias bifásicas das glândulas salivares sejam derivadas do crescimento coordenado de populações celulares derivadas da região intercalar-acinar onde possivelmente encontram-se as células que mantêm a capacidade proliferativa e regenerativa dessas glândulas (BATSAKIS et al. 1989; NOGUCHI et al. 1996; DARDICK, 1998; BATSAKIS e EL-NAGGAR. 1999; LEE et al. 2000; DEBIEC-RYCHTER et al. 2001; MARTINS et al. 2005). Os ductos intercalados, em especial, são formados por uma camada única de células cubóides e que têm a possibilidade de se diferenciar em ácinos ou em outras porções do sistema ductal glandular. Sendo assim, do ponto de vista embriológico e evolutivo, o segmento intercalado (menor segmento do

sistema ductal) das glândulas salivares é apontado como o local que abriga células de reserva/ células-tronco, contribuindo para a manutenção e regeneração da glândula salivar adulta (KISHI et al. 2006; REGEZI e BATSAKIS 1977). DEBIEC-RYCHTER et al (2001), em estudo genético e imunoistoquímico, mostraram a expressão do gene e proteína PLAG1 em todas as células do adenoma pleomórfico, com ênfase no elemento mesenquimal, favorecendo a hipótese da clonalidade de células multipotentes como origem do tumor. Baseados nessas evidências, GURBUZ et al (2006), em um novo estudo imunoistoquímico sugerem que o tumor se origine de células-tronco.

Apesar desses intensos debates na literatura científica e das diversas evidências experimentais demonstradas pelos diversos pesquisadores, a teoria sobre a localização de células-tronco/multipotente ou compartimento regenerativo da glândula salivar ainda não foi cabalmente demonstrada, bem como sua relação com o adenoma pleomórfico.

2.2 A MORFOGÊNESE DAS GLÂNDULAS SALIVARES

As glândulas salivares iniciam seu desenvolvimento a partir de botões epiteliais que se originam do epitélio bucal na vida fetal precoce (HAND 1986; HIATT e SAUK 1991; TONGUE e LUKE 1994, BERKOWITZ et al. 1992).

O primórdio da glândula parótida humana aparece entre a 4^a e 6^a semana de vida intra-uterina nas dobras laterais do estomatodeum. A

glândula submandibular origina-se do soalho bucal durante a 6ª semana e a sublingual se forma lateralmente ao primórdio da submandibular entre a 7ª e 8ª semana de vida intra-uterina. Todas as glândulas salivares menores formam-se mais tardiamente a partir do epitélio de revestimento de áreas específicas da cavidade bucal (HAND 1986; TONGUE e LUKE 1994; DALE 1994; ELLIS e AUCLAIR 1996).

Apesar dos sítios e do tempo de desenvolvimento diferirem significativamente entre as diversas glândulas, o processo envolvido no desenvolvimento é similar e sofre influências de fatores extrínsecos e intrínsecos que regulam o processo de morfogênese, proliferação e diferenciação celular. (CUTLER 1990; KLEIN 1994; DENNY et al. 1997).

Entende-se por processo de morfogênese das glândulas salivares as etapas que levam ao arranjo lobulado, característico desse tecido, enquanto que a diferenciação compreende os processos de amplificação da síntese e armazenamento dos grânulos de secreção. A combinação desses dois processos é denominada de citodiferenciação. Estudos sugerem que a morfogênese e a citodiferenciação das glândulas salivares estão parcialmente ligadas, mas são reguladas por processos distintos, sendo que a expressão total de um dos dois processos é modulada ou controlada pela matriz extracelular (CUTLER 1990).

O desenvolvimento das glândulas salivares pode ser dividido em cinco estágios:

O primeiro estágio (pré-botão) envolve a indução da proliferação do epitélio de superfície pelo mesênquima adjacente resultando no

espessamento e formação dos botões epiteliais. O botão em crescimento é separado do mesênquima condensado pela lâmina basal secretada pelo próprio epitélio (BERNFELD et al. 1972; HAND 1986; HIATT e SAUK 1991; KLEIN 1994; ELIS e AUCLAIR, 1996).

O segundo estágio (**botão inicial**) é representado pela formação e crescimento dos cordões epiteliais principais. Nesse estágio observa-se a proliferação das células dos botões formando cordões celulares sólidos, constituídos por duas camadas de células, associados à condensação e proliferação do mesênquima adjacente. Ultra estruturalmente, as células indiferenciadas que compõem os cordões são caracterizadas como células cubóides irregulares, contendo numerosos ribossomos livres, nucléolos proeminentes e complexo de Golgi e retículo endoplasmático rugoso pouco desenvolvidos (BERNFELD et al. 1972; HAND 1986; CUTLER 1990; HIATT e SAUL, 1991; KLEIN 1994; ELLIS e AUCLAIR 1996). ADI e CHISHOLM (1994), observaram que as células epiteliais que compõem os cordões sólidos de glândulas submandibulares humanas exibem material PAS (Periodic Acid Schiff) positivo no seu interior.

O terceiro estágio (**pseudoglandular**) corresponde à ramificação da porção terminal dos cordões epiteliais e à continuação da diferenciação glandular. Neste, os cordões epiteliais proliferam rapidamente e ramificam-se em bulbos terminais que são compostos por 10 a 12 células.

O quarto estágio (**canalicular**) corresponde às repetidas ramificações dos cordões epiteliais nas porções terminais formando os lóbulos compostos por um sistema de bulbos ramificados como uma árvore (processo de

arborificação). Nesse estágio a cápsula da glândula começa a se formar a partir do mesênquima e circunscreve o parênquima glandular (BERNFELD et al. 1972, HAND 1986; CULTER 1990; HIATT e SAUK 1991; KLEIN 1994; ELLIS e AUCLAIR, 1996).

Neste estágio também ocorre a canalização dos cordões epiteliais com a formação de um orifício criando um tubo ou ducto. Estudos experimentais indicaram duas teorias a respeito do mecanismo de canalização: (1) graus diferentes de proliferação entre camadas externas e internas dos cordões epiteliais, (2) secreção do fluido pelas células ductais, o que aumenta a pressão hidrostática e produz um lúmen junto ao cordão. Tanto a ramificação das estruturas ductais quanto o crescimento dos septos de tecido conjuntivo continuam neste estágio do desenvolvimento (HAND 1986; HIATT e SAUK, 1991; KLEIN 1994; ELLIS e AUCLAIR, 1996).

A citodiferenciação dos tipos celulares específicos das glândulas salivares parece ser iniciada após as características de arborificação estarem estabelecidas (CUTLER 1990).

O quinto estágio (**botão terminal**), ou seja, a de citodiferenciação funcional dos ácinos e ductos intercalados, representa a diferenciação morfológica das glândulas salivares em desenvolvimento. Durante esse período a atividade mitótica ao invés de ocorrer em todo o cordão epitelial, irá ocorrer apenas na porção terminal do bulbo, onde as células irão se diferenciar em células dos túbulos terminais e pró-acinares. Com a formação dos lúmens nos bulbos terminais ocorrem fissuras nas células circunjacentes fazendo com que cada bulbo terminal fique dividido em várias subunidades

constituídas por duas camadas de células circundando um lúmen e que são chamadas de túbulos terminais. Nesta fase as unidades da porção terminal luminal estão pouco diferenciadas para serem chamadas de ácinos e são conhecidas como sacos terminais. Acredita-se que as células externas originem as células mioepiteliais e basais enquanto que as células internas sofrem diferenciação para acinares e luminais (KLEIN 1994; ELLIS e AUCLAIR 1996).

As células mioepiteliais provavelmente são originadas das células epiteliais externas localizadas nos túbulos terminais e desenvolvem-se concomitantemente com a citodiferenciação das células acinares. A diferenciação das células mioepiteliais está caracterizada pela agregação de microfilamentos e demonstração imunoistoquímica da actina, miosina e filamentos intermediários de pré-queratina (YAKU 1983; KLEIN 1994).

A maturação das células acinares ocorre em estágios específicos classificados de acordo com a morfologia dos grânulos de secreção e das organelas celulares, sendo diferente entre os ácinos mucosos e serosos. O primeiro sinal de diferenciação dos sacos terminais em ácinos está relacionado com o aumento da dilatação das cisternas do retículo endoplasmático rugoso pelas proteínas secretórias, seguido da observação de grânulos secretórios agranulados e presença de complexo de Golgi funcional. Progressivamente, as quantidades de retículo endoplasmático rugoso, Golgi e grânulos secretórios vão aumentando com a maturação dos ácinos (YAKU 1983; KLEIN 1994).

Os ductos excretores das glândulas salivares diferenciam-se a partir dos cordões principais: as ramificações distais dos cordões principais originam os grandes ductos estriados, enquanto os ductos intercalares (onde se acredita que há células-tronco), pequenos ductos estriados, células secretoras e mioepiteliais originam-se das células dos túbulos terminais. A diferenciação dos ductos excretores e estriados maiores ocorre apenas após os cordões celulares sólidos terem sofrido canalização (HAND 1986; DALE 1994; ELLIS e AUCLAIR 1996; DENNY et al. 1997).

Os estímulos provenientes dos mecanismos secretores e da inervação da glândula são responsáveis pela continuação e maturação da citodiferenciação, porém a glândula será totalmente formada no período pós-natal. Este desenvolvimento pós-natal está relacionado com: (1) a maturação do estímulo de secreção, que é responsável pela ativação dos receptores de membrana que sinalizam caminhos de transdução de sinal junto à célula e controlam a secreção das células; e com (2) o estabelecimento de conexões neurais do sistema nervoso autônomo, que é o primeiro regulador da função das glândulas salivares (HAND 1986; LEE et al. 1990; KLEIN 1984; ELLIS e AUCLAIR 1996).

Como resultado do processo de desenvolvimento acima descrito as glândulas salivares tomam a forma de estrutura composta túbulo-acinar, o que indica a presença de um sistema ductal ramificado e unidades secretórias com porção tubular e acinar. Essas glândulas são exócrinas, cujas secreções fluem para o interior da cavidade bucal.

2.3 CÉLULAS-TRONCO

2.3.1 História das Células-Tronco Tumorais

A origem das neoplasias e seus aspectos microscópicos vêm sendo há muitos anos motivo de pesquisa. Patologistas alemães liderados por Joannes Muller, por volta de 1840, foram os primeiros a examinar microscopicamente espécimes tumorais. A partir daí, seus alunos começaram a estudar a origem dos tumores. Rudolf Virchow foi o primeiro a reconhecer que apenas “*pequenos glóbulos*”, os quais ele chamou “células” tinham a capacidade de multiplicar-se independente, tornando-se os verdadeiros “*cidadãos do organismo*”. Ele postulou que essas células eram provenientes de células normais. (SHIMKIN, 1977; HOUGHTON et al. 2007). Julius Conhnheim, outro aluno de Muller, teve uma abordagem diferente, e em 1867 propôs que os tumores eram derivados não de tecido adultos normais, mas de restos de células embrionárias do tecido adulto. Finalmente, Wilhelm Waldeyer com uma série de estudos detalhada propôs que os carcinomas eram derivados de estruturas epiteliais adultas, apontando a célula de origem do câncer como epitelial ou endotelial. (RATHER 1978; HOUGHTON et al. 2007).

Dois séculos mais tarde Percival Pott’s desenvolveu um estudo de casos de câncer do testículo em limpa-chaminés e Ames, baseado nesses achados, demonstrou que esses tumores eram causados por mutações genéticas (SHIMKIN 1978; HOUGHTON et al. 2007). Durante o século XX e início do século XXI, inúmeros estudos genéticos e moleculares foram

desenvolvidos para melhorar a compreensão sobre a biologia e origem dos tumores, o que culminou na teoria multifatorial da carcinogênese – iniciação, promoção e expansão. Mais recentemente os estudos avançam com o conceito de que neoplasias podem envolver ou originar-se de células multipotentes ou pluripotentes (células-tronco), ressuscitando a teoria do pesquisador e patologista Julius Cohnheim (FISHER e HOLLOMON 1951; NORDLING 1953; POTTER 1978; HOUGHTON et al. 2007).

2.3.2 Definições Atuais de Células-Tronco

Os estudos mais recentes sobre células-tronco tiveram um impulso a partir de meados do século XX (1950) com pesquisas envolvendo o sistema hematopoiético e geraram o conceito de que essas células têm a capacidade de auto-renovação e de formar descendentes diferenciados. (FORD et al. 1956; SIMINOVITCH et al. 1963; TILL e MCCULLOCH 1963). Atualmente o termo células-tronco engloba desde células-tronco embrionárias até células-tronco adultas. Essas últimas têm sido identificadas em muitos tecidos diferentes como mama, intestino, sistema nervoso central, músculo esquelético, polpa dentária, etc. Nas glândulas salivares as células-tronco ainda são pouco estudadas (REYNOLDS e WEISS 1992; STEMPLER e ANDERSON 1992; DONTU et al. 2003; COLLINS et al. 2005; RADTKE e CLEVERS 2005; SHACKLETON et al. 2006; ROTTER et al. 2007; SATO et al. 2007).

Na maioria dos tecidos existe uma pequena fração de células com capacidade de multiplicar-se, dando origem a células que irão proporcionar a

renovação e regeneração tecidual e, ao mesmo tempo, mantendo esta própria característica de células de reserva. Essas células, denominadas células-tronco órgão-específicas, são as responsáveis pela manutenção da integridade dos tecidos adultos, pelo reparo de tecidos lesados e pela remodelação dos tecidos e órgãos (ZAGO e COVAS 2006; OLIVEIRA et al. 2010).

As células-tronco têm uma capacidade limitada de diferenciação e em geral podem dar origem a um único ou alguns poucos tipos de células diferenciadas, restritas ao tecido de onde derivam, sendo então classificadas como unipotentes, oligopotentes ou multipotentes. Porém, há outros tipos de células-tronco com potenciais diferentes, como as células-tronco totipotentes, que podem produzir todas as células embrionárias e extra embrionárias; e as pluripotentes, que podem produzir todos os tipos celulares do embrião, com exceção da placenta e anexos placentários (ZAGO e COVAS 2006).

Células-tronco adultas diferem de outras células do organismo por apresentarem características como:

- a) são células indiferenciadas e não-especializadas;
- b) são capazes de se multiplicar por longos períodos mantendo-se indiferenciadas, de forma que um pequeno número pode originar uma grande população de células semelhantes;
- c) são capazes de se diferenciar em células especializadas de um tecido em particular.

Essas células são capazes de sofrer divisões assimétricas, podendo originar células que permanecem indiferenciadas, repondo a população de células-tronco, ou podem se diferenciar em células especializadas. (ZAGO e COVAS 2006).

As características específicas das células-tronco envolvem uma capacidade ilimitada de auto-renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, o que as fazem ser muito importantes na fisiologia normal e em condições patológicas (SMALLEY e ASHWORTH 2003; CARIATI & PURUSHOTHAM 2008). As células-tronco adultas desempenham um papel crucial nos processos de regeneração dos vertebrados. Isto foi demonstrado em muitos sistemas de modelo animal, onde as células do local da lesão tiveram a capacidade de se diferenciar e proliferar rapidamente regenerando membros, olhos, coração, intestino, maxila e mandíbula (RAPOPORT et al. 2009; KISHI et al. 2006).

No entanto, as mesmas qualidades também podem representar uma séria ameaça ao organismo hospedeiro, caso sua diferenciação torne-se deficiente e sua capacidade proliferativa descontrolada. Acredita-se que a desregulação do processo de auto-renovação baseado em células-tronco possa participar das etapas multifatoriais de iniciação, promoção e expansão na carcinogênese, o que pode ser a chave para a compreensão desse processo (KAKARALA e WICHA 2008; OLIVEIRA et al. 2010).

Os tecidos epiteliais são sujeitos a contínua remodelação e renovação. Essa renovação tecidual inclui a proliferação lenta de células-tronco que são de longa duração, o que as deixa mais expostas e

susceptíveis a mais danos do que as células mais diferenciadas, podendo acumular mutações que serão transmitidas à proliferação de suas células-filhas (OLIVEIRA et al. 2010).

Muitos tecidos adultos têm sido identificados como potenciais fontes de células-tronco, como supracitado. Nesses vários órgãos há uma reunião de esforços para se identificar, isolar e compreender o funcionamento das células-tronco, frente à perspectiva destas serem empregadas como modalidade terapêutica de várias doenças (GOLDING et al. 1995; TROPEPE et al. 2000; TOMA et al. 2001; DONTU et al. 2003; ARAI et al. 2004; BRITTAN e WRIGHT 2004; HISATOMI et al. 2004; LAVKER et al. 2004; SEABERG et al. 2004; TUMBAR et al. 2004; KIM et al. 2005; LERI et al. 2005; SEEBERGER et al. 2006; SHACKLETON et al. 2006; ROTTER et al. 2007; SATO et al. 2007; LOMBAERT et al. 2008).

2.3.3 Células-Tronco e a Origem das Neoplasias

Células-tronco também têm sido investigadas em neoplasias, no sentido de se compreender de forma mais efetiva o padrão evolutivo dos tumores para determinação de terapias mais eficazes no seu controle.

Tem sido evidente que células-tronco estão envolvidas em processos diversos como cicatrização, metaplasia e câncer. A idéia de que o câncer pode conter células-tronco tumorais (CTT) ganhou aceitação com os experimentos de HAMBURGER e SALMON (1977), que demonstraram que poucas células tumorais foram capazes de formar colônia *in vitro*, produzindo todos os tipos de células dentro de um tumor.

Uma propriedade que todos os tumores têm em comum, é a variabilidade entre as células tumorais dentro de um único tumor. Essas células diferem-se com características morfológicas, tamanho, composição da membrana e expressão de diversos antígenos, além de possuírem comportamentos diferentes, como a taxa de proliferação, potencial metastático e sensibilidade a agentes terapêuticos (CAMPBELL e POLYAK, 2007). Em diversos tipos de tumores sólidos, como tumores de mama, a existência de uma distribuição hierárquica das células tumorais é amplamente aceita. Na teoria, acredita-se que apenas uma pequena subpopulação de reposição de células-tronco pode dar origem à diversidade de células diferenciadas que compõem a massa tumoral. Algumas pesquisas têm identificado uma pequena subpopulação de células com características peculiares e, portanto mais agressivas, dentro de tumores primários e metastáticos de mama (AL-HAJJ et al, 2003; ABRAHAM et al, 2005; COLLINS et al, 2005; O'BRIEN et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2010). Nas neoplasias benignas estas informações ainda não foram confirmadas.

É possível que o desenvolvimento de células-tronco tumorais possa envolver alguns eventos como (KLONISH et al. 2008):

- Alteração no microambiente do nicho de células-tronco dentro de um tecido;
- Alteração no metabolismo celular, controle e/ou progressão do ciclo-celular;
- Amplificação da população celular com alteração de fenótipo molecular que dão origem a tumores primários e metástases.

As características principais das CSCs (*Cancer Stem-Cells*) são: capacidade de auto-renovação, habilidade de gerar tumores com poucas células, divisão celular lenta, capacidade de dar origem á uma célula-filha fenotipicamente diversa, e resistência à apoptose, radioterapia e quimioterapia, além da capacidade de migração e propagação à metástase (REYA et al, 2001). As principais características de auto-renovação e diferenciação levam à produção de todos os tipos de células em um tumor, gerando heterogeneidade tumoral (CAMPBELL e POLYAK, 2007; DONTU et al, 2003; OLIVERA et al, 2010).

2.3.4 Identificação das Células-Tronco

A identificação de células-tronco nos diversos sistemas biológicos – normais e neoplásicos é difícil e pesquisadores empenham esforços para desenvolver marcadores moleculares e protéicos considerados identificadores de células-tronco, entre eles CD24, CD44, CD133, c-Kit, Musashi-1.

O CD24 é uma glicoproteína de superfície expressa em todas as fases de desenvolvimento dos linfócitos B e na maioria dos timócitos. Este marcador, também está presente nos monócitos, células de Langerhans e hemácias (progenitores hematopoiéticos) (HOUGH et al. 1994). O antígeno é também expresso em carcinoma de células renais, carcinoma do pulmão de pequenas células e o neuroblastoma (AKASHI et al. 1994). Funcionalmente, o CD24 aumenta o potencial metastático das células malignas, pois tem sido identificado como um ligante P-selectina, um

receptor de adesão em células endoteliais ativadas e plaquetas (OLIVEIRA et al, 2010).

O CD44 é uma glicoproteína transmembrana tipo 1, envolvida na interação célula-célula, adesão celular e migração. É encontrada em células-tronco hematopoiéticas, tecidos epiteliais e não epiteliais, e está envolvida na adesão de leucócitos a células endoteliais em resposta a processos inflamatórios, células do estroma e da matriz extracelular (SACKSTEIN et al. 2008). Este marcador de superfície celular, tem sido utilizado para identificar CSCs em tumores de mama (SHIPITSIN et al. 2007), bem como outros tipo de tumor, como os de próstata (COLLINS et al. 2005), pâncreas (LI et al. 2007), e carcinoma de cabeça e pescoço (PRINCE et al. 2007). KOGLER e colaboradores (2004) isolaram células das amostras de sangue de cordão umbilical humano, e denominaram USSC (*unrestricted somatic stem cell*). Essas células expressaram altos níveis de CD44 e diferenciaram-se *in vitro* em osteoblastos, condroblastos, adipócitos, células hematopoéticas e células neurológicas. Quando transplantadas em modelos animais, pôde-se demonstrar sua incorporação em reparação óssea, em condrogênese, em células parenquimatosas hepáticas e em cardiomiócitos. Além disso, tumores como carcinoma papilífero de tireóide, carcinomas de mama, bexiga, ovário, colo de útero, próstata, melanoma e linfomas não-Hodgkin expressam esta proteína (RHIJIN et al. 2003).

O CD133 é uma glicoproteína de superfície celular, também conhecida como prominin-1, expressa por células-tronco hematopoiéticas

imaturas e por outras células progenitoras, incluindo as do epitélio, onde são encontradas na superfície apical das células. Inclui-se também células-tronco neurais e embrionárias (CORBEIL et al. 2010). Mais tarde, essa proteína foi usada para purificar CSCs em vários tipos tumorais (SINGH et al. 2004; MIZRAK et al. 2008). Além disso, essa glicoproteína, tem sido observada em neoplasias, incluindo leucemias (SHMELKOV et al. 2005). Contudo, tem sido especulado que o CD133 possa exercer algum papel na interação célula-célula e que possa estar envolvido no desenvolvimento fetal e na homeostase de órgão maduros (YU et al. 2002).

O proto-oncogene c-Kit, também conhecido como CD117, é um receptor transmembrânico tirosina-quinase que tem estrutura semelhante ao receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF-R). Esta proteína tem papel importante no desenvolvimento de muitos processos embrionários, incluindo gametogênese, melanogênese e hematopoiese (MIETTINEN e LASOTTA 2005). A proteína Kit é ativada por fosforilação, levando a uma cascata de ativação de genes que regulam uma variedade de respostas biológicas incluindo proliferação celular, diferenciação celular, apoptose, quimiotaxia e adesão celular. Mutação em c-Kit têm sido considerado importante no crescimento e progressão tumoral. Esse receptor também tem sido descrito como importante marcador de células-tronco, como por exemplo, na linhagem hematopoiética (EDLING e HALBERG 2007).

Musashi-1 (também conhecido como Msi1), faz parte de uma família de proteínas conservadas evolutivamente ligantes de RNA (RNA-binding)

que é preferencialmente expressa no sistema nervoso, além de ser altamente observada em células-tronco neurais fetais e adultas. Desempenha um papel essencial na regulação da divisão celular assimétrica de células precursoras ectodérmicas conhecidas como células precursoras de órgãos sensoriais através da regulação traducional de mRNA alvo (OKANO et al. 2005). Essa proteína é seletivamente expressa em células progenitoras neurais, incluindo células-tronco neurais. Além disso, a família Musashi é importante para a manutenção do papel da diferenciação de células-tronco e tumorigênese (KANEMURA et al. 2002).

Outros marcadores que identificam células-tronco podem ser encontrados na literatura científica, porém a sua aplicação e real efetividade de uso em humanos não são completamente elucidadas.

2.3.5 Células-tronco e glândula salivar

As glândulas salivares também foram descritas como uma valiosa fonte de células-tronco. SATO et al. (2007), isolaram e caracterizaram células progenitoras obtidas de glândulas salivares humanas e observaram que elas se diferenciaram em células hepáticas e pancreáticas. Outros estudos também relatam a caracterização e isolamento de células-tronco de glândulas salivares em várias espécies como ratos, camundongos e suínos. Todas essas células têm como característica comum a expressão de c-kit (RAPOPORT et al. 2008; ROTTER et al. 2007).

Outros marcadores foram considerados importantes identificadores de células-tronco nas glândulas salivares e em lesões derivadas de tecidos

glandulares, como o CD133 (Prominin-1), que foi descrito inicialmente por YIN et al. (1997), como marcador de células primitivas hematopoiéticas e neurais e que devido a essa característica despertou interesse quanto ao seu potencial de possível marcador de células-tronco adultas (MIZRAK et al. 2008). Com isso, esse marcador pode nos revelar a existência de células-tronco na estrutura ductal das glândulas salivares (KARBANOVÁ et al. 2008).

Alguns autores também apontam o c-Kit e musashi-1 como marcadores de células-tronco em ductos de glândulas salivares. Assim, esses achados reforçam a idéia de que células-tronco podem residir no compartimento ductal das glândulas salivares (LOMBAERT et al. 2008).

Em tumores de mama, foi identificado um subgrupo de células com características de células-tronco que expressam fortemente o CD44 e que tem expressão baixa ou ausente de CD24 (HOPE et al. 2004). A expressão positiva ou negativa do CD24 tem sido utilizado em conjunto com outros marcadores para identificar células-tronco em tumores (OLIVEIRA et al. 2010). Nas glândulas salivares, o CD44 foi identificado no mioepitélio das glândulas salivares normais, o que evidência a função dessa molécula na regulação do crescimento e renovação do tecido normal e, potencialmente, na morfogênese das neoplasias de glândula salivar, mas ainda não há estudos globais da distribuição desta proteína nos diversos tipos celulares epiteliais e nas células mioepiteliais que constituem o tecido salivar adulto (FONSECA et al. 2000).

Nas neoplasias das glândulas salivares a importância das células-tronco ou de células multipotentes ainda não foi explorada, embora já seja bem estabelecida a relação de diversos tumores das glândulas salivares com o compartimento intercalar-acinar (considerada a região regenerativa e que abriga as células-tronco dessas glândulas). Das neoplasias originárias desse segmento glandular e a possível relação com células-tronco/multipotentes, destaca-se o adenoma pleomórfico dada a sua marcante diversidade arquitetural e diferenciação celular. Assim, os aspectos morfológicos do adenoma pleomórfico podem servir como modelo para a compreensão da participação de células com marcadores similares aos de células-tronco/multipotentes, em lesões derivadas do segmento intercalar-acinar das glândulas salivares.

Nosso objetivo portanto, foi investigar na composição do adenoma pleomórfico (que é derivado do ducto intercalado), a presença de células que expressem marcadores de células-tronco. Para completar a investigação, também estudamos a possível presença de células positivas para esses marcadores em glândulas salivares normais adultas e em espécimes de glândulas salivares em desenvolvimento, derivadas de fetos humanos.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVOS GERAIS

A proposta dessa pesquisa foi identificar a presença de células que expressem marcadores de células-tronco na composição de adenomas pleomórficos.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 Identificar a presença de células positivas para os marcadores CD24, CD44, CD133, Musashi-1 e c-Kit, citados na literatura como proteínas identificadoras de células-tronco, em casos de adenoma pleomórfico por meio da técnica de imunoistoquímica;
- 2 Correlacionar a possível presença de que compartilhem os marcadores que identificam células-tronco com os aspectos morfológicos do adenoma pleomórfico;
- 3 Avaliar a expressão dos genes *CD24*, *CD44*, *CD133*, *Musashi-1* e *c-Kit* por meio da técnica de real-time PCR.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 SELEÇÃO DO MATERIAL

4.1.1 Adenoma Pleomórfico

Foram selecionados um total de 101 casos de adenoma pleomórfico dos arquivos do Hospital A.C. Camargo:

Cinqüenta e cinco (55) casos foram provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo e, portanto, mantidos em blocos de parafina;

Sessenta casos (60) consistiam de amostras de tecido congelado de adenoma pleomórfico (proveniente de ressecções do tumor), obtidos do banco de tumores do Hospital A.C. Camargo. Esses casos foram utilizados nos ensaios de análise molecular por reação em cadeia de polimerase em tempo real (Real Time-PCR).

Dos 55 casos de adenoma pleomórfico provenientes dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica, 14 casos eram pareados com casos que cujo tecido também foi armazenado no Banco de Tumores Congelados (amostras pareadas).

Os espécimes incluídos no estudo compreenderam casos consecutivos do arquivo sem restrição de idade, sexo, raça, localização e tamanho da lesão e tipo de tratamento. Por se tratar de neoplasia benigna, não houve restrição quanto ao período de seguimento do doente.

Foram excluídos do estudo os casos que não apresentaram material suficiente para a realização da etapa laboratorial do trabalho.

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Instituição (número do protocolo de aprovação: 1257/09 – Anexo 1).

Dados demográficos de cada caso, incluindo sexo, idade e localização da lesão foram colhidos dos prontuários arquivados no SAME (Serviço de Arquivos Médicos e Estatísticos) do Hospital A.C. Camargo.

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) de cada caso foram recuperadas dos arquivos do Departamento de Patologia Cirúrgica deste Hospital e re-analisadas por 2 patologistas para checagem das estruturas neoplásicas.

Após a escolha do fragmento do tumor a ser utilizado na pesquisa, os blocos de parafina contendo o tecido correspondente à lâmina selecionada foram separados e cortes histológicos desse material, a 3µm de espessura, colhidos em lâmina preparada com organo-silano foram utilizados para a realização da técnica de imunoistoquímica para detecção de proteínas identificadoras de células-tronco.

4.1.2 Glândulas salivares normais adultas e glândulas salivares em desenvolvimento

Foram utilizados espécimes de 20 glândulas salivares dissecadas de embriões/fetos humanos em diferentes estágios gestacionais, provenientes de abortos espontâneos. Todos os fetos pesavam menos de 500 gramas, sendo considerados peças cirúrgicas. As idades gestacionais dos fetos (8 a

26 semanas de vida-intrauterina) foram determinadas por meio da medida plantar segundo MCBRIDE et al. (1984) no momento da dissecação. Esse material pertence aos arquivos de Patologia Geral da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, e foi cedido para a realização desse trabalho.

Os espécimes emblocados em parafina foram cortados a uma espessura de 3µm e corados em hematoxilina e eosina para checagem das estruturas glandulares presentes.

Trinta (30) espécimes de glândulas salivares normais provenientes de margens cirúrgicas também foram incluídos no estudo. Essas glândulas salivares compreenderam glândulas mucosas (menores) de várias regiões da cavidade oral, e glândulas salivares maiores - parótida, submandibular e sublingual.

4.2 IMUNOISTOQUÍMICA

Os cortes de 3µm foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo à temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os cortes foram re-hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 70%), para a remoção de pigmentos formólicos, e posteriormente, água corrente por 5 minutos.

Recuperação dos epítomos antigênicos e outras peculiaridades do protocolo foram determinados durante a etapa experimental do trabalho.

Após a lavagem em água corrente e água destilada, realizou-se a incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (10 volumes) 3 vezes por 5 minutos cada, com o intuito de se bloquear a peroxidase endógena tecidual.

Repetida a lavagem com água corrente e água destilada, as lâminas foram incubadas com solução Protein block (DakoCytomation, Carpinteria, USA) por 20 minutos à temperatura ambiente em câmara úmida, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais.

Em seguida, os cortes foram incubados com o soro primário diluído em diluente contendo 0,05mol/L de tampão Tris-HCL e 0,1% de Tween 20 (*Antibody Diluent with Background Reducing Components*, DakoCytomation, Carpinteria, USA) e colocadas a 4°C, *overnight* em câmara úmida. Informações sobre os anticorpos e etapas específicas do protocolo estão descritas na Tabela 1.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em tampão PBS pH 7.4, durante 5 minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com anticorpo secundário, contendo *pool* de anticorpo anti-camundongo e anti-coelho, utilizando o *kit Advanced™ HRP* (DakoCytomation, Carpinteria, USA) em 2 etapas de 30 minutos cada.

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador 3'3'- diaminobenzidina - DAB (DakoCytomation, Carpinteria, USA) que evidencia a reação por meio de coloração castanha.

Os cortes foram lavados em água corrente e água destilada e contracolorados com hematoxilina de Carazzi por 3 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em três banhos de xilol, e montados em resina *permount* para o exame ao microscópio de luz.

Os controles negativos das reações supracitadas foram realizados por meio da incubação de espécimes com soro não-imune. Os controles positivos foram utilizados de acordo com informações do fabricante de cada anticorpo. Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

As reações foram analisadas em microscópio óptico e os dados estudados de forma qualitativa e semi-quantitativa.

Os dados foram fotografados com equipamento fotográfico digital.

Tabela 1 – Anticorpos utilizados e sua procedência.

Anticorpo	Clone	Procedência	Protocolo	Título
CD 24	SN3	Neomarkers	BM/ Citrato pH:6.0	1:100
CD 44 (H-Cam)	F-10-44-2	NovoCastra	PP/ Citrato pH:6.0	1: 40
CD 133	Policlonal	Abcam	PP/ Edta-Tris pH:9.0	1:100
c-Kit	T595	Abcam	BM/ Edta-Tris pH:9.0	1:500
Musashi-1	Policlonal	Abcam	BM/ Citrato pH:6.0	1:650

BM: banho-maria a 96°C

PP: panela de pressão

4.3 TÉCNICAS MOLECULARES

4.3.1 Extração do RNA

Os tecidos congelados de tumores de adenoma pleomórfico, retirados do Banco de Tumores do A.C.Camargo foram submetidos à análise histológica por um patologista qualificado para avaliar a porcentagem do tecido de interesse. Somente amostras com pelo menos 70% de células tumorais foram incluídos no estudo e seguiram para extração do RNA no Laboratório de Extração de Macromoléculas do Hospital A.C.Camargo.

Foram dissecadas manualmente amostras que continham fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes. Brevemente, cerca de 30mg do tecido congelado foi homogeneizado pelo equipamento Precelly®s (Carlsbad, California, USA) e o RNA total foi extraído usando o RNeasy Mini kit (Qiagen, Venlo, Netherlands), de acordo com as recomendações do fabricante.

A concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific) e a integridade foi determinada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 (Agilent Technologies, Palo Alto, Califórnia, EUA). O Bioanalyzer fornece um número de integridade do RNA (RIN-RNA Integrity Number) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 a um RNA íntegro.

Os protocolos acima foram realizados pelo Laboratório de Extração de Macromoléculas da Profa. Dra. Dirce Maria Carraro.

4.3.2 Tratamento e Quantificação das Amostras com DNase

O RNA total foi submetido à digestão com enzima *DNase I* para a eliminação do DNA genômico residual. Brevemente, o RNA total foi incubado em solução tampão 1X, contendo: 20 mM de Tris HCl pH 8.4, 2 mM $MgCl_2$, 50 mM de KCl e 1U de *DNase I* e 1 μ g de RNA à temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi posteriormente inativada pela adição de 2,5 mM de EDTA e incubação a 65°C por 10 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram precipitadas por 16 horas a - 20°C em solução de acetato de sódio 0,2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com etanol 75% e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi então seco e ressuspenso em água "DNase/RNase free".

Após o tratamento a concentração e a pureza do RNA foram avaliadas no equipamento Nanodrop™ ND (Thermo Scientific).

4.3.3 Síntese de cDNA e Transcrição Reversa

O cDNA foi sintetizado utilizando-se 1 μ g de RNA total usando o Kit High Capacity cDNA Reverse Transcriptase (Applied Biosystems, Foster City, CA) e 1U/ μ L de RNase Out (Invitrogen, Carlsbad, CA) de acordo com o protocolo do fabricante. A reação foi incubada a 25°C por 10 minutos, seguido por 37°C por 120 minutos e 85°C por 5 segundos. O cDNA foi estocado a -20°C.

4.3.4 Controle de Contaminação por DNA genômico

A eficiência da transcrição reversa do RNA e a possível presença de contaminação por DNA genômico no cDNA foi avaliada pela amplificação por PCR do gene β -actina.

A PCR foi realizada utilizando um iniciador para β -actina que amplifica regiões intrônicas e outra reação de PCR para o mesmo gene endógeno (β -actina), utilizando um par de primers que amplificam DNA genômico em 300pb e cDNA em 110pb.

A reação foi feita em 20 μ L totais, utilizou-se de 10ng de cDNA, 0,4 μ L dos primers *Forward* (F) e *Reverse* (R) (ambos 10ng), (F- 5'-GCACCCAGCACAATGAAG-3'; R- 5'-CTTGCTGATCCACATCTGC-3'), 0,4 μ L de dNTP mix (10mM), 2,0 μ L de *buffer* de RT 10x, 0,6 μ L de MgCl (50 mM) e 0,2 μ L de Platinum™ Taq DNA Polimerase 1U (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA). A amplificação foi realizada com o seguinte ciclo: 95°C por 5 minutos para a desnaturação da molécula e ativação da Platinum Taq, 35 ciclos de 94°C por minuto, 60°C por 1 minuto e 72°C por 1 minuto e extensão final de 72°C por 5 minutos.

Os produtos dessa reação foram avaliados por eletroforese em gel de agarose a 2%, contendo Sybr Safe (Invitrogen Corporation, Carlsbad, Califórnia, USA). Após a separação eletroforética as amostras foram visualizadas em transluminador com ultravioleta e o gel foi fotografado (Figura 1).

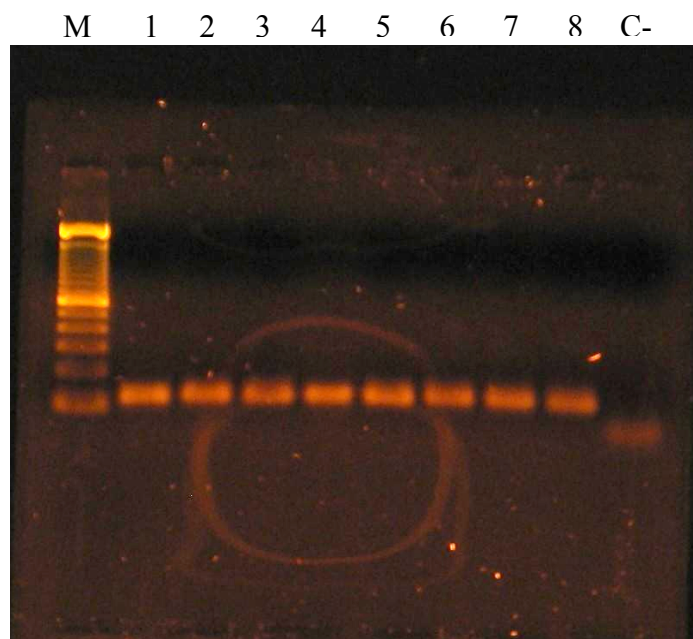


Figura 1 - Gel de agarose 2% representativo da análise por RT-PCR. Das amostras de cDNA de adenoma pleomórfico, amplificadas com primers para o gene da β -actina. M, marcador de peso molecular 100pb. C-, controle negativo.

4.3.5 PCR em tempo real

Os ensaios de PCR em tempo real (real time-PCR) para os genes alvos (*CD24*, *CD44*, *CD133*, *c-Kit* e *Musashi-1*) foram realizados utilizando-se o sistema de fluorescência TaqMan (Applied Biosystems, Foster City, CA) e primers e sondas comerciais (Applied Biosystems, Foster City, CA) : *CD24* – Hs02379687_s1; *CD44* – Hs00153310_m1; *CD133* – Hs01009259_m1; *c-Kit* – Hs00922210_m1 e *Musashi-1* – Hs01045894_m1.

Os ensaios de Real Time-PCR para os genes foram realizados utilizando-se o aparelho ABI Prism 7900 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA). As reações foram realizadas em um volume de 20 μ L contendo 10ng de cDNA e 1X de TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems, Foster City, CA), 0,2 μ M dos oligonucleotídeos/sondas dos

genes de interesse e 0,2 μ M dos oligonucleotídeos/sondas dos genes *B₂*-microglobulina e 18S. A amplificação foi realizada com 1 ciclo de 50° por 2 minutos, 95° por 5 minutos, seguidos por 40 ciclos (95° por 30s, 55° por 30s e 72° por 30s). As reações foram realizadas em duplicatas.

A detecção dos produtos foi feita pelo contínuo monitoramento do sinal fluorescente emitido pela fluorescência TaqMan. Dessa forma, os valores quantitativos foram obtidos a partir do ciclo limiar (CT) onde o aumento no sinal associado ao crescimento exponencial dos produtos de PCR começa a ser detectado.

A quantificação relativa foi calculada por $2^{(-\Delta\Delta CT)}$ (onde, ΔCT , CT do gene alvo menos a média geométrica dos CTs dos genes endógenos (*B₂*-microglobulina e 18S.), $\Delta\Delta CT$, ΔCT da amostra de tumor menos ΔCT da amostra referência (Pool de tecido normal)).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A associação entre a expressão das proteínas CD24, CD44, CD133, c-Kit e Musashi-1 e os parâmetros clínicos demográficos foram avaliados pelo teste de qui-quadrado. O teste de Mann-Whitney foi usado para determinar a associação entre a expressão dos genes *CD24*, *CD44*, *CD133*, *c-Kit* e *Musashi-1* e os parâmetros clínicos demográficos.

A análise de correlação entre expressão dos genes foi avaliado pelo Coeficiente de Spearman. A associação entre o nível das proteínas e a expressão dos genes foi avaliada usando o teste de Mann-Whitney. Todos

os p-values foram baseados em análise estatística bi-caudal e $P > 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. As análises estatísticas foram realizadas usando o programa SPSS 17.0 (SPSS Inc, Chicago, IL).

5 RESULTADOS

5.1 SELEÇÃO DOS CASOS

Foram selecionados um total de 101 (cento e um) casos com diagnóstico confirmado de adenoma pleomórfico. Esses casos compreenderam tumores operados durante os anos de 1979 a 2008 no Hospital AC Camargo e com material disponível nos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica deste Hospital.

5.1.1 Dados clínico-demográficos:

Os casos de adenoma pleomórfico incluídos no estudo acometeram 62 mulheres e 39 homens de idades que variaram entre 9 e 84 anos de idade, com maior incidência durante as 3ª e 6ª décadas de vida (média de idade de 40,1). O tumor foi mais frequente na parótida, (72 casos), seguida da glândula submandibular (21 casos). Seis casos foram diagnosticados na cavidade oral (palato – 6 casos). A localização do adenoma pleomórfico não foi detalhada em 2 casos. O tamanho dos adenomas pleomórficos operados variou de tumores com até 4cm no maior eixo (69 casos) e tumores acima de 4cm no seu maior eixo (30 casos). As dimensões de 2 casos não foram especificadas.

Do total de casos, apenas 8 adenomas pleomórficos recidivaram (7,8% dos casos): estes casos acometeram mulheres, sendo 7 na parótida e 1 no palato. Apenas 2 destes tumores eram maiores que 4cm (Tabela 2).

Tabela 2 - Características Clínico-Demográficas dos pacientes portadores de adenoma pleomórfico.

Dados Clínico-Demográficos	Feminino (%)	Masculino (%)	Total (%)
	62 (61,4)	39 (38,6)	101 (100)
Idade			
1 ^a e 2 ^a década	3 (3,0)	2 (2,0)	5 (5,0)
3 ^a e 4 ^a década	22 (21,8)	16 (15,8)	38 (37,6)
5 ^a e 6 ^a década	20 (19,8)	15 (14,8)	35 (34,6)
Acima da 7 ^a década	17 (16,8)	6 (6,0)	23 (22,8)
Localização			
Parótida	48 (47,5)	24 (23,8)	72 (71,3)
Submandibular	9 (8,9)	12 (11,9)	21 (20,8)
Palato	4 (3,9)	2 (2,0)	6 (5,9)
Não informado	1 (1,0)	1 (1,0)	2 (2,0)
Tamanho			
Eixo menor que 4,0 cm	46 (45,5)	23 (22,8)	69 (68,3)
Eixo maior que 4,0 cm	16 (15,8)	14 (13,9)	30 (29,7)
Não informado	0 (0,0)	2 (2,0)	2 (2,0)
Recidiva			
Parótida	7 (87,5)	0 (0,0)	7 (87,5)
Submandibular	0 (0,0)	0 (0,0)	0 (0,0)
Palato	1 (12,5)	0 (0,0)	1 (12,5)
Total	8 (100)	0 (0,0)	8 (100)

5.2 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A análise histopatológica dos tumores revelou que morfologicamente os adenomas pleomórficos incluídos no estudo eram compostos por células mioepiteliais de fenótipos plasmocitóide, fusiforme, epitelióide e estrelária, bem como células epiteliais (ductais). Estas células mostravam-se arranjadas em formações arquiteturais diversas – lençol, ninhos e formações luminais, bem como células isoladas. Metaplasia escamosa, condróide, mixóide, hialina e calcificações foram observadas nos tumores analisados. Exemplos desses padrões estão ilustrados na Figura 2.

As fases do desenvolvimento das glândulas salivares estão ilustradas na Figura 3.

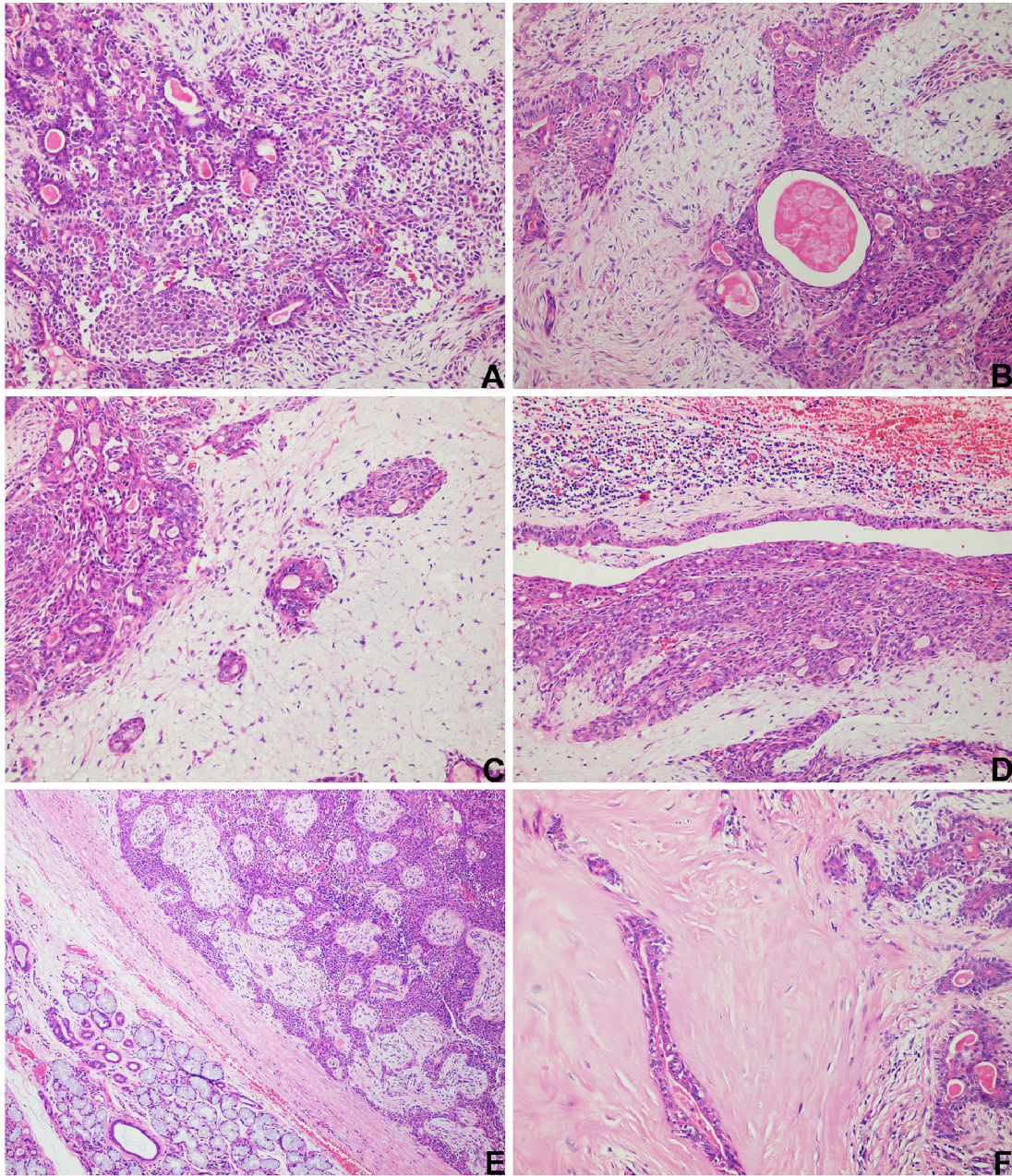


Figura 2

Figura 2 - Exemplos dos aspectos histopatológicos do adenoma pleomórfico

A e B: Células mioepiteliais e epiteliais arranjadas em lençol/ ductos neoplásicos. (H/E, aumento original X250)

C, D e E: Células epiteliais e mioepiteliais em arranjos compactos e ductais e estroma mixóide. Observar em D e E a relação do tumor com a periferia (cápsula). (H/E, aumento original X250)

F: Adenoma pleomórfico com estroma hialino. (H/E, aumento original X250)

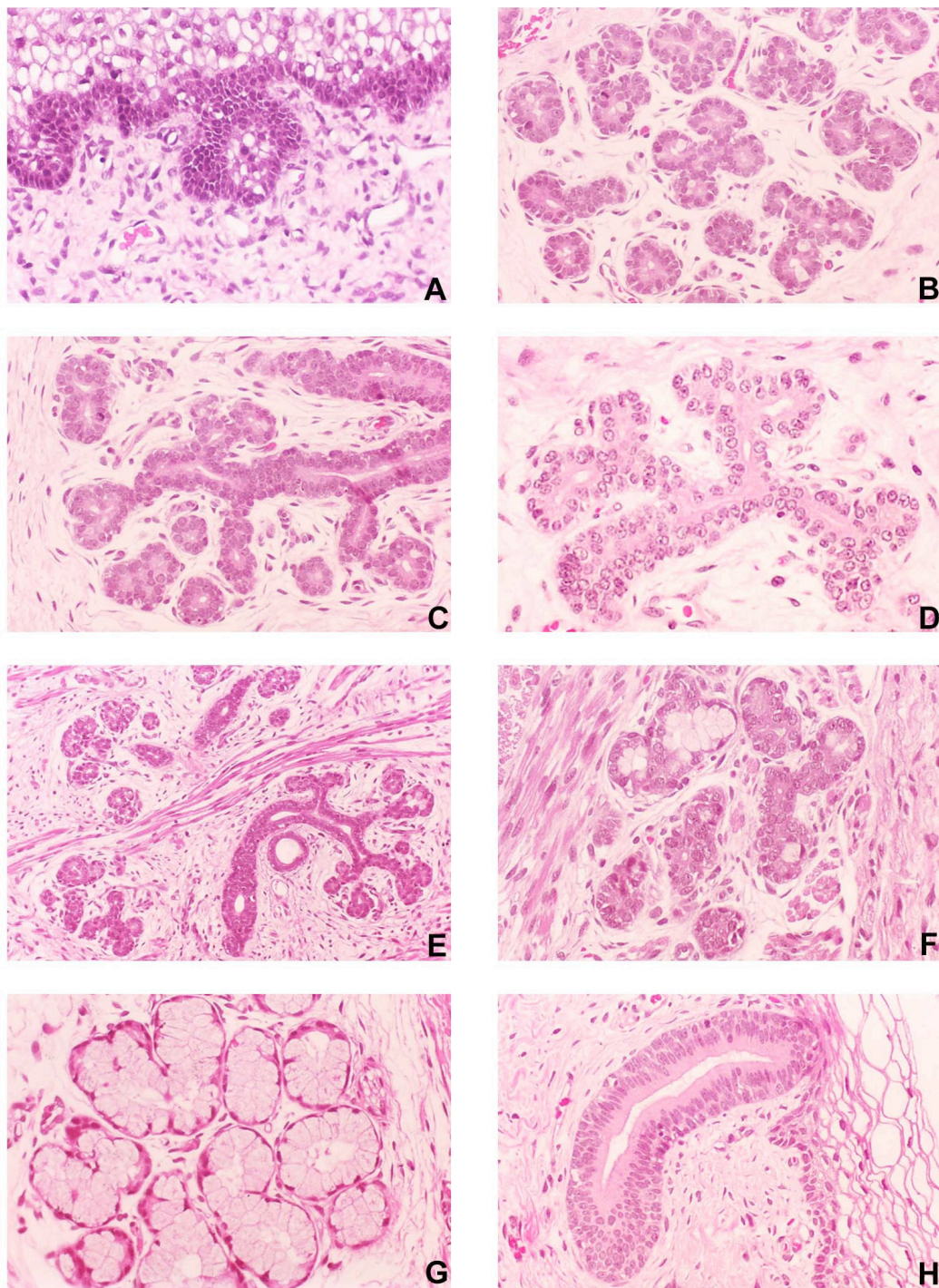


Figura 3

Figura 3 - As fases do desenvolvimento das glândulas salivares.

A: Fase de broto epitelial composto por células de aspecto basalóide e indiferenciado. (H/E, aumento original X400)

B: Cordões epiteliais ramificados e presença de algumas estruturas exibindo início de lúmen central. (H/E, aumento original X400)

C: Cordões epiteliais ramificados e canalizados (hematoxilina/eosina)

D: Ducto excretor canalizado e exibindo estratificação epitelial. (H/E, aumento original X400)

E: Início da citodiferenciação acinar com presença de sacos terminais rudimentares. (H/E, aumento original X250)

F: Glândula salivar mucosa: citodiferenciação acinar tardia com estruturas acinares morfologicamente diferenciadas, com células de citoplasma amplo e claro e aspecto piramidal. (H/E, aumento original X400)

G: Glândula salivar plenamente desenvolvida. (H/E, aumento original X400)

H: Ducto excretor de glândula salivar. (H/E, aumento original X400)

5.2.1 Imunoistoquímica

Foram realizadas pesquisas para os marcadores CD24, CD44, CD133, c-Kit e Musashi-1 nos 55 casos de adenoma pleomórfico selecionados. Os resultados dessa pesquisa, bem como exemplos do padrão de marcação de cada proteína estão ilustrados nas Figuras 4 a 7. Todos os casos revelaram padrões similares de expressão desses marcadores:

CD24:

No adenoma pleomórfico, observou-se positividade para o marcador em células neoplásicas epiteliais (luminais). Essa positividade mostrou padrão de marcação em membrana, contornando as células dos lúmens neoplásicos, principalmente a borda apical (luminal), onde havia indícios de secreção mucóide. Em outras áreas, raras células isoladas, de fenótipo epitelial mostraram forte positividade para o CD24. Estes aspectos estão ilustrados na Figura 4 A e C. Nos espécimes glandulares fetais, o marcador CD24 foi positivo na região de células luminais dos ductos excretores a partir da fase canalicular da morfogênese glandular. Na glândula salivar plenamente desenvolvida esse padrão de positividade foi mantido.

CD44:

Células mioepiteliais neoplásicas de fenótipo plasmocitóide e que estavam dispostas em cordões ou lençóis mostraram positividade para o CD44. Entretanto o marcador foi detectado nas células neoplásicas epiteliais

apenas em áreas focais. Figuras 4 B e D mostram exemplos dos padrões descritos acima. Nos espécimes de glândulas salivares fetais observou-se positividade do CD44 nas células mioepiteliais e luminais (pólo apical) nos espaços acinares e ductos intercalados. Nas glândulas salivares adultas o padrão descrito foi mantido.

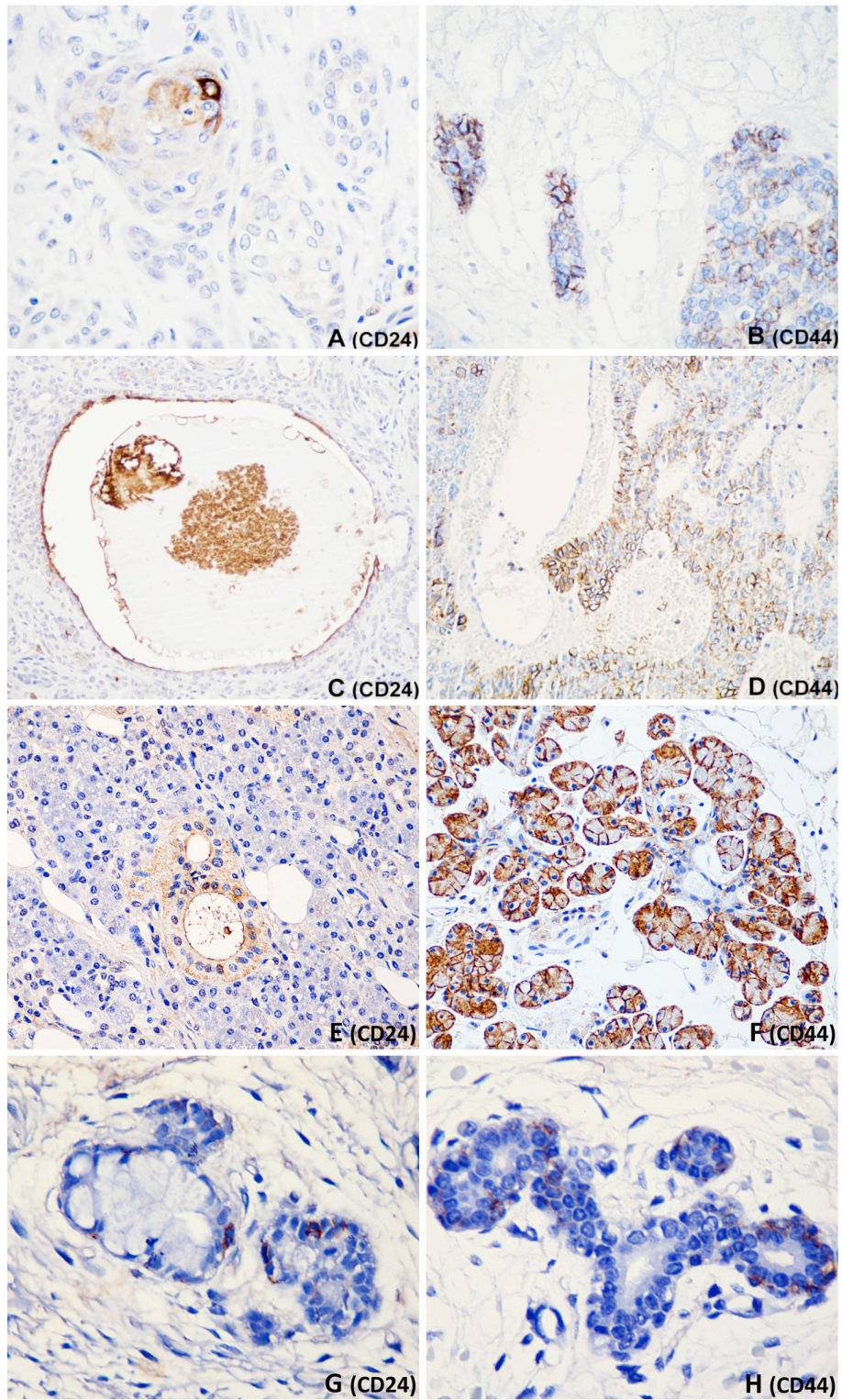


Figura 4

Figura 4 - Imunoexpressão dos marcadores CD24 e CD44 no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta

A: Célula epitelial isolada com positividade forte demarcando a membrana plasmática. (aumento original X400)

B: Cordões de células mioepiteliais neoplásicas e de morfologia plasmocitóide positivas para o marcador CD44. (aumento original X400)

C: Imunoexpressão do CD24 no pólo apical das células epiteliais (luminais) demarcando a borda do lúmen neoplásico e a secreção mucóide. (aumento original X250)

D: Expressão de CD44 na membrana de células mioepiteliais do tumor. (aumento original X250)

E: Presença do CD24 na membrana luminal dos ductos excretores extra-lobulares da glândula salivar adulta. (aumento original X250)

F: Expressão do CD44 na membrana de células acinares e mioepiteliais na glândula salivar adulta. (aumento original X250)

G: Fase de botão terminal da morfogênese glandular: presença do CD24 em células dos ductos intercalares rudimentares. (aumento original X400)

H: Presença do CD44 nas células mioepiteliais na fase canalicular da morfogênese glandular. (aumento original X400)

c-Kit

Células positivas para c-Kit foram identificadas em formações luminais pequenas de permeio aos lençóis de células mioepiteliais neoplásicas (Figuras 5 A). Em algumas regiões também observou-se células isoladas positivas para o marcador c-Kit (Figura 5 B-D). Nos espécimes de glândulas salivares fetais notou-se a positividade de c-Kit em células isoladas na porção intercalar/acinar e ductos a partir da fase canalicular da morfogênese glandular. Nas glândulas salivares plenamente desenvolvidas (adultas) a positividade para c-kit foi observada em células epiteliais componentes dos ductos intercalares.

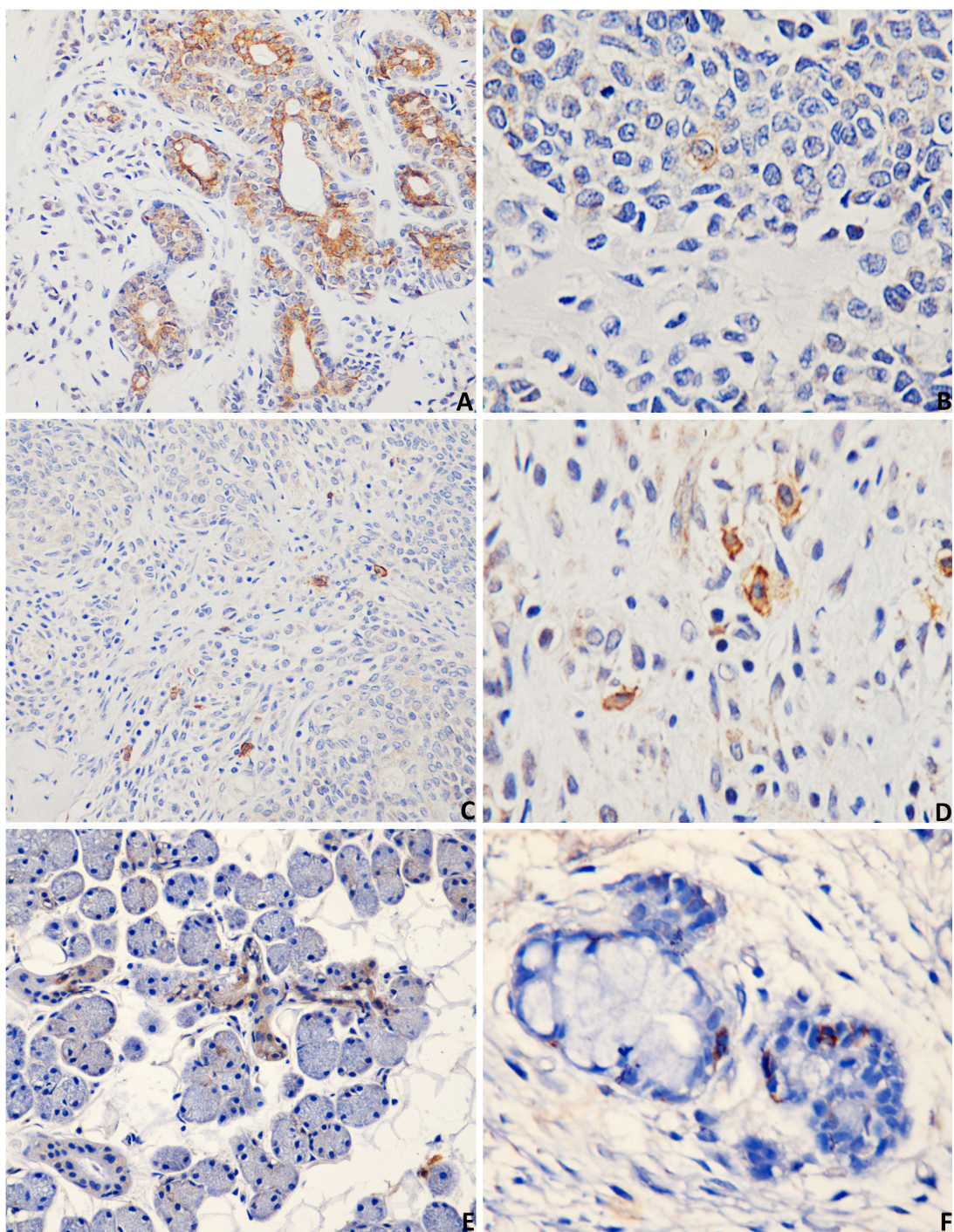


Figura 5

Figura 5 – Imunoexpressão dos marcadores c-Kit no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta

A: Formações luminais positivas para c-Kit, de permeio a lençol de células mioepiteliais neoplásicas. (aumento original X100; X250; X250, respectivamente)

B-D: Expressão da proteína c-kit em células isoladas no parênquima neoplásico e matriz mixóide. (aumento original X400; X100; X400, respectivamente).

E: Expressão do c-kit nas células luminais dos ductos intercalares na glândula salivar adulta (aumento original X250)

F: Expressão do c-kit nas células luminais dos ductos intercalares rudimentares na junção com lóbulos acinares na fase de botão terminal da morfogênese glandular. (aumento original X400)

CD133

Expressão para CD133 na membrana celular foi observada nas células luminais das formações ductais, assim como em células isoladas identificadas de permeio ao parênquima neoplásico celular e matriz com metaplasia condróide (Figura 6). Nas glândulas salivares de fetos humanos, células isoladas positivas para o marcador CD133 foram observadas nos ductos desde a fase canalicular inicial da morfogênese glandular. Nas glândulas salivares adultas a positividade para o marcador foi notada na membrana lateral de células luminais.

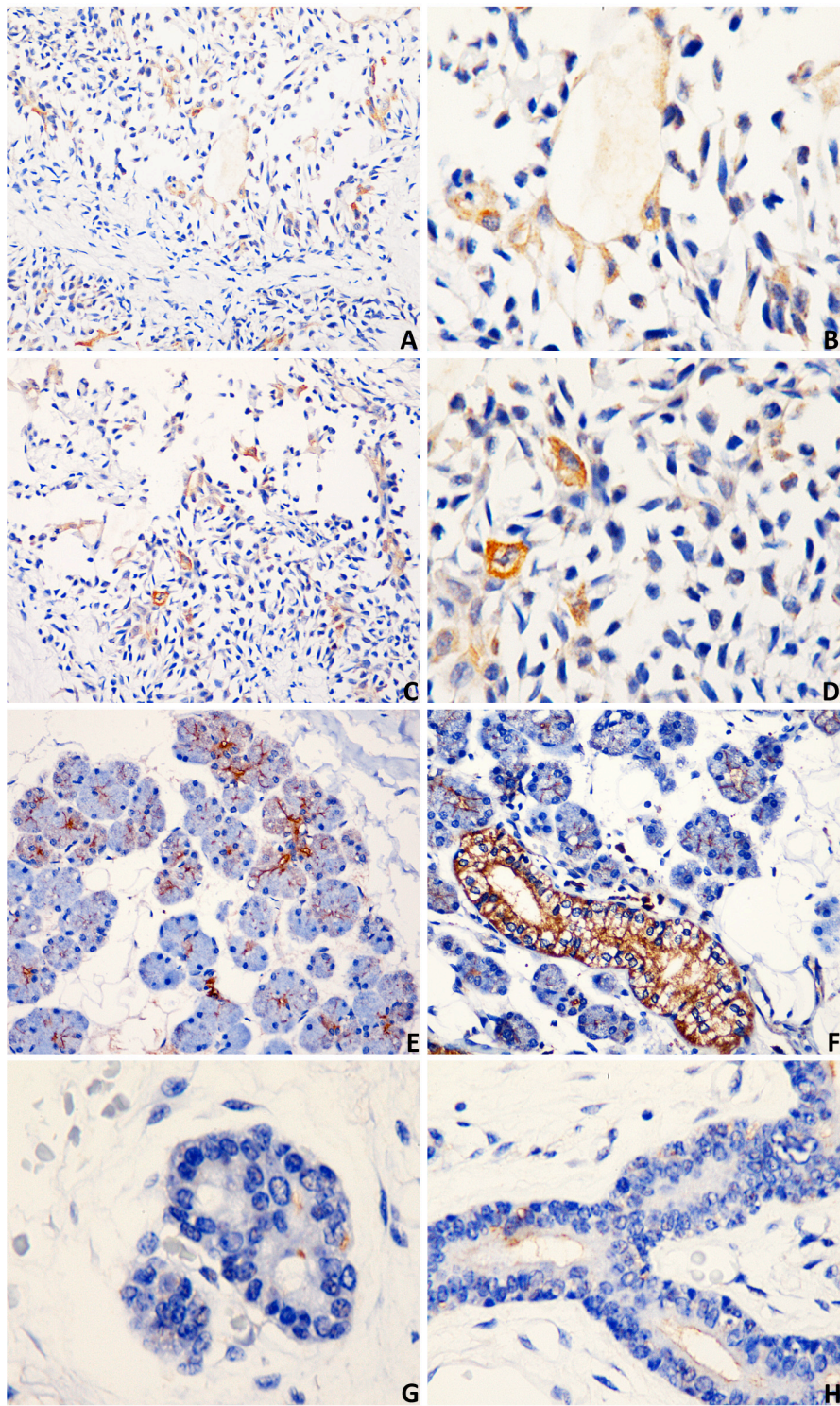


Figura 6

Figura 6 - Imunoexpressão dos marcadores CD133 no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta

A e B: Positividade de CD133 na membrana de células epiteliais luminais que permeiam lençóis celulares. (aumento original X100)

C e D: Detalhes de células positivas para CD133 nas formações luminais (aumento original X400)

E e F: Expressão em células isoladas de permeio a lençol celular e matriz condróide. (aumento original X100 e X400, respectivamente)

G e H: Presença de células isoladas positivas para o CD133 nos cordões epiteliais canalizados (fase canalicular da morfogênese da glândula salivar). (aumento original X400 e X400, respectivamente)

Musashi-1

A expressão da proteína Musashi-1 foi identificada na membrana de células mioepiteliais e em agrupamentos celulares e células isoladas na matriz condróide (Figura 7). Nas glândulas salivares de fetos humanos positividade para o marcador foi observada desde a fase canalicular nas áreas de junção intercalar/sacos terminais (futuros ácinos), além de células isoladas e células mioepiteliais. Nas glândulas salivares adultas a positividade para o marcador foi observada nas células componentes do ducto intercalar.

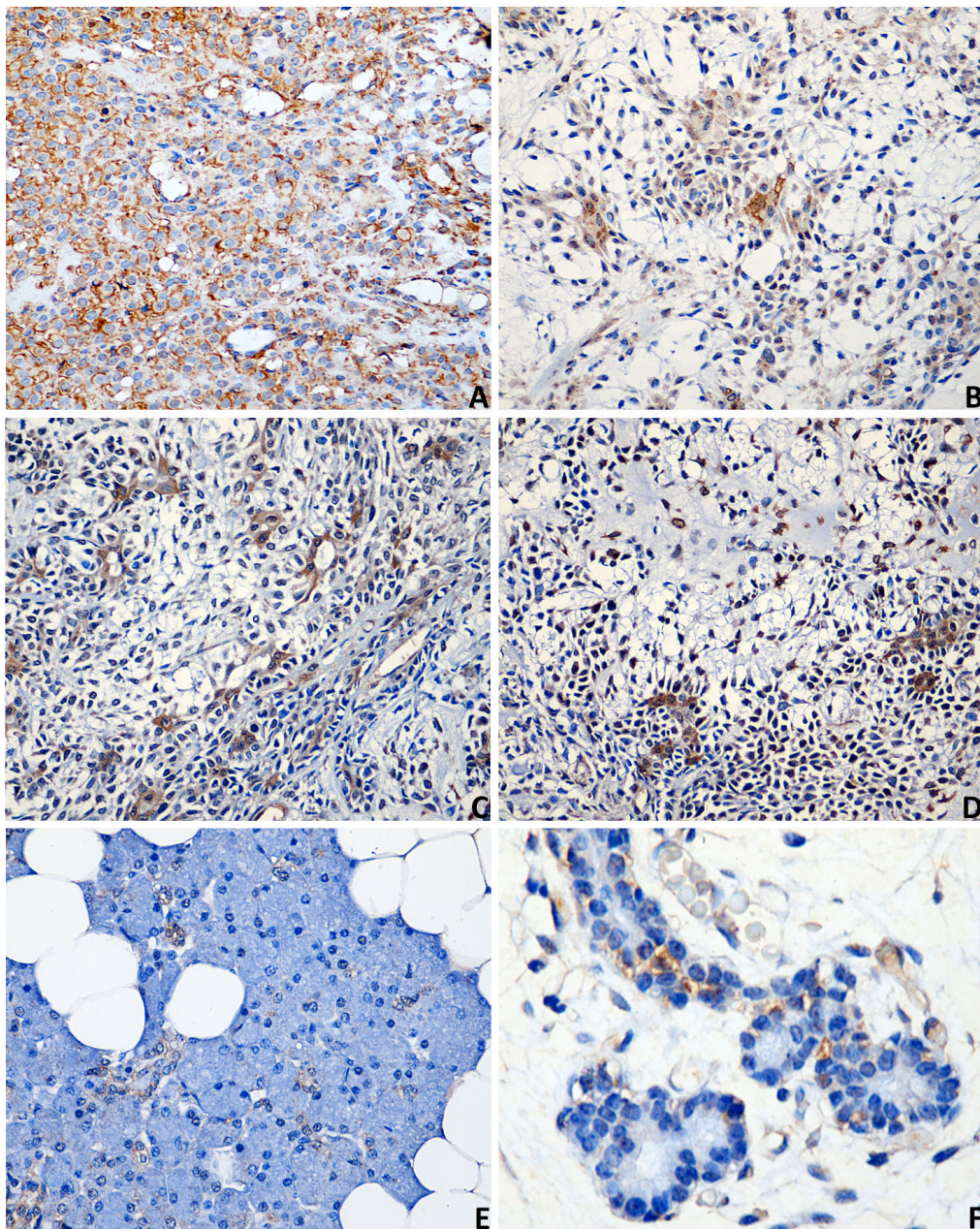


Figura 7

Figura 7 - Imunoexpressão dos marcadores Musashi- 1 no adenoma pleomórfico, na glândula salivar em desenvolvimento e na glândula salivar adulta

A e B: Musashi-1 positivo nas células mioepiteliais e nas formações luminais. (aumento original X250)

C e D: Expressão de Musashi-1 de permeio à matriz condróide (C) e mixóide (D). (aumento original X250 e X100, respectivamente)

E e F: Expressão de Musashi-1 nas células dos ductos intercalares na glândula salivar adulta (E) e na fase canalicular da morfogênese glandular. (aumento original X400 e X400, respectivamente)

5.2.2 Análise da expressão gênica por Real Time-PCR (qPCR)

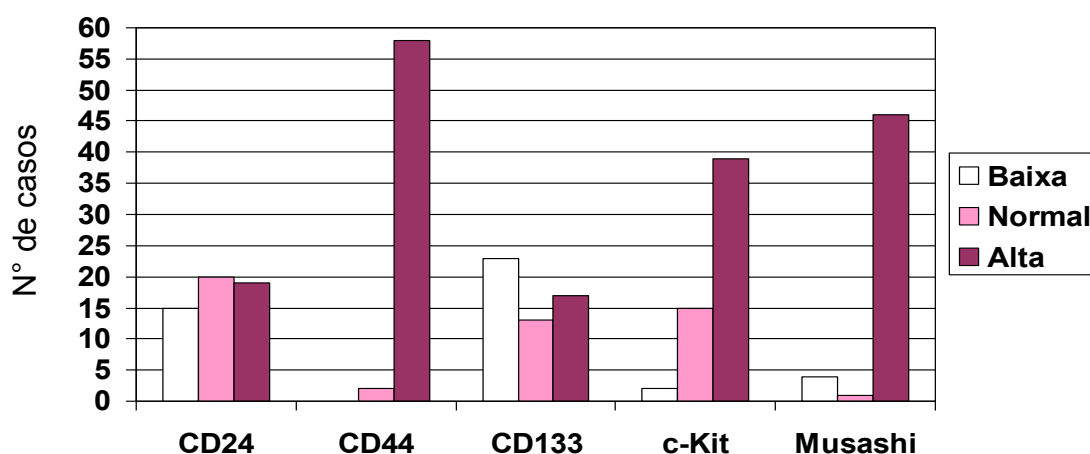
Os ensaios de RealTime-PCR (qPCR) permitiram a quantificação da expressão dos genes *CD24*, *CD44*, *CD133*, *Musashi-1* e *cKIT* em 60 casos e em 5 amostras de glândula salivar normal (agrupados em um *pool*).

Para determinarmos o padrão de expressão dos genes estabelecemos um cut-off de 2 vezes em relação à expressão destes transcritos no tecido normal ($\geq 2,0$ para o aumento de expressão e $\leq 0,5$ para a diminuição da expressão e o intervalo de 0,5 a 2,0 para a expressão normal). A expressão relativa foi medida por qPCR, normalizada pelos genes (18S e $\beta 2$ -microglobulina).

Os resultados das análises são mostrados nas Figuras 9 a 13.

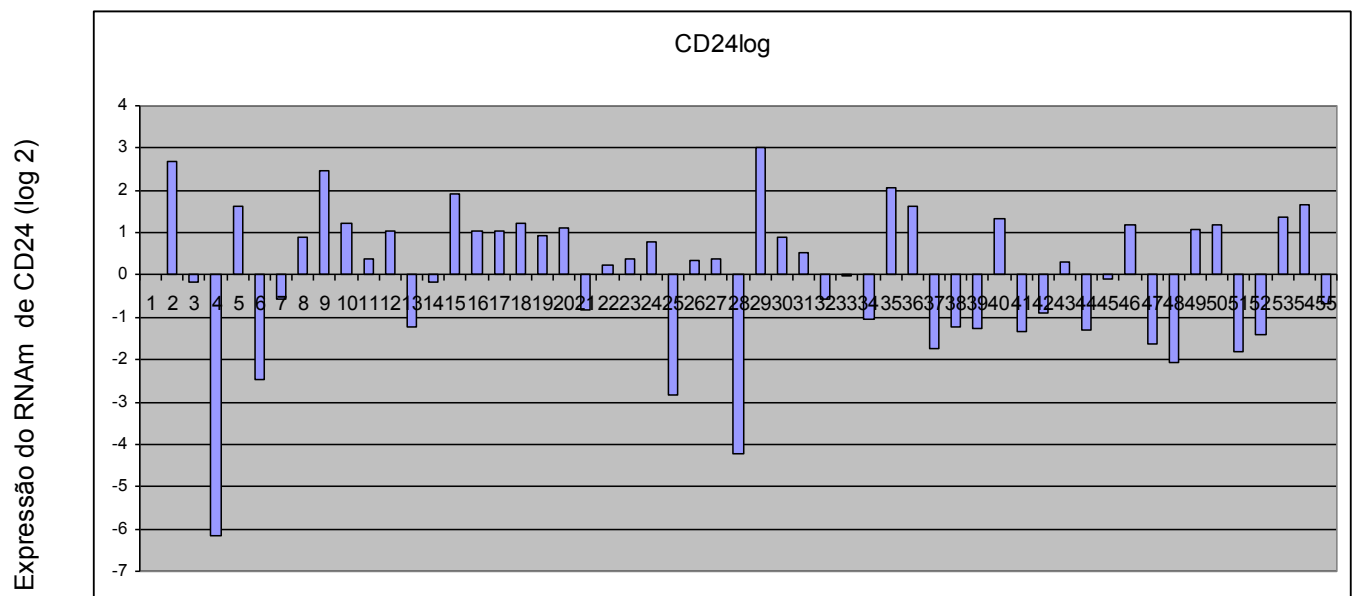
Tabela 3 e Figura 8 - Perfil de expressão dos genes em adenoma pleomórfico por qPCR.

Genes:	Total	Baixa expressão (%)	Expressão Normal (%)	Alta expressão (%)
CD24	54	15 (27,8)	20 (37,0)	19 (35,2)
CD44	60	00	02 (3,3)	58 (96,7)
CD133	53	23 (43,4)	13 (24,5)	17 (32,1)
c-Kit	56	02 (3,6)	15 (26,8)	39 (37,5)
Musashi-1	51	04 (7,8)	01 (2,0)	46 (90,2)



CD24

Foi observada diminuição da expressão do gene CD24 em 15 (27,8%) das 54 amostras avaliadas; a expressão normal foi observada em 20 casos (37,0%) e o aumento da expressão foi encontrada em 19 casos (35,2%) (Figura 9).



Adenoma Pleomórfico

Figura 9 - Análise da expressão do RNAm de CD24 em adenoma pleomórfico. O aumento e diminuição da expressão foi considerada quando teve duas vezes diferença de expressão em relação ao tecido normal. Intervalos entre -1 e +1 considerou-se expressão normal, menor que -1 considerou-se baixa expressão e maior que +1 alta expressão. Amostra 1 é o pool de tecido normal.

CD44

Das amostras analisadas, não foi encontrado nenhum caso com expressão diminuída do gene CD44 em 60 amostras. Já a expressão normal foi observada em 2 amostras (3,3%) e o aumento da expressão em 58 amostras (96,7%), como demonstrado na Figura 10.

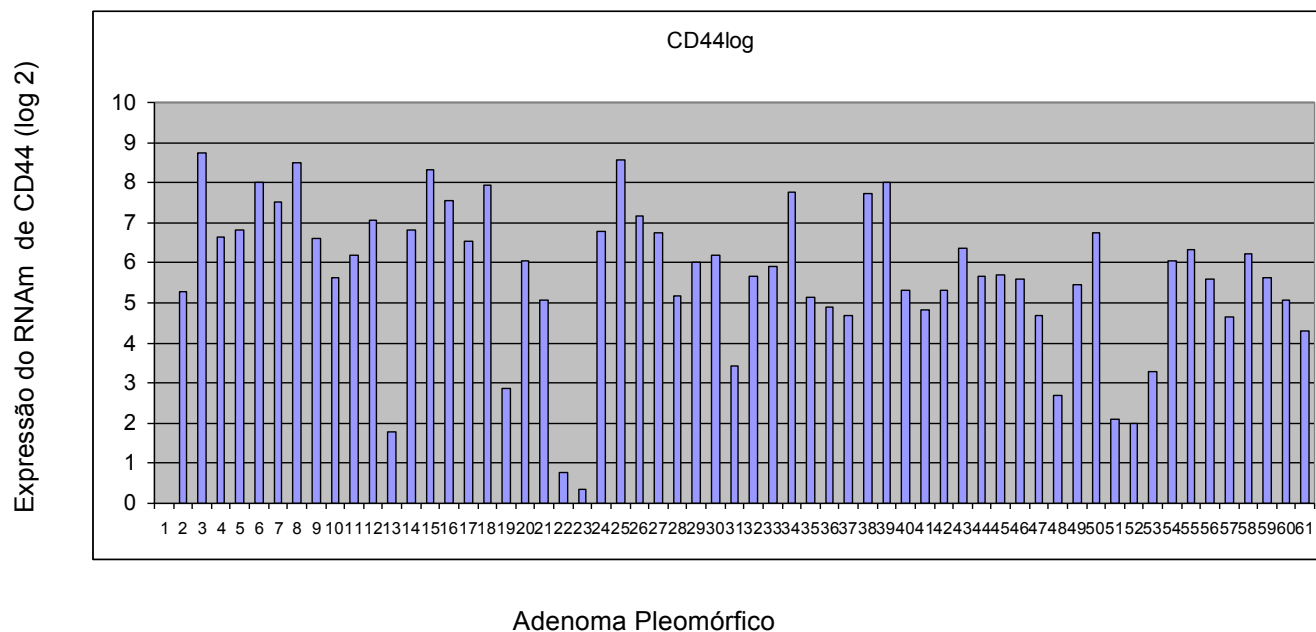


Figura 10 - Análise da expressão do RNAm de CD44 em adenoma pleomórfico. O aumento e diminuição da expressão foi considerada quando teve duas vezes diferença de expressão em relação ao tecido normal. Intervalos entre -1 e +1 considerou-se expressão normal, menor que -1 considerou-se baixa expressão e maior que 1 alta expressão. Amostra 1 é o pool de tecido normal.

CD133

Das 53 amostras analisadas, foi observado a baixa expressão em 23 amostras (43,4%), a expressão normal em 13 amostras (24,5%) e a alta expressão em 17 amostras (32,1%) do gene CD133 (Figura 11)

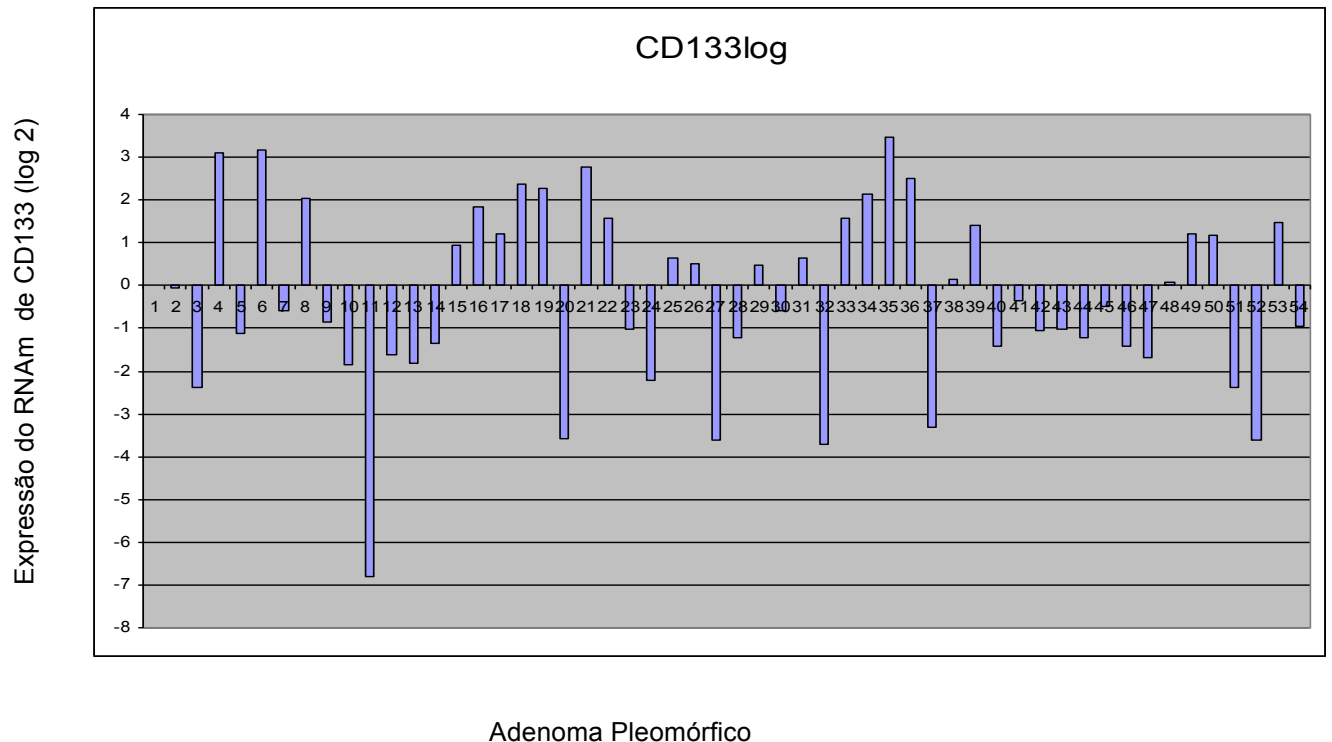


Figura 11 - Análise da expressão do RNAm de CD133 em adenoma pleomórfico. O aumento e diminuição da expressão foi considerada quando teve duas vezes diferença de expressão em relação ao tecido normal. Intervalos entre -1 e +1 considerou-se expressão normal, menor que -1 considerou-se baixa expressão e maior que 1 alta expressão. Amostra 1 é o pool de tecido normal.

c-Kit

Foi observada a diminuição da expressão do c-Kit em 2 (3,6%) das 56 amostras avaliadas, a expressão normal foi observada em 15 amostras (26,8%) e o aumento da expressão foi observada em 39 amostras (37,5%) (Figura 12).

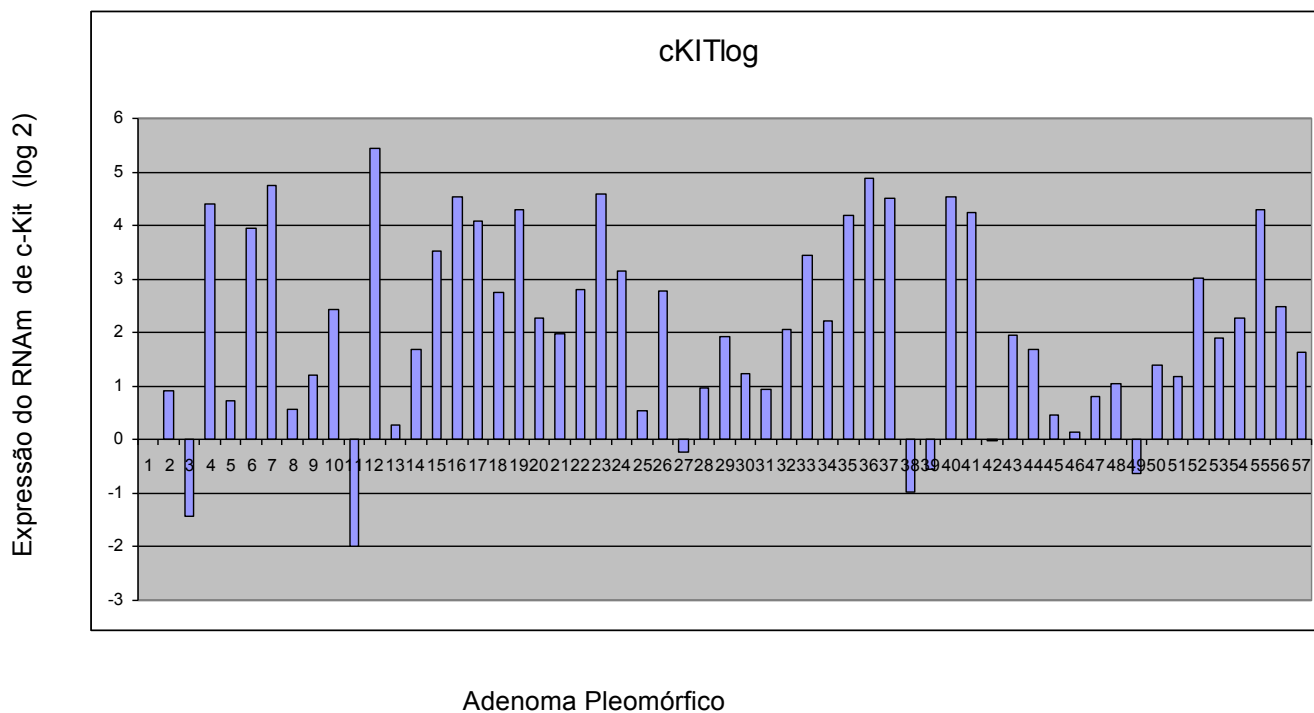


Figura 12 - Análise da expressão do RNAm de c-Kit em adenoma pleomórfico. O aumento e diminuição da expressão foi considerada quando teve duas vezes diferença de expressão em relação ao tecido normal. Intervalos entre -1 e +1 considerou-se expressão normal, menor que -1 considerou-se baixa expressão e maior que 1 alta expressão. Amostra 1 é o pool de tecido normal.

Musashi-1

Diminuição da expressão do gene Musashi-1 foi observado em 4 (7,8%) das 51 amostras analisadas. A expressão normal foi visualizada em 1 amostra (2,0%) e a alta expressão em 51 amostras (90,2%) como demonstrado na Figura 13.

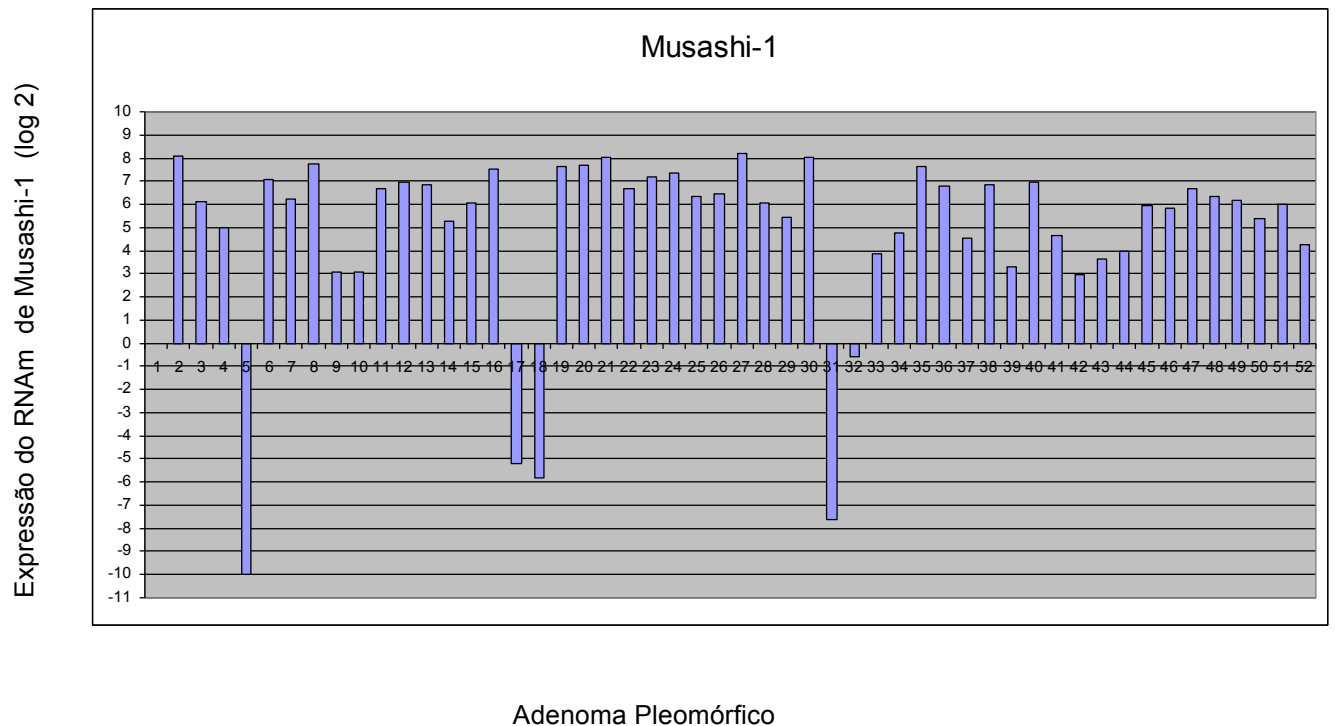


Figura 13 - Análise da expressão do RNAm de c-Kit em adenoma pleomórfico. O aumento e diminuição da expressão foi considerada quando teve duas vezes diferença de expressão em relação ao tecido normal. Intervalos entre -1 e +1 considerou-se expressão normal, menor que -1 considerou-se baixa expressão e maior que 1 alta expressão. Amostra 1 é o pool de tecido normal.

5.2.3 Análise de associação dos genes com as variáveis clínico-demográficas

A análise de associação foi realizada com os valores numéricos usando o teste estatístico de Mann Whitney. Foi observada associação entre o tamanho do tumor e a expressão dos genes CD133 ($P=0,018$) e c-Kit ($P=0,025$). Tumores com até 4cm no maior eixo, apresentaram maior expressão de ambos os genes do que os tumores cima de 4 cm. Os demais genes e parâmetros avaliados não apresentaram associações estatisticamente significativas (Tabela 4).

Tabela 4 - Análise de associação dos genes com as variáveis clínico-demográficas.

Parâmetros Clínico-Patológicos	Total	CD24			CD44			CD133			c-Kit			Musashi		
		Média	SD	P value	Média	SD	P value	Mean	SD	P value	Mean	SD	P Value	Mean	SD	P Value
Gênero																
Feminino	39	1,93	0,41	0,507	82,66	22,7	0,090	1,44	0,34	0,427	5,59	1,36	0,135	79,91	15,8	0,784
Masculino	22	1,37	0,36		58,19	13,74		1,12	1,12		4,47	1,49		77,69	19,81	
Idade																
≤ 50 anos	42	1,59	0,28	0,557	55,42	8,87	0,155	1,36	0,26	0,846	4,76	1,09	0,076	86,6	15,20	0,968
> 50 anos	19	2,05	0,78		126,61	51,52		1,16	0,59		6,63	2,38		55,35	14,73	
Tamanho do tumor																
0	44	1,57	0,24	0,975	60,23	14,44	0,494	1,66	0,33	0,018	6,10	1,36	0.025	83,67	15,21	,353
1	15	1,97	0,74		98,81	33,47		0,59	0,13		3,36	1,11		69,31	20,95	
Recidiva																
Não	58	1,69	0,29	0,271	75,37	15,35	0,209	1,29	0,25	0,671	5,26	1,05	0,507	81,15	12,78	0,385
Sim	03	1,87	1,24		26,71	7,18		1,65	1,14		4,34	1,23		41,55	22,23	

5.2.4 Análise de correlação entre os genes

A análise de correlação entre a expressão dos genes estudados pode ser observada na Tabela 5. Foi mostrada correlação positiva entre os genes CD24 e CD133 ($\rho=0,305$; $P=0,035$); CD24 e c-Kit ($\rho=0,344$; $P=0,014$); CD44 e Musashi-1 ($\rho=0,443$; $P=0,001$) e CD133 e c-Kit ($\rho=0,506$; $P<0,001$).

5.2.5 Análise de associação entre os genes e as proteínas estudadas

Entre as amostras estudadas foi possível analisar em apenas 14 casos a expressão das proteínas e dos genes. Devido ao baixo número de casos não foi possível realizar análise de associação em todos os marcadores.

Tabela 5 - Análise de correlação entre a expressão dos genes CD24, CD44, CD49f, CD133, c-Kit e Musashi-1 em adenoma pleomórfico, por Real Time – PCR

		CD24	CD44	CD133	c-Kit	Musashi-1
CD24	Coeficiente de correlação					
	P value					
CD44	Coeficiente de correlação	0,016				
	P value	0,912				
CD133	Coeficiente de correlação	0,305	0,023			
	P value	0,035	0,873			
c-Kit	Coeficiente de correlação	0,344	0,103	0,506		
	P value	0,014	0,455	0,000		
Musashi-1	Coeficiente de correlação	-0,033	0,443	0,065	0,172	
	P value	0,829	0,001	0,667	0,247	

5.2.6 Análise de associação entre proteínas e as variáveis clínico-demográficas

Foi realizado também o teste de qui-quadrado entre a relação protéica dos marcadores CD24, CD44, CD133, c-kit e Musashi-1 e as variáveis clínico-demográficas e não houve nenhuma associação estatisticamente significativa.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho mostrou uma análise dos aspectos relacionados com a morfologia, arquitetura e relação de células que compartilham marcadores que identificam células-tronco no adenoma pleomórfico das glândulas salivares. Essa neoplasia foi considerada como um modelo interessante para o estudo desses aspectos, uma vez que se origina de um compartimento considerado o progenitor e regenerativo dessas glândulas, além de exibir uma interessante variedade arquitetural (áreas mixóides, condróides, metaplasia escamosa, óssea e adiposa).

A casuística utilizada em nossa pesquisa mostrou características similares a estudos relatados em outros estudos publicados na literatura científica (ELLIS e AUCLAIR 1995; MOONIS et al. 2007; EMODI et al. 2010). A maioria dos casos ocorreu em mulheres e a localização mais comum da neoplasia foi a glândula parótida. Os nossos casos acometeram doentes principalmente entre a 3ª e 6ª décadas de vida, um período mais extenso que o relatado por outros autores (ELLIS e AUCLAIR 1995; WAL et al. 1998, ITO et al. 2009; LINGAM et al. 2011). A incidência de recorrências do tumor foi de 7,9% dos casos estudados. Outros autores mostram que o adenoma pleomórfico é uma neoplasia com significativo índice de recidivas, relatando uma porcentagem entre 20% e 45% (DONOVAN e CONLEY 1884; LEVERSTEIN et al. 1997; MOONIS et al. 2007). Essa diferença pode ser devida a protocolos de tratamento utilizados no Hospital A.C.Camargo.

Do ponto de vista histopatológico, os tumores analisados também seguiram o padrão já bem descrito na literatura, com células epiteliais e mioepiteliais sem atipia e intenso pleomorfismo arquitetural (ELLIS e AUCLAIR 1995; ITO et al. 2009). Vale aqui ressaltar que os adenomas pleomórficos originários de glândulas salivares intra-orais apresentaram um padrão intensamente celular (sólido), quando comparado aos tumores diagnosticados na parótida e glândula submandibular.

A análise imunoistoquímica de fatores protéicos identificadores de células-tronco mostrou que todos os marcadores pesquisados foram positivos nos tumores incluídos no estudo. Padrões específicos de positividade foram observados para cada marcador. Estudos também mostram que os diversos marcadores de células-tronco podem estar presentes de forma concomitante em diversos tecidos e órgãos. Assim, muitas vezes, esses marcadores são analisados em conjunto para uma compreensão ampla de seus padrões de expressão. Nosso estudo foi baseado na pesquisa de marcadores de células-tronco em material fixado embebido em parafina. Essa técnica, embora não ideal para a pesquisa de células-tronco tem sido de grande valia para a compreensão da presença de células positivas para os marcadores deste tipo celular. A identificação de células positivas para os marcadores de células-tronco em tecido fixado e embebido em parafina, entretanto não permite afirmação categórica sobre a natureza das células positivas, pois muitos tipos celulares parecem compartilhar características e expressão de algumas proteínas com outros tipos celulares. Outros pesquisadores também utilizaram essa abordagem

laboratorial para a investigação de células-tronco em neoplasias derivadas de outros órgãos e os seus resultados, são superponíveis aos encontrados no nosso estudo, considerando as peculiaridades de cada órgão estudado (FRANCHI et al. 2001; POTTEN et al. 2003; KARBANOVÁ et al. 2008; LU et al. 2008; ROTTER et al. 2008; HAN et al. 2009; OLIVEIRA et al. 2010;). Um bom exemplo dessa abordagem laboratorial foi o trabalho desenvolvido por MOREIRA e colaboradores (2010) que mostrou padrões diferentes para os marcadores de células-tronco em diversos tipos histológicos de neoplasias do pulmão. Nosso estudo também avaliou a expressão quantitativa dos genes *CD24*, *CD44*, *c-Kit*, *CD133* e *Musashi* por meio da técnica de RT-PCR em tempo real (qPCR) para angariar informações adicionais às da imunohistoquímica. Futuramente nosso grupo ainda planeja ensaios *in vitro* para poder compreender melhor a expressão dos marcadores estudados e sua relação com as células componentes do adenoma pleomórfico.

A hipótese de que a origem e composição do adenoma pleomórfico das glândulas salivares envolva a participação de células-tronco tem adeptos na literatura (BATSAKIS et al. 1989; BATSAKIS e EL-NAGGAR 1999; DEBIEC-RYCHTER et al, 2001; MARTINS et al, 2005) e para tentarmos estabelecer uma relação com a morfogênese glandular e os compartimentos regenerativos dessas glândulas, a nossa pesquisa também utilizou espécimes de glândulas salivares fetais.

As glândulas salivares iniciam seu desenvolvimento a partir de botões epiteliais que se originam do epitélio bucal na vida fetal precoce (HAND 1980). Semelhante a outros órgãos, a formação da glândula salivar envolve

a coordenação dos mecanismos morfogenéticos, incluindo alterações na regulação de formas celulares e expressão gênica, e migração celular, levando a uma glândula totalmente desenvolvida com importantes funções secretoras. Como resultado do processo de desenvolvimento, as glândulas salivares tomam a forma de estrutura composta túbulo-acinar, indicando a presença de um sistema ductal ramificado e unidades secretoras com porção tubular e acinar. As principais células encontradas são as ductais/luminais e mioepiteliais. A morfologia das células mioepiteliais pode variar desde a multipolar e estrelado e seu papel inclui a contração quando a função secretora da glândula é estimulada, comprimindo e reforçar as células do parênquima glandular e auxiliando a expulsão da saliva. Sua origem ainda não está totalmente elucidada, mas acredita-se que provém de células-tronco (IANEZ et al. 2010). No sentido de investigar o possível compartimento regenerativo das glândulas salivares – células-tronco e seu nicho, nosso grupo vem desenvolvendo trabalhos para pesquisar marcadores que comprovem esses indícios, mostrando que, integrinas, por exemplo têm um papel na identificação dos nichos de células-tronco no segmento ductal dessas glândulas durante as diferentes fases da morfogênese (LOURENÇO et al. 2007; LOURENÇO e LIMA 2007).

KISHI e colaboradores (2006) através de ensaios de colônia, demonstraram a presença de proliferação de células-tronco/progenitoras multipotentes em células ductais neonatais e adultas de ratos, confirmando que as células acinares ductais, células epiteliais e células mioepiteliais diferenciam-se a partir de uma colônia clonal.

Os antígenos CD24 e CD44 são exemplos de marcadores de células-tronco cuja expressão é analisada em conjunto em muitos tecidos: o antígeno CD24 é uma glicoproteína expressa em células hematopoiéticas, incluindo células B, células T e granulócitos e células não-hematopoiéticas como células do tecido nervoso, células ganglionares e as células da medula adrenal. O CD44 é uma glicoproteína que se liga com alta afinidade a glicosaminoglicanas hialurônicas encontradas na matriz extracelular, e está envolvida na interação célula-célula, adesão celular e migração (ARRUFO et al. 1990; SACKSTEIN et al. 2008). FRANCHI et al. (2001), realizaram um estudo comparando as isoformas de CD44 e observaram que esta proteína é amplamente distribuída nos tecidos salivares fetais e normais. O CD44 mostrou intensa marcação na membrana da célula basal e lateral dos ductos pequenos, enquanto os ductos maiores se mostraram negativos. Nas glândulas normais, houve predominância da expressão do CD44 nas estruturas acinares e uma expressão mais fraca nos ductos. Contudo, a expressão de CD44 tem sido considerada importante na regulação da morfogênese do embrião do rato, e tratamentos com anticorpos (neutralizando) anti-CD44 são capazes de inibir o crescimento ductal induzido por andrógeno na glândula prostática (GAKUNGA et al. 1997), indicando que as interações entre o receptor CD44 e seus ligantes são essenciais para o desenvolvimento inicial das estruturas glandulares (FRANCHI et al. 2001). Segundo este mesmo grupo, a expressão é semelhante em fetos e glândulas salivares adultas, embora haja um predomínio de expressão de CD44 nos ramos mais distais das glândulas em

desenvolvimento, o que provavelmente, está relacionado com a ativação das fases do crescimento. Na nossa pesquisa, o marcador foi principalmente detectado nas células mioepiteliais, cuja origem é atribuída ao seguimento intercalar/acinar das glândulas salivares.

AKASHI et al. (1994) e LAZZERI et al. (2007) em estudos de sistema nervoso central e néfron, respectivamente, concluíram que os marcadores CD24 e CD133 identificam um subgrupo de células progenitoras multipotentes que persistem desde o estágio inicial do desenvolvimento. Em glândulas salivares embrionárias ainda não há estudos relatando a função da proteína CD24, e nosso trabalho fornece importantes informações que revelam que nas glândulas salivares em desenvolvimento, o CD24 é fortemente expresso nas células que permeiam a região luminal das células ductais, onde há indícios de secreção mucóide.

Nos casos estudados, esses antígenos apresentaram positividade com relação complementar: o CD24 foi detectado amplamente em células luminas e o CD44 em células mioepiteliais. Ainda, nos casos onde havia amostra de parênquima salivar normal (não-neoplásico), esses marcadores apresentaram positividade nas regiões luminal (CD24) e mioepitelial (CD44). AKASHI et al. (1994), investigaram a expressão de CD24 por hibridação *in situ* em glândulas salivares e observaram sua positividade na estrutura ductal e acinar dessas glândulas, corroborando nossos achados. FONSECA et al. (2000), identificaram o CD44 no mioepitélio das glândulas salivares normais, sugerindo que essa molécula possa estar envolvida na regulação do crescimento e renovação do tecido normal e, potencialmente, na

morfogênese das neoplasias de glândula salivar. Ainda, o marcador CD44 tem sido apontado por vários autores como importante na identificação e separação (pela técnica de citometria de fluxo) de células que expressam os vários marcadores de células-tronco (LEUNG et al. 2010). Essas células (CD44 positivas e que também são positivas para outros marcadores de células-tronco) são consideradas como subpopulações celulares em uma neoplasia, que conferem ao tumor a capacidade de renovação do tecido neoplásico e propagação tumoral.

A análise da expressão do CD24 e CD44 em alguns casos mostrou que ambos estavam presentes em células epiteliais e mioepiteliais em áreas focais. XING et al. (1998), também observaram através de um estudo imunoistoquímico que o CD44 apresentou positividade em ambos os componentes mesenquimal e epitelial do tumor. Esse fato pode denotar a imaturidade fenotípica das células desse tumor que é derivado de uma região da glândula salivar que tem capacidade de gerar células epiteliais e mioepiteliais (compartimento intercalar-acinar, tido como região que abriga as células de reserva das glândulas salivares). Nos ensaios de qPCR, nosso estudo mostrou que o marcador CD24, apesar de expresso, não apresentou um padrão específico de expressão, enquanto que o CD44 apresentou-se superexpresso em relação ao tecido normal. A expressão do CD44 em neoplasias de outros órgãos como mama e pulmão tem sido relacionada a presença de células-tronco tumorais (LEUNG et al. 2010; HOPE et al. 2004). Nos casos de nosso estudo, a ampla expressão pode indicar que esses antígenos não sejam específicos apenas para células-tronco, mas que

células com outras características biológicas também possam expressá-los. Nessa mesma linha de estudo, LIN et al (2010), descreveram por meio da técnica de qPCR, um aumento da expressão de células CD44 no sangue periférico de doentes com casos avançados de carcinomas da cabeça e pescoço. Nos casos o aumento da expressão do CD44 não se relacionou com fatores como recidiva, por exemplo, mas futuramente, pode ser que o estudo desse fator em neoplasias de glândulas salivares possa indicar o curso de evolução dos casos.

Vários marcadores de células-tronco em tecidos normais têm hoje sido utilizados para identificar células-tronco em neoplasias e o CD133 é um dos exemplos mais clássicos desses marcadores (LEUNG et al. 2010). O CD133 (Prominin-1) é uma glicoproteína transmembrânica, expressa em células-tronco hematopoiéticas, células-tronco epiteliais e células-tronco tumorais. Em tumores do sistema nervoso, de próstata, pâncreas, pele, cólon também têm sido encontradas células CD133 positivas com propriedades de células-tronco. Pouco se sabe sobre a função de CD133, mas relatos recentes demonstram que sua expressão pode ser dependente do ciclo celular e da proliferação (YIN et al. 1997; SINGH et al. 2004; COLLINS et al. 2005). Estudo realizado por KARBANOVÁ et al (2008), mostra a presença do CD133 no epitélio de desenvolvimento das três camadas germinativas dos camundongos, e essa expressão persistiu em vários epitélios adultos como por exemplo, túbulos renais proximais, ductos de glândulas salivares e lacrimais. Nos espécimes de glândulas salivares fetais, a proteína CD133 foi detectada na membrana de células

luminais/ductais focais e mioepiteliais focais desde a fase de pré-botão. Nas glândulas salivares normais plenamente desenvolvidas, a positividade se manteve nas mesmas estruturas, confirmando os achados de KARBANOVA et al (2008) em camundongos. Ainda, segundo MISSOL-KOLKA et al. (2011), Prominin-1 ou CD133 foi detectada no domínio apical das células epiteliais dos ductos do parênquima glandular prostático em ratos. Já em humanos apenas algumas células luminais expressam o marcador, demonstrando, contudo, que sua expressão não está associada exclusivamente com células-tronco basal. Em ductos pancreáticos humanos também foi constatada uma elevada expressão de CD133 nas células ductais (LARDON et al. 2008).

Em amostras patológicas, observou-se que esse antígeno é menos expresso em neoplasias e tem expressão aumentada em regiões inflamatórias. Esse estudo, difere de estudos realizados *in vitro*, onde células positivas para CD44 e CD133 possuíram uma significativa capacidade de auto-renovação, diferenciação e invasão *in vitro*, sendo então, identificadas como células-tronco (COLLINS et al. 2005; REGENBRECHT et al. 2008). Estudo realizado por KARBANOVA et al. (2008), mostra que em glândula salivar, o CD133 é positivo na porção apical da membrana das células acinares e nos ductos intercalares. Estes achados corroboram os observados em nosso trabalho que mostrou significativa positividade do CD133 na membrana celular de lúmens e formações ductais das glândulas salivares mucosas e serosas. Entretanto notamos que houve também positividade focal nas células mioepiteliais das glândulas salivares normais.

No adenoma pleomórfico, os padrões de expressão dessas proteínas seguiram o mesmo padrão observado nas glândulas salivares normais, com positividade difusa em células ductais e apenas positividade focal nas células mioepiteliais modificadas. Esse padrão demonstra de forma elegante que as estruturas neoplásicas do adenoma pleomórfico têm, pelo menos em parte, aspectos similares aos do seu tecido de origem. Considerando-se esses padrões é precoce afirmar, baseados em nossos resultados, que as células positivas para a proteína CD133 possam dividir, ainda que parcialmente, características comuns a células-tronco/multipotentes da glândula salivar. Essa informação aliada aos resultados obtidos com a expressão do CD44 podem apontar um potencial de células-tronco nas células neoplásicas analisadas, mas este indício deve ser ainda confirmado por ensaios *in vitro* e com a utilização da separação celular por citometria de fluxo, como proposta de LEUNG et al. (2010). Os resultados da análise de qPCR dos nossos casos mostraram que apesar de expresso, o CD133 apresentou um maior número de amostras de adenoma pleomórfico com baixa expressão quando comparado ao tecido glandular normal.

Musashi-1 (Msi-1), é uma família de proteínas ligantes de RNA que funcionam como reguladores essenciais do funcionamento de células progenitoras em organismos em desenvolvimento e adultos (NICKERSON et al. 2011). Além disso, a família Musashi é importante para a manutenção do papel da diferenciação de células-tronco e tumorigênese (KANEMURA et al. 2002). NICKERSON et al. (2011) em estudo de desenvolvimento da retina em camundongos, relataram que os genes musashi, funcionam como

reguladores essenciais do funcionamento de células progenitoras em ambos os organismos em desenvolvimento e adulto. No estudo de AKASAKA et al. (2005), Msi-1 positivo foi detectado principalmente na região do pescoço (posição de células-tronco), mas que se limitam às regiões basais fetais da glândula pilórica durante os estágios iniciais de desenvolvimento. Segundo este mesmo estudo, esses resultados sugerem que a expressão de Musashi-1 ocorre especificamente nas regiões que contém células-tronco.

POTTEN et al. (2003), estudaram a expressão de Musashi-1 em intestino de camundongos e humanos. Em humanos, a expressão imunoistoquímica mostrou-se fraca, mas em camundongos, a proteína foi co-expressa apenas em regiões focais do intestino delgado, consideradas como região de células-tronco. Em adenomas intestinais Msi-1 também foi fortemente positivo. Estudos com a técnica de qPCR mostraram aumento da expressão de Musashi-1 em tumores, em comparação com o tecido normal adjacente. Estas observações sugerem que Musashi-1 é um marcador de células-tronco e progenitoras da linhagem precoce no tecido intestinal murino. Os nossos resultados estão de acordo com essas informações, pois mostraram um aumento da expressão de Musashi-1 no adenoma pleomórfico em relação ao tecido glandular normal, evidenciado pela técnica de qPCR. Morfologicamente, notou-se pela técnica imunoistoquímica, que a proteína Musashi-1 foi expressa nas células luminais e mioepiteliais modificadas do adenoma pleomórfico, mas apenas em áreas focais do tumor e em células isoladas de permeio a matriz condróide da neoplasia.

O proto-oncogene c-Kit é um receptor de tirosina quinase, componente essencial da proliferação celular, diferenciação e metástases. Ele é ativado por dimerização do receptor em estimulação por seu ligante, o fator de células-tronco (SCF). Depois de ativado, o c-Kit induz diversas respostas intracelulares através de grandes cascatas de sinalização (ERDOGAN et al. 2007; TETSU et al. 2010). A mutação ou super expressão de c-kit pode desorganizar o crescimento celular e resultar na formação de tumores, como tem sido relatado em diversos tipos tumorais como gastrointestinais (GIST), tumores de pulmão, colorretal, tumor de Ewing's, leucemias mielóide crônica, melanoma e tumores epiteliais (MIETTINEN E LASOTA 2005; TANG et al. 2010). O c-Kit pode ser expresso em tumores derivados de tecidos que já expressam o marcador, como por exemplo, neurofibromas, melanoma ou, em alguns casos tumores parecem adquirir a expressão deste fator, como neoplasias do pulmão, carcinoma adenóide cístico e carcinoma do cólon.

Em nossos casos, a expressão imunoistoquímica do c-Kit foi detectada em células luminais do adenoma pleomórfico, similar ao observado no estudo imunoistoquímico realizado por ANDREADIS et al. (2006). Entretanto, também observamos células mioepiteliais isoladas no estroma tumoral positivas para o marcador. Esse resultado é intrigante, pois permanece por ser esclarecida a origem dessas células isoladas. Nos ensaios de qPCR, a expressão do c-Kit foi aumentada em relação ao tecido glandular normal.

Em glândulas salivares, os estudos que determinam a presença do c-Kit são escassos, porém LOMBAERT et al. (2008), em estudo imunoistoquímico para a investigação de Musashi-1 e c-Kit, mostraram que Msi-1 foi expresso quase que exclusivamente nos núcleos das células dos ductos excretores e c-kit foi observado exclusivamente no ducto excretor das glândulas salivares, mas não nos ácinos. Esse mesmo grupo realizou experimentos onde células ductais da glândula submandibular de camundongos que eram Musashi-1 e c-Kit positivas foram isoladas e cultivadas *in vitro* e tinham o potencial de formar outras estruturas glandulares, evidenciando uma forte possibilidade de tratar de células tronco multipotentes. In vivo, estes mesmos pesquisadores mostraram que pacientes que receberam transplante intra-glandular de células c-kit positivas obtiveram restauração da morfologia e função da glândula lesada (LOMBAERT et al. 2008). Nos nossos casos, a expressão do c-Kit foi observada nas células epiteliais dos ductos intercalares tanto na glândula salivar adulta, como nas fases de morfogênese dessas glândulas. Em outros tipos de tecido glandular, a presença de c-Kit ainda não é bem determinada durante a embriogênese (MATSUDA et al. 1993). Todas essas evidências apontam para a possível importância do c-Kit na identificação de células-tronco das glândulas salivares e novos estudos, agora pavimentados nos resultados dessa pesquisa estão sendo desenvolvidos pelo nosso grupo para comprovar tais indícios.

O trabalho aqui apresentado revelou importantes resultados sobre marcadores de células-tronco, utilizando como modelo uma neoplasia

benigna de glândulas salivares – o adenoma pleomórfico e espécimes representativos da morfogênese dessas glândulas. Esses resultados mostraram que esses marcadores não são exclusivos das células-tronco, mas podem estar presentes em outros tipos celulares com grande capacidade proliferativa e que compõem parênquimas tumorais complexos como o da neoplasia estudada. Encontramos também evidências que nos mostraram que esses marcadores agora devem ser investigados em maior profundidade, considerando suas vias sinalizadoras que provavelmente apontarão novos caminhos para a compreensão dessas proteínas e genes na evolução de tecidos normais e tumorais.

7 CONCLUSÕES

Nos casos de adenoma pleomórfico estudados foi possível observar células que compartilham os mesmos marcadores descritos em células-tronco.

1. Os marcadores CD24, CD44, CD133, Musashi e c-Kit foram identificados em diferentes estruturas dos adenomas pleomórficos estudados, entretanto não se pode considerar cabalmente que essas estruturas contenham células-tronco, mas que talvez compartilhem marcadores com este tipo celular.

2. A presença dos marcadores de células-tronco foi identificada tanto nas estruturas epiteliais como mesenquimais do adenoma pleomórfico, não havendo correlação de células positivas com padrões morfológicos específicos de cada caso. Entretanto, a presença de c-Kit e CD133 se correlacionaram com o tamanho da neoplasia estudada.

3. Todos os genes estudados foram expressos nos adenomas pleomórficos quando comparados à expressão nas glândulas salivares normais.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1154-9.

Adi MM, Chisholm DM, Waterhouse JP. Stereological and immunohistochemical study of development of human fetal labial salivary glands and their S-100 protein reactivity. **J Oral Pathol Med** 1994; 23: 36-40.

Andreadis D, Epivatianos A, Pouloupoulos A, et al. Detection of C-KIT (CD117) molecule in benign and malignant salivary gland tumours. **Oral Oncol** 2006; 42:57-65.

Akasaka Y, Saikawa Y, Fujita K, et al. Expression of a candidate marker for progenitor cells, Musashi-1, in the proliferative regions of human antrum and its decreased expression in intestinal metaplasia. **Histopathology** 2005; 47:348-56.

Akashi T, Shirasawa T, Hirokawa K. Gene expression of CD24 core polypeptide molecule in normal rat tissues and human tumor cell lines. **Virchows Arch** 1994; 425:399-406.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:3983-8.

Arai F, Hirao A, Ohmura M, et al. Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. **Cell** 2004; 118:149-61.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, et al. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. **Cell** 1990; 61:1303-13.

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

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

Berkiwitz BKB, Holland GR, Moxham BJ. **A colour atlas and textbook of oral anatomy, histology and embryology**. 2nd ed. London Wolfe Publishing; 1992.

Bernfield MR, Banderjee SD, Cohn RH. Dependence of salivary epithelial morphology and branching morphogenesis upon acid mucopolysaccharide-protein (proteoglycan) at epithelial surface. **J Cell Biol** 1972; 52: 674-89.

Brittan M, Wright NA. The gastrointestinal stem cell. **Cell Prolif** 2004; 37:35-53.

Bullerdiek J, Wobst G, Meyer-Bolte K, et al. Cytogenetic subtyping of 220 salivary gland pleomorphic adenomas: correlation to occurrence, histological subtype, and in vitro cellular behavior. **Cancer Genet Cytogenet** 1993; 65:27-31.

Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? **Cell Cycle** 2007; 6:2332-8.

Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. **Histopathology** 2008; 52: 99-107.

Cheuk W, Chan JK. Advances in salivary gland pathology. **Histopathology** 2007; 51:1-20.

Collins AT, Berry PA, Hyde C, et al. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Res** 2005; 65:10946-51.

Collins CA, Olsen I, Zammit PS, et al. Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. **Cell** 2005; 122:289-301.

Corbeil D, Marzesco AM, Wilsch-Bräuninger M, et al. The intriguing links between prominin-1 (CD133), cholesterol-based membrane microdomains, remodeling of apical plasma membrane protrusions, extracellular membrane particles, and (neuro)epithelial cell differentiation. **FEBS Lett** 2010; 584:1659-64.

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

Dale AC. Salivary gland. In: Ten Cate AR, editor. **Oral histology**. 4th ed. St. Louis: Mosby; 1994. p.312-333.

Dardick I. Mounting evidence against current histogenetic concepts for salivary gland tumorigenesis. **Eur J Morphol** 1998; 36:257-61.

Debiec-Rychter M, Van Valckenborgh I, Van den Broeck C, et al. Histologic localization of PLAG1 (Pleomorphic Adenoma Gene 1) in pleomorphic adenoma of the salivary gland: cytogenetic evidence of common origin of phenotypically diverse cells. **Lab Invest** 2001; 81:1289-97.

Denny PC, Ball WD, Redman RS. Salivary glands: a paradigm for diversity of gland development. **Crit Rev Oral Bio Med** 1997; 8:51-75.

Donovan DT, Conley JJ. Capsular significance in parotid tumor surgery: reality and myths of lateral lobectomy. **Laryngoscope** 1984; 94:324-9.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes Dev** 2003; 17:1253-70.

Edling CE, Hallberg B. c-Kit--a hematopoietic cell essential receptor tyrosine kinase. **Int J Biochem Cell Biol** 2007; 39:1995-8.

Ellis GL, Auclair PL. **Tumors of the salivary glands**. Washington DC, Armed Forces Institute of Pathology; 1996. p.39-143. (Atlas of tumor pathology 3rd series, fascicle 17)

Emodi O, El-Naaj IA, Gordin A, et al. Superficial parotidectomy versus retrograde partial superficial parotidectomy in treating benign salivary gland tumor (pleomorphic adenoma). **J Oral Maxillofac Surg** 2010; 68:2092-8.

Erdogan G, Bassorgun CI, Pestereli HE, et al. C-kit protein expression in uterine and ovarian mesenchymal tumours. **APMIS** 2007; 115:204-9.

Fisher JC, Hollomon JH. A hypothesis for the origin of cancer foci. **Cancer** 1951; 4:916-8.

Fonseca I, Nunes JFM, Soares J. Expression of CD44 isoforms in normal salivary gland tissue: an immunohistochemical and ultrastructural study. **Histochem Cell Biol** 2000; 114:483-8.

Ford CE, Hamerton JL, Barnes DW, Loutit JF. Cytological identification of radiation-chimaeras. **Nature** 1956; 177:452-4.

Franchi A, Moroni M, Paglierani M, Santucci M. Expression of CD44 standard and variant isoforms in parotid gland and parotid gland tumours. **J Oral Pathol Med** 2001; 30:564-8.

Gakunga P, Frost G, Shuster S, et al. Hyaluronan is a prerequisite for ductal branching morphogenesis. **Development** 1997; 124:3987-97.

Golding M, Sarraf CE, Lalani EN, et al. Oval cell differentiation into hepatocytes in the acetylaminofluorene-treated regenerating rat liver. **Hepatology** 1995; 22:1243-53.

Gurbuz Y, Yildiz K, Aydin O, Almac A. Immunophenotypical profiles of salivary gland tumours: a new evidence for their histogenetic origin. **Pathologica** 2006; 98:147-52.

Hamburger A, Salmon SE. Primary bioassay of human myeloma stem cells. **J Clin Invest** 1977; 60:846-54.

Han J, Kioi M, Chu WS, et al. Identification of potential therapeutic targets in human head & neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Oncol** 2009; 1:27.

Hand AR. Salivary glands. In: Provenza DV, editor. **Oral histology inheritance and development**. 2nd ed. Philadelphia: Lea & Febiger; 1986.

Hiatt JL, Sauk JJ. Embryology and anatomy of salivary glands. In: Ellis GL; Auclair PL; Gnepp DR, editors. **Surgical pathology of salivary glands**. Philadelphia: W. B. Saunders; 1991. p.580.

Hisatomi Y, Okumura K, Nakamura K, et al. Flow cytometric isolation of endodermal progenitors from mouse salivary gland differentiate into hepatic and pancreatic lineages. **Hepatology** 2004; 39:667-75.

Hope KJ, Jin L, Dick JE. Acute myeloid leukemia originates from a hierarchy of leukemic stem cell classes that differ in self-renewal capacity. **Nat Immunol** 2004; 5:738-43.

Hough MR, Rosten PM, Sexton TL, et al. Mapping of CD24 and homologous sequences to multiple chromosomal loci. **Genomics** 1994; 22:154-61.

Houghton J, Morozov A, Smirnova I, Wang TC. Stem cells and cancer. **Semin Cancer Biol** 2007; 17:191-203.

Ianez RF, Buim ME, Coutinho-Camillo CM et al. Human salivary gland morphogenesis: myoepithelial cell maturation assessed by immunohistochemical markers. **Histopathology** 2010; 57:410-7.

Ito FA, Jorge J, Vargas PA, Lopes MA. Histopathological findings of pleomorphic adenomas of the salivary glands. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal** 2009; 14:E57-61.

Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. **J Clin Oncol** 2008; 26:2813-20.

Kanemura Y, Sakakibara S, Okano H. Identification of Musashi1-positive cells in human normal and neoplastic neuroepithelial tissues by immunohistochemical methods. **Methods Mol Biol** 2002; 198:273-81.

Karbanová J, Missol-Kolka E, Fonseca AV, et al. The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. **J Histochem Cytochem** 2008; 56:977-93.

Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, et al. Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. **Cell** 2005; 121:823-35.

Kishi T, Takao T, Fujita K, Taniguchi H. Clonal proliferation of multipotent stem/progenitor cells in the neonatal and adult salivary glands. **Biochem Biophys Res Commun** 2006; 340:544-52.

Klein RM. Development, structure and function of salivary glands. In: Avery JK, editor. **Oral development and histology**. 2rd ed. New York: Thieme; 1994. p.352-379.

Kögler G, Sensken S, Airey JA, et al. A new human somatic stem cell from placental cord blood with intrinsic pluripotent differentiation potential. **J Exp Med** 2004; 200:123-35.

Klonisch T, Wiechec E, Hombach-Klonisch S, et al. Cancer stem cell markers in common cancers - therapeutic implications. **Trends Mol Med** 2008; 14:450-60.

Lardon J, Corbeil D, Huttner WB, et al. Stem cell marker prominin-1/AC133 is expressed in duct cells of the adult human pancreas. **Pancreas** 2008; 36:e1-6.

Lavker RM, Tseng SC, Sun TT. Corneal epithelial stem cells at the limbus: looking at some old problems from a new angle. **Exp Eye Res** 2004; 78:433-46.

Lazzeri E, Crescioli C, Ronconi E, et al. Regenerative potential of embryonic renal multipotent progenitors in acute renal failure. **J Am Soc Nephrol** 2007; 18:3128-38.

Lee P-S, Sabbath-Solitaire M, Redondo TC, et al. Molecular evidence that the stromal and epithelial cells in pleomorphic adenomas of salivary gland arise from the same origin: clonal analysis using the human androgen receptor gene (HUMARA) assay. **Hum Pathol** 2000; 31:498-503.

Lee SK, Lim CY, Chi JG, et al. Prenatal development of human major salivary glands and immunohistochemical detection of keratins using monoclonal antibodies. **Acta Histochem** 1990; 89:213-35.

Leri A, Kajstura J, Anversa P. Cardiac stem cells and mechanisms of myocardial regeneration. **Physiol Rev** 2005; 85:1373-416.

Leung EL, Fiscus RR, Tung JW, et al. Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties. **PLoS One** 2010; 5:e14062.

Leverstein H, van der Wal JE, Tiwari RM, et al. Surgical management of 246 previously untreated pleomorphic adenomas of the parotid gland. **Br J Surg** 1997; 84:399-403.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Res** 2007; 67:1030-7.

Lin JT, Chang TH, Chang CS, et al. Prognostic value of pretreatment CD44 mRNA in peripheral blood of patients with locally advanced head and neck cancer. **Oral Oncol** 2010; 46:e29-33.

Lingam RK, Dagher AA, Nigar E, et al. 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.

Lombaert IM, Brunsting JF, Wierenga PK, et al. Rescue of salivary gland function after stem cell transplantation in irradiated glands. **Plos One** 2008, 3:e2063.

Lourenço SV, Lima DM, Uyekita SH, Schultz R, de Brito T. Expression of beta-1 integrin in human developing salivary glands and its parallel relation

with maturation markers: in situ hybridisation and immunofluorescence study.

Arch Oral Biol 2007; 52:1064-71.

Lourenço SV, Lima DM. Pleomorphic adenoma and adenoid cystic carcinoma: in vitro study of the impact of TGFbeta1 on the expression of integrins and cytoskeleton markers of cell differentiation. **Int J Exp Pathol** 2007; 88:191-8.

Lu ZQ, Li HG, Zhang HZ, et al. Expression and significance of CD44(+)ESA(+)CD24(-/low), stem cell markers for breast cancer, in non-small-cell lung carcinoma. **Ai Zheng** 2008; 27:575-9.

Martins C, Fonseca I, Roque L, et al. 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.

Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S, et al. Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. **Am J Pathol** 1993; 142:339-46.

Mcbride ML, Baillie J, Poland BJ. Growth parameters in normal fetuses. **Teratology** 1984; 29:185-91.

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

Miettinen M, Lasota J. KIT (CD117): a review on expression in normal and neoplastic tissues, and mutations and their clinicopathologic correlation. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2005; 13:205-20.

Missol-Kolka E, Karbanová J, Janich P, et al. Prominin-1 (CD133) is not restricted to stem cells located in the basal compartment of murine and human prostate. **Prostate** 2011; 71:254-67.

Mizrak D, Brittan M, Alison MR. CD133: molecule of the moment. **J Pathol** 2008; 214:3-9.

Moonis G, Patel P, Koshkareva Y, et al. Imaging characteristics of recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland. **AJNR Am J Neuroradiol** 2007; 28:1532-6.

Moreira AL, Gonen M, Rekhtman N, Downey RJ. Progenitor stem cell marker expression by pulmonary carcinomas. **Mod Pathol** 2010; 23:889-95.

Nickerson PE, Myers T, Clarke DB, Chow RL. Changes in Musashi-1 subcellular localization correlate with cell cycle exit during postnatal retinal development. **Exp Eye Res** 2011; 92:344-52.

Noguchi S, Aihara T, Yoshino K, et al. Demonstration of monoclonal origin of human parotid gland pleomorphic adenoma. **Cancer** 1996; 77:431-5.

Nordling CO. A new theory on cancer-inducing mechanism. **Br J Cancer** 1953; 7:68-72.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature** 2007; 445:106-10.

Okano H, Kawahara H, Toriya M, et al. Function of RNA-binding protein Musashi-1 in stem cells. **Exp Cell Res** 2005; 306:349-56.

Oliveira LR, Jeffrey SS, Ribeiro-Silva A. Stem cells in human breast cancer. **Histol Histopathol** 2010; 25:371-85.

Potten CS, Booth C, Tudor GL, et al. Identification of a putative intestinal stem cell and early lineage marker; musashi-1. **Differentiation** 2003; 71:28-41.

Potter VR. Phenotypic diversity in experimental hepatomas: the concept of partially blocked ontogeny. The 10th Walter Hubert Lecture. **Br J Cancer** 1978; 38:1-23.

Prince ME, Sivanandan R, Kaczorowski A, et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2007; 104:973-8.

Radtke F, Clevers H. Self-renewal and cancer of the gut: two sides of a coin. **Science** 2005; 307:1904-9.

Rapoport DH, Danner S, Kruse C. Glandular stem cells are a promising source for much more than beta-cell replacement. **Ann Anat** 2009; 191:62-9.

Rather LJ. **The genesis of cancer: a study in the history of ideas.** Baltimore: The Johns Hopkins University Press; 1978. p.1-178.

Raubenheimer EJ, van Nickerk JP, Hauman CH. Salivary myoepithelium: distribution, structure, functions and pathologic proliferations. **J Dent Assoc S Afr** 1987; 42:631-7.

Redman RS. Myoepithelium of salivary glands. **Microsc Res Tech** 1994; 27:25-45.

Regenbrecht CR, Lehrach H, Adjaye J. Stemming cancer: functional genomics of cancer stem cells in solid tumors. **Stem Cell Rev** 2008; 4:319-28.

Regezi JA, Batsakis JG. Histogenesis of salivary gland neoplasms. **Otolaryngol Clin North Am** 1977; 10:297-307.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature** 2001; 414:105-11.

Reynolds BA, Weiss S. Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. **Science** 1992; 255:1707-10.

Rhijn BWGV, Vis AN, Kwast THVD, et al. Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome. **J Clin Oncol** 2003; 21:1912-21.

Rotter N, Oder J, Schlenke P, et al. Isolation and characterization of adult stem cells from human salivary glands. **Stem Cells Dev** 2008; 17:509-18.

Sackstein R, Merzaban JS, Cain DW, et al. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. **Nat Med** 2008; 14:181-7.

Sato A, Okumura K, Matsumoto S, et al. Isolation, tissue localization, and cellular characterization of progenitors derived from adult human salivary glands. **Cloning Stem Cells** 2007; 9:191-205.

Seaberg RM, Smukler SR, Kieffer TJ, et al. Clonal identification of multipotent precursors from adult mouse pancreas that generate neural and pancreatic lineages. **Nat Biotechnol** 2004; 22:1115-24.

Seeberger KL, Dufour JM, Shapiro AM, et al. Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. **Lab Invest** 2006; 86:141-53.

Seifert G, Brocheriou C, Cardesa A, Eveson JW. WHO International Histological Classification of Tumours. Tentative Histological Classification of Salivary Gland Tumours. **Pathol Res Pract** 1990; 186:555-81.

Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. **Nature** 2006; 439:84-88.

Shimkin MB. **Contrary to nature**. Washington DC: Department of Health, Education and Welfare; 1977.

Shimkin MB. The written word and cancer – some personal involvements, 1940 – 1977: autobiographical essay. **Cancer Res** 1978; 30:241-52.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. **Cancer Cell** 2007; 11:259-73.

Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. **Int J Biochem Cell Biol** 2005; 37:715-9.

Siminovitch L, McCulloch EA, Till JE. The distribution of colony-forming cells among spleen colonies. **J Cell Physiol** 1963; 62:327-36.

Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. **Nature** 2004; 432:396-401.

Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:832-44.

Stemple DL, Anderson DJ. Isolation of a stem cell for neurons and glia from the mammalian neural crest. **Cell** 1992; 71:973-85.

Tang Y, Liang X, Zheng M, et al. Expression of c-kit and Slug correlates with invasion and metastasis of salivary adenoid cystic carcinoma. **Oral Oncol** 2010; 46:311-6.

Tetsu O, Phuchareon J, Chou A, et al. Mutations in the c-Kit gene disrupt mitogen-activated protein kinase signaling during tumor development in adenoid cystic carcinoma of the salivary glands. **Neoplasia** 2010; 12:708-17.

Till JE, McCulloch EA. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. **Radiat Res** 1961; 14:213-22.

Toma JG, Akhavan M, Fernandes KJ, et al. Isolation of multipotent adult stem cells from the dermis of mammalian skin. **Nat Cell Biol** 2001; 778-84.

Tongue CH; Luke DA. Dental anatomy: the salivary glands. **Dent Update** 1984; 11:264-70.

Tropepe V, Coles BL, Chiasson BJ, et al. Retinal stem cells in the adult mammalian eye. **Science** 2000, 287:2032-6.

Tumbar T, Guasch G, Greco V, et al. Defining the epithelial stem cell niche in skin. **Science** 2004, 303:359-63.

Wal JEDV, Leverstein H, Snow GB, et al. Parotid gland tumors: histologic reevaluation and reclassification of 478 cases. **Head Neck** 1998; 20:204-7.

Xing R, Regezi JA, Stern M, et al. Hyaluronan and CD44 expression in minor salivary gland tumors. **Oral Dis** 1998; 4:241-7.

Yaku Y. Ultrastructural studies on development of human fetal salivary glands. **Arch Histol Jap** 1983; 46: 677-690.

Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, et al. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells. **Blood** 1997; 90:5002-12.

Yu Y, Flint A, Dvorin EL, Bischoff J. AC133-2, a novel isoform of human AC133 stem cell antigen. **J Biol Chem** 2002; 277:20711-6.

Zago MA, Covas DT. **Células-tronco, a nova fronteira da medicina**. São Paulo: Atheneu; 2006. Células-tronco: Origens e propriedades; p.3-20.