CIBELE PIDORODESKI NAGANO

**Análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica comparativa do fenótipo
de tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares**

São Paulo

2014

CIBELE PIDORODESKI NAGANO

**Análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica comparativa do fenótipo
de tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof^a Dr^a Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Nagano, Cibele Pidorodeski.

Análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica comparativa do fenótipo de tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares / Cibele Pidorodeski Nagano; orientador Silvia Vanessa Lourenço. -- São Paulo, 2014.

99 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia - Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão original.

1. Neoplasias das glândulas salivares. 2. Metástase neoplásica. 3. Neoplasias bucais. 4. Patologia bucal. I. Lourenço, Silvia Vanessa. II. Título.

Nagano CP. Análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica comparativa do fenótipo de tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À minha família e, em especial, à Polly e Tutty:

Luz da minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus, sentido de tudo.

Em especial, à minha doce e maravilhosa mãe, Eslauka, pelo amor infinito. Meu alicerce e equilíbrio vital. Toda e qualquer vitória é e sempre será sua.

Ao meu amor, amigo, companheiro e porto seguro, Gustavo. Obrigada por trilhar cada passo junto a mim.

À minha querida Orientadora, Professora Doutora Silvia Vanessa Lourenço, pela oportunidade oferecida, ainda na Graduação, de conhecer e me apaixonar pela arte do ensino e da pesquisa científica. Serei eternamente grata por cada ensinamento compartilhado, por todas oportunidades concedidas, pela amizade infindável, carinho, paciência e respeito demonstrado.

Aos já amigos e profissionais admiráveis do A.C. Camargo Cancer Center (exemplo de seres humanos), por toda colaboração e dedicação na realização deste trabalho. Obrigada pelo contínuo incentivo!

A todos os professores do Departamento de Estomatologia pelos conhecimentos transmitidos e dedicação exímia à nossa amada Odontologia.

À Professora Doutora Isabel Fonseca e toda a equipe dos Departamentos de Patologia e Estomatologia Clínica do Instituto Português de Oncologia de Lisboa (IPOLFG) pela memorável experiência, valioso aprendizado e tão caloroso acolhimento em terras lusitanas.

A todos os amigos que trilharam a mesma Graduação e Pós-graduação, em especial, à Sheyla Batista Bologna Lopes, Tathyane Harumi N. Teshima e Renata Ianez Fraga, pela preciosa amizade e colaboração ao longo de todos os anos.

Às funcionárias do Programa de Patologia Bucal, Zilda, Néia e Nair, meu agradecimento por sempre nos acolher com tanto carinho e dedicação.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Ao Núcleo de Apoio à Pesquisa NAP-Saliva.

Aos meus amigos, anjos do meu caminhar.

Aos pacientes, motivo maior de força e perseverança.

RESUMO

Nagano CP. Análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica comparativa do fenótipo de tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2014. Versão Original.

Apesar da incidência relativamente baixa, as neoplasias de glândulas salivares (NGSs) constituem um grupo de doenças caracterizado pela notável heterogeneidade em sua apresentação clínica, histológica e comportamento biológico, abrigando um fator de extrema relevância a despeito de seu prognóstico: a ocorrência de metástases, considerada a principal intercorrência relacionada à mortalidade em pacientes oncológicos. Neste estudo, analisamos as características clínicas e histopatológicas de pacientes diagnosticados com metástases à distância de carcinomas de glândulas salivares tratados no A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, no período de 1970 a 2010. Investigamos alterações fenotípicas entre os tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares, a partir do estudo da caracterização do padrão de expressão de citoqueratinas, procurando identificar a associação entre a expressão destes antígenos a fatores de risco, ou não, ao potencial metastático à distância e sua importância prognóstica. A casuística total compreendeu 43 pacientes diagnosticados com metástase à distância, com a média de idade de 42.5 anos sendo a glândula parótida o órgão primário mais acometido, e os pulmões o sítio metastático mais incidente. O tipo histológico mais comumente relacionado à metástase foi o carcinoma adenoide cístico. A análise imunoistoquímica da expressão de citoqueratinas fora realizada em 10 neoplasias primárias e 10 metastáticas, as quais revelaram um padrão fenotípico similar no tumor primário e no tumor metastático, apresentando a evidência majoritária de células luminiais de estruturas ductais. A perda de expressão dos marcadores em áreas tumorais periféricas, adjacentes ao parênquima pulmonar, corrobora a predição de alteração do citoesqueleto das células neoplásicas, possivelmente promovendo uma maior capacidade de migração das células neoplásicas.

Palavras-chave: 1. Neoplasia de glândulas salivares 2. Metástase 3. Citoqueratinas

ABSTRACT

Nagano CP. Clinical and phenotypical analysis of primary and metastatic salivary glands neoplasms: cytokeratins profile [dissertation]. São Paulo: Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo; 2014. Versão Original

Salivary gland neoplasms consist of a notorious group of malignancies best known for its clinical features, biological behavior and histological heterogeneity. An important fact related to prognosis is distant metastasis (uncommon in salivary gland tumors). Cytokeratins (CK) are important differentiation markers frequently used for diagnosis processes. Its employment may be useful to identify metastatic disease. In this study, a retrospective evaluation was performed on patients undergoing treatment for metastatic salivary glands tumors between 1970 and 2010, from A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo, Brazil. Demographic data and histopathological specimens were obtained from the medical records. Investigation of the expression of cytokeratins in primary and metastatic salivary gland neoplasms was performed and correlated with their phenotypical patterns. Forty three eligible patients were obtained from the database. Parotid gland represented the primary tumor site most frequently related to metastasis. Lung was the most common metastatic site. Adenoid cystic carcinoma was the histological type more frequently associated to metastatic disease. Immunohistochemistry analysis was performed in 10 primary salivary gland tumors and 10 metastatic salivary gland neoplasms. CK expression patterns were similar in both primary and metastatic neoplasms, except for the tumor periphery in close contact with lung parenchyma. Cytokeratins were absent in the invasive front of metastatic lesions, and this may be related to an increased capacity of tumor cells migration and proliferation.

Keywords: 1. Salivary gland neoplasms 2. Metastasis 3. Cytokeratins

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1- Histologia das glândulas salivares	19
Figura 2.2 - Carcinoma adenoide cístico em região de assoalho bucal: apresentação clínica	23
Gráfico 5.1 - Distribuição das neoplasias metastáticas de glândulas salivares segundo o gênero	52
Gráfico 5.2 - Distribuição da localização anatômica das neoplasias primárias de glândulas salivares.....	53
Gráfico 5.3 - Distribuição dos tipos histológicos de neoplasias primárias de glândulas salivares	54
Gráfico 5.4 - Distribuição de Carcinoma adenoide cístico quanto à localização.....	55
Gráfico 5.5 - Distribuição de Carcinoma adenoide cístico quanto ao padrão histológico	56
Gráfico 5.6 - Distribuição de Adenocarcinomas quanto às variantes histológicas	57
Gráfico 5.7 - Distribuição do número de pacientes quanto às dimensões tumorais .	58
Gráfico 5.8 - Distribuição das neoplasias de glândulas salivares quanto ao acometimento de margens cirúrgicas.....	59
Gráfico 5.9 - Distribuição das neoplasias de glândulas salivares quanto à presença de invasão perineural	60
Figura 5.1 - Aspectos histopatológicos do carcinoma adenoide cístico.....	61
Figura 5.2 - Padrões histológicos do carcinoma mucoepidermoide	63

Gráfico 5.10-Distribuição dos órgãos acometidos por metástase à distância em pacientes com neoplasias de glândulas salivares.....	65
Gráfico 5.11-Distribuição da ocorrência de tipos histológicos em metástases múltiplas à distância em pacientes com neoplasias de glândulas salivares	66
Figura 5.3- Aspectos histopatológicos de metástases de carcinoma adenoide cístico	67
Figura 5.4 - Aspectos histopatológicos de metástases de carcinoma mucoepidermoide e adenocarcinoma de ducto salivar	69
Gráfico 5.12-Distribuição dos pacientes que apresentaram neoplasias metastáticas de glândulas salivares quanto ao status clínico obtido na última informação colhida	72
Figura 5.5 - Análise comparativa da distribuição de citoqueratinas em carcinoma adenoide cístico, predominantemente tubular, primário de parótida e metastático pulmonar.....	75
Figura 5.6 - Exemplos de expressão de citoqueratinas em carcinoma adenoide cístico primário, predominantemente cribriforme, e metastático pulmonar	77

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Filamentos intermediários: expressão em tecidos normais e em neoplasias	33
Tabela 2.2 - Expressão de citoqueratinas em tecidos normais	35
Tabela 2.3 - Expressão de citoqueratinas no epitélio oral normal	37
Tabela 2.4 - Expressão de citoqueratinas no epitélio de glândulas salivares normais... ..	38
Tabela 4.1 - Divisão histológica dos tumores epiteliais malignos de glândulas salivares (Organização Mundial da Saúde, 2005).....	45
Tabela 4.2 - Anticorpos primários, clones, fabricantes e diluições empregados na análise imunoistoquímica	48
Tabela 5.1 - Distribuição das neoplasias malignas metastáticas de origem epitelial da amostra estudada, provenientes do A.C. Camargo Câncer Center, diagnosticadas e tratadas no período de 1970 a 2010, de acordo com sua natureza histológica e principais dados sócio-demográficos e clínicos	55
Tabela 5.2 - Distribuição das neoplasias malignas primárias de origem epitelial selecionadas para compor a amostra, provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, diagnosticadas e tratadas no período de 1970 a 2010, segundo: tipos histológicos e localização do tumor primário.....	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AP	Adenoma pleomórfico
APBG	Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau
CAC	Carcinoma adenoide cístico
CA ex-AP	Carcinoma ex-adenoma pleomórfico
CDS	Carcinoma de ductos salivares
CK	Citoqueratinas
CME	Carcinoma mucoepidermoide
FI	Filamentos intermediários
GFAP	Proteína ácida fibrilar glial
IQ	Imunoistoquímica
kD	Kilodalton
MA	Microfilamento de actina
MT	Microtúbulo de tubulina
NGS	Neoplasia de glândula salivar
nm	Nanômetro
OMS	Organização mundial da saúde
RM	Ressonância magnética
Rx	Radiografia
TEM	Transição epitélio-mesenquimal
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	17
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	42
5 RESULTADOS.....	51
6 DISCUSSÃO	79
7 CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS.....	88
ANEXO	96

1 INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, é notório o aumento gradativo concernente à expectativa de vida da população mundial, acarretando, equivalentemente, a uma maior exposição e susceptibilidade ao desenvolvimento de diversas enfermidades, tal como neoplasias.

As neoplasias epiteliais das glândulas salivares constituem um grupo de doenças cuja incidência anual corresponde, aproximadamente, 3% a 5% dos tumores que acometem a região de cabeça e pescoço e 0,3% de todas as neoplasias malignas (Pinkston; Cole, 1999; Eveson et al., 2005). Apesar de sua incidência relativamente baixa, as neoplasias das glândulas salivares (NGSs) são caracterizadas por variações notáveis em sua apresentação clínica, histológica e biológica, dificultando o estabelecimento de condutas terapêuticas padronizadas.

Corroborando a associação entre as características clínicas de neoplasias das glândulas salivares, alguns estudos evidenciam uma maior prevalência destes tumores em indivíduos entre a quinta e sétima décadas de vida, sendo a média de idade dos acometidos por tumores benignos e malignos de 46 e 47 anos, respectivamente. Há predomínio de lesões benignas em mulheres e o inverso ocorre nas malignas, nas quais há pequena predileção pelo gênero masculino (Evenson et al., 2005).

De acordo com sua composição e características histológicas, as neoplasias das glândulas salivares são classificadas em vários grupos: adenomas, carcinomas, tumores não epiteliais, tumores secundários, linfomas, tumores não classificados (não-específicos), dos quais todos apresentam sub-classificações. De acordo com a atual Classificação Histológica dos Tumores de Glândulas Salivares da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.), publicada em 2005, são conhecidos 9 subtipos de neoplasias epiteliais benignas das glândulas salivares e 23 neoplasias epiteliais malignas, dos quais destacam-se, respectivamente, por sua incidência e comportamento biológico: Adenoma Pleomórfico (AP), Carcinoma Mucoepidermoide (CME), Carcinoma Adenoide Cístico (CAC) e Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau (APBG) (Ellis; Auclair, 2008).

A frequência das neoplasias malignas das glândulas salivares varia de 0,4 a 2,6 casos por 100.000 pessoas (Pinkston; Cole, 1999), sendo o carcinoma mucoepidermoide (CME) o tipo histológico predominante, seguido do carcinoma adenoide cístico (CAC). A glândula parótida corresponde ao órgão mais acometido, seguido das glândulas salivares menores (mucosas), submandibular e, finalmente, a glândula sublingual (Guntinas-Lichius et al., 2004).

A diversidade histológica e o comportamento biológico das neoplasias malignas abrigam um fator de extrema relevância a despeito de seu prognóstico: a ocorrência de metástases. O desenvolvimento de metástases à distância provenientes dos tumores primários das glândulas salivares está diretamente associado ao tipo histológico e localização tumoral, sendo mais comumente relacionado ao carcinoma adenoide cístico (CAC), carcinoma mucoepidermoide de alto grau (CME), carcinoma de ducto salivar (CDS) e tumores localizados na glândula submandibular, base da língua e região faringea (Vermeulen et al., 2002).

O fenômeno de disseminação tumoral implica direta e incisivamente no prognóstico das neoplasias malignas: sua ausência resulta em um melhor prognóstico e maior sobrevida, enquanto a ocorrência de metástases trata-se da principal intercorrência relacionada à mortalidade de pacientes oncológicos (Vermeulen et al., 2002). Para o CAC, apesar da incidência de metástases regionais e à distância chegarem a 50%, a taxa de sobrevida de 5 anos compreende mais de 70%; no entanto, em 20 anos, tal essa taxa se reduz drasticamente para menos de 10% (Kokemueller et al., 2004). A ocorrência de metástases loco-regionais e à distância no CME abrangem, respectivamente, cerca 3 a 15% e 6 a 15% dos pacientes (Bradley, 2001), e as taxas de sobrevida de cinco e dez anos, situam-se em torno de 60% e 40%, respectivamente (Suzuki et al., 1998; Okabe et al., 2001).

A identificação e elucidação dos componentes que englobam o processo metastático provêm entendimentos complementares acerca do comportamento tumoral, contribuindo, desta forma, para o diagnóstico e desenvolvimento de condutas terapêuticas satisfatórias, redução na incidência de metástases e melhor prognóstico ao paciente oncológico.

Atualmente, ainda carece-se de informações incisivas e comprobatórias em torno do comportamento metamórfico e heterogêneo das células metastáticas em

neoplasias de glândulas salivares. Em função disto, buscamos, por meio deste trabalho, identificar e analisar o perfil clínico-histopatológico de pacientes portadores de neoplasias malignas metastáticas de glândula salivar, e comparar as alterações fenotípicas entre os respectivos tumores primários e tumores metastáticos, a partir do estudo da caracterização do padrão de expressão de moléculas do citoesqueleto, denominadas citoqueratinas. Nesta avaliação, procuramos identificar a associação entre a expressão destes antígenos a fatores de risco possivelmente relacionados à doença metastática, ao potencial metastático à distância e sua importância prognóstica.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Glândulas salivares

As glândulas salivares constituem um grupo de glândulas exócrinas cuja função principal é a produção e excreção de saliva. Estruturalmente, este sistema está organizado em três pares de tecido glandular conhecidos, coletivamente, como glândulas salivares maiores (parótida, submandibular e sublingual). Adicionalmente, o sistema salivar compreende numerosos e pequenos agregados independentes de tecido glandular, localizados na submucosa das vias aerodigestivas – com a exceção de gengiva e porção anterior do palato duro – conhecidos como glândulas salivares menores (mucosas) (Katchburian; Arana, 2004; Ellis; Auclair, 2008).

Cada glândula salivar é composta por elementos parenquimatosos revestidos e sustentados por tecido conjuntivo. O parênquima glandular é formado por ácinos e um sistema de ductos (ductos intercalares, estriados e excretores). Os tipos celulares encontrados na extremidade da porção secretora são: células serosas, células mucosas ou por ambos os tipos, além de células mioepiteliais, os quais variam de acordo com a glândula salivar e respectiva porção secretora. O tecido conjuntivo, por sua vez, consiste o estroma glandular, composto por uma cápsula e septos conjuntivos, os quais dividem grupos de ácinos e de ductos em lobos e lóbulos. Além de fornecer o suporte ao parênquima glandular, o estroma contém vasos sanguíneos, linfáticos e nervos que suprem as glândulas (Katchburian; Arana, 2004).

Figura 2.1 - Histologia das glândulas salivares. Adaptado de Myers E. e Ferris (2002)

2.1.1 Glândulas salivares maiores

Os três pares de glândulas salivares maiores estão localizados fora da cavidade oral propriamente dita, para onde drenam sua secreção através de grandes ductos excretórios. Compreendem as glândulas parótidas, as submandibulares e as sublinguais, sendo responsáveis por 93% do total de saliva produzida.

A parótida é uma glândula de morfologia piramidal composta por 3 grandes lóbulos, majoritariamente constituídos por ácinos serosos. O estroma, composto de tecido denso, apresenta acúmulos de tecido adiposo - que aumenta, gradativamente com a idade - contém ainda um ou mais linfonodos em sua estrutura. Apresenta-se como a maior de todas as glândulas, pesando, aproximadamente, entre 15 e 30 gramas. Localiza-se entre o ramo da mandíbula e o processo estiloide do osso temporal.

A submandibular é uma glândula mista, composta, predominantemente, por ácinos serosos. Representa a segunda maior glândula desse sistema, pesando entre 7 a 15 gramas. Situa-se ao longo do corpo da mandíbula, em contato com o músculo milo-hioideo.

A glândula sublingual é igualmente mista: quase a totalidade de seus ácinos apresenta células mucosas. Possui, aproximadamente, 2 a 4 gramas e localiza-se no assoalho bucal, em proximidade com o músculo genioglossos (Figún; Garino, 2003; Katchburian; Arana, 2004; Ellis; Auclair, 2008).

2.1.2 Glândulas salivares menores

As glândulas menores são pequenos conjuntos de lóbulos compostos por ácinos mucosos não encapsulados, distribuídos por toda a submucosa do sistema areodigestivo, com exceção da gengiva inserida e porção anterior do palato duro. Essas glândulas secretam saliva rica em glicoproteínas, conferindo viscosidade ao

fluido salivar e, conseqüentemente, propriedades lubrificantes à mucosa (Figún; Garino, 2003; Katchburian; Arana, 2004).

2.2 Neoplasias de glândulas salivares

2.2.1 Considerações clínicas

As neoplasias das glândulas salivares (NGS) respondem por cerca de 3% a 10% de todas as neoplasias em região de cabeça e pescoço, sendo que desses, 74% a 80% são de natureza benigna e 20 a 26% correspondem a neoplasias malignas. Comparativamente à totalidade de cânceres que acometem o corpo humano, as neoplasias malignas das glândulas salivares apresentam uma incidência anual de 0.4% a 1% a cada 100.00 habitantes (Elis; Auclair, 2008).

Em um estudo brasileiro, Vargas et al. (2002) examinaram 124 tumores de glândulas salivares provenientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina – USP, tratados durante o período de Janeiro de 1993 a Dezembro de 1999. De acordo com seus resultados, a frequência de ocorrência dos tumores benignos foi de 80% e de tumores malignos de 20%. Tumores localizados na glândula parótida corresponderam a 71% dos casos, seguidos da glândula submandibular (24%) e glândulas salivares menores (5%). Os principais tumores benignos foram o adenoma pleomórfico, representando 84% dos casos e o tumor de Warthin com 13% dos casos. Entre os tumores malignos, o carcinoma mucoepidermoide foi o mais comum, correspondendo a 52% dos casos, seguido pelo carcinoma adenoide cístico em 20% e carcinoma ex-adenoma pleomórfico, o qual foi detectado em 12% dos casos.

Jones et al. (2007), no Reino Unido, analisaram 741 casos de neoplasias de glândulas salivares. Destes, 481 (64.9%) tratavam-se de tumores benignos e 260 (35.1%) neoplasias malignas, sendo os tipos histológicos mais comumente encontrados o adenoma pleomórfico (44,4%) e carcinoma mucoepidermoide (32,7%), respectivamente.

Em relação às neoplasias primárias de glândulas salivares, os sítios anatômicos mais incidentes são: glândula parótida (64-80%), glândulas salivares menores (9-23%), glândula submandibular (7-11%) e, finalmente, glândula sublingual (<1%) (Nagler; Laufer, 1997).

A grande maioria das NGS tem origem epitelial (Eveson; Cawson, 1985; Barnes et al., 2005). Segundo Batsakis et al. (1990), os tumores de origem epitelial perfazem, aproximadamente, 60% dos casos, enquanto que tumores mesenquimais representam 40% do total.

Estudos revelam maior incidência de neoplasias epiteliais de glândulas salivares entre a sexta e sétima décadas de vida, sendo a média de idade de pacientes com tumores benignos e malignos de 46 e 47 anos, respectivamente (Guzzo et al., 2006; Ellis; Auclair, 2008). Em indivíduos infanto-juvenis (menores de 17 anos), nota-se uma prevalência maior de neoplasias. Dentre todas as faixas-etárias, há variações de gênero de acordo com o tipo histológico diagnosticado, havendo uma discreta predominância de neoplasias malignas em indivíduos do sexo masculino (Ellis; Auclair, 2008).

Os sinais e sintomas relacionados às neoplasias das glândulas salivares maiores diferem-se entre si, uma vez que são interdependentes da localização do órgão. De um modo geral, esses tumores apresentam-se, clinicamente, como nódulos superficiais ou profundos, bem delimitados, assintomáticos e de evolução lenta (Neville, 2009; Vaughan, 2001).

Os indicadores clínicos que sugerem uma neoplasia maligna de glândula salivar maior são: taxa de crescimento rápido; sintomatologia dolorosa; envolvimento do nervo facial; adenopatia cervical; trismo; ulceração da pele e presença de fístulas. Por outro lado, uma taxa de crescimento lento de uma massa assintomática não exclui a natureza maligna. Cerca de 40% de todas as neoplasias malignas originárias em glândulas salivares apresentam um comportamento clínico indolente (especialmente em indivíduos jovens, < 40 anos de idade) e um crescimento tumoral lento. Em pacientes acima desta faixa etária, a dinâmica tumoral de tais tumores mostra-se mais agressiva, incluindo sintomas como paralisia facial parcial ou total, denotando o comportamento infiltrativo (Batsakis, 1982).

A Figura 2.1 exemplifica um carcinoma adenoide cístico, cuja apresentação clínica mostra-se indolente, em um paciente do sexo masculino, leucoderma, de 56 anos de idade.

Figura 2.1 - Carcinoma adenoide cístico em região de assoalho bucal: apresentação clínica.
Fonte: Acervo Profª Drª Silvia Vanessa Lourenço.

2.2.2 Etiologia e fatores de risco

O entendimento concernente à patogênese das neoplasias de glândulas salivares permanece, ainda, pouco elucidado; porém, diversos fatores sugestivos que podem agir de forma isolada ou sinérgica, induzindo ou exacerbando o potencial carcinogênico são descritos na literatura, tais como: radiação ocupacional, ultravioleta ou terapêutica em região de cabeça e pescoço; fatores genéticos;

histórico familiar e/ou de neoplasias prévias; exposição a agentes químicos industriais (Horn-Ross et al., 1997; Guzzo et al., 2006).

Tabagismo e etilismo não são hábitos correlacionados ao desenvolvimento de carcinomas de glândulas salivares; não obstante, estudos demonstram uma associação entre o tabagismo e o tumor de Warthin (benigno) (Swanson; Burns, 1997; Ellis; Auclair, 2008).

2.2.3 Características histopatológicas das neoplasias malignas das glândulas salivares

De acordo com sua arquitetura histológica, as neoplasias das glândulas salivares são classificadas em vários grupos: adenomas, carcinomas, tumores não epiteliais, tumores secundários, linfomas, tumores não classificados (não-específicos), dos quais todos apresentam sub-classificações (Seifert et al., 1991).

Segundo a 'Classificação Histológica dos Tumores de Glândulas Salivares' da Organização Mundial de Saúde (O.M.S.), publicada em 2005, são conhecidas 23 neoplasias epiteliais malignas das glândulas salivares, das quais destacam-se, respectivamente, por sua incidência e comportamento biológico: carcinoma mucoepidermoide (CME), carcinoma adenoide cístico (CAC) e adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG) (Ellis; Auclair, 2008).

2.2.4 Carcinoma mucoepidermoide (CME)

Histologicamente, o CME é constituído basicamente por três diferentes tipos celulares: células mucosas, epidermóides e intermediárias. As células mucosas apresentam formato variado, podendo ser colunares ou poligonais, com citoplasma abundante contendo mucina, determinando uma aparência clara e eosinofílica, similar às células mucosas acinares. As células epidermóides possuem frequentemente uma forma poliédrica, podendo ser arredondadas ou ovóides, ou

como uma célula epidermoide madura com citoplasma eosinofílico abundante. As células intermediárias são caracterizadas usualmente pela perda do aspecto poligonal das células epidermóides, de tamanho menor e menos coesas, podendo apresentar-se com halo claro perinuclear, correspondendo ao citoplasma escasso. Alguns tumores podem apresentar, também, número variável de células claras, com morfologia poligonal, núcleo centralizado, abundante citoplasma claro ou eosinofílico contendo glicogênio, e que, ocasionalmente, podem constituir uma porção considerável do tumor. Em menor frequência, também podem estar presentes células colunares, as quais usualmente encontram-se revestindo estruturas ductais e císticas, com aspecto poligonal e núcleo deslocado para a basal. Todos estes tipos celulares podem encontrar-se organizados em dois padrões distintos: cístico, em que há formação de estruturas císticas e glandulares ductais; e sólido, com formação de ilhas tumorais, em meio a um estroma colageinizado (Luna, 2006; Rosai, 2004; Cheuk; Chan, 2000; Gnepp et al, 2001). A organização histológica do CME lembra a do ducto excretor das glândulas salivares, ao qual tem sido atribuída a sua origem (Dardick, 1996; Loyola; de Araujo; de Sousa, 1996).

2.2.5 Carcinoma adenoide cístico (CAC)

A aparência microscópica do CAC engloba uma mistura de células mioepiteliais e células ductais, as quais podem apresentar-se em um arranjo fenotípico variável, incluindo três padrões morfológicos: cribriforme, representado por cordões de células basaloídes que se confluem, originando espaços pseudocísticos os quais, geralmente, estão permeados por material mucoide basofílico, um produto eosinofílico hialinizado ou uma combinação da aparência mucoide-hialinizada; tubular, com presença de estruturas tubulares compostas por células ductais e mioepiteliais em um estroma hialinizado; e sólido, no qual observa-se ilhotas ou ninhos celulares com raras formações pseudocísticas ou ductais, onde, diferentemente aos dois cribriforme e tubular, o pleomorfismo celular, atividade mitótica e áreas de necrose podem ser encontradas (Batsakis et al., 1990; Barnes et al., 2005; Neville, 2008). Usualmente, uma combinação desses padrões é

evidenciada, sendo a classificação tumoral baseada no padrão predominante (Gnepp et al, 2001).

Dentre os aspectos histopatológicos característicos do carcinoma adenoide cístico, ressalta-se a tendência à invasão perineural, mesmo em lesões de curto curso clínico, corroborando à sintomatologia dolorosa apresentada pelos pacientes (Barnes et al, 2005).

2.2.6 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG)

Histologicamente, as células tumorais do APBG apresentam certo grau de variabilidade quanto a seu formato, podendo ser arredondadas, cuboidais ou poligonais, assim como seu núcleo, o qual pode ser ovoide ou fusiforme. Vários padrões de crescimento são identificáveis: sólido, em cordões, ductal, cístico ou cribriforme, mimetizando um carcinoma adenoide cístico. Usualmente, a massa tumoral é permeada por um estroma de natureza mucoide ou hialinizado. Invasão perineural também pode ser identificada, levando a questionamentos diagnósticos a despeito da distinção entre APBG e CAC (de Araujo; Sousa, 1999; Neville, 2008; Ellis; Auclair, 2008).

2.2.7 Tratamento e prognóstico de neoplasias malignas de glândulas salivares

Apesar da ampla heterogeneidade dos subtipos histológicos e comportamento biológico distintos dos tumores de glândulas salivares, a excisão cirúrgica representa a opção padrão no tratamento de tumores ressecáveis provenientes de glândulas salivares. De acordo com a natureza do tumor e a localização, realiza-se a excisão parcial ou total da glândula salivar, com complemento ou não de radioterapia. Tumores superficiais da parótida requerem apenas ressecções parciais com conservação do nervo facial, enquanto que tumores extensos devem ser tratados com parotidectomias totais e/ou ampliadas com ressecção do facial quando envolvido (Lima et al., 2005).

Tumores de grandes dimensões, com alto grau de malignidade, margem cirúrgica comprometida ou exígua e presença de infiltração linfática peritumoral requerem radioterapia pós-operatória (Magrin et al., 2006). Para os pacientes com doença recorrente não favorável a tratamento local adicional ou aqueles com metástase à distância, o tratamento quimioterápico sistêmico é a opção. Cisplatina, fluorouracil, ciclofosfamida e doxorrubicina são os principais componentes ativos, podendo-se utilizar combinações (Kies et al., 2006).

Ao longo das últimas três décadas, diversos fatores prognósticos têm sido sugeridos e relacionados ao desenvolvimento de metástases em neoplasias de glândulas salivares, dentre eles: tipo histológico, graduação, comprometimento de margens, invasão perineural, metástase loco regional e idade (Spiro et al., 1992; Van der Poorten et al., 1999; Mariano et al., 2011).

Lima et al. (2005) avaliaram fatores prognósticos clínicos em 126 pacientes portadores de neoplasias malignas em parótida, cuja terapia adotada fora excisão cirúrgica e/ou radioterapia. Vinte e cinco (25) pacientes evoluíram com recidiva tumoral (19,7%), 17 apresentaram recorrência local (13,5%), 4 loco regional (3,1%) e 4 regional (3,1%). Na análise multivariada, os fatores relacionados à pior evolução foram: grau histológico, estadiamento T e estadiamento clínico.

Walhberg et al. (2002), em uma análise de sobrevida de 2.465 pacientes apresentando carcinomas em glândulas parótidas ou submandibular, observaram maior sobrevida em 10 anos em indivíduos portadores de carcinoma de células acinares (88%), seguido de carcinoma mucoepidermoide (80%) e carcinoma adenoide cístico (74%). O pior prognóstico foi observado em casos de carcinoma indiferenciado (44% de sobrevida em 10 anos). Não houve diferença significativa em relação às topografias. Quanto ao fator idade, os tipos histológicos cuja taxa de sobrevida em pacientes com menos de 50 anos mostrou-se melhor foram carcinoma epidermoide e Adenocarcinoma.

Régis De Brito Santos et al. (2001) estudaram os fatores de predição para metástases cervicais em pacientes com neoplasias malignas em parótida tratados por cirurgia: observaram que os tipos histológicos carcinoma mucoepidermoide de alto grau e adenocarcinoma, carcinoma indiferenciado, estágio T (T3 e T4) e desmoplasia intensa foram fatores associados ao aumento do risco para ocorrência de metástases em linfonodos regionais. A taxa de metástases ocultas foi de 22,2% em pacientes com tumor em estágio T3 e T4. Houve recorrência local em 20

pacientes (13,8%) e recorrência regional homolateral em 9 (6,2%) em um intervalo de 34 a 153 meses. A recorrência cervical contralateral surgiu em apenas 3 casos (2%) e 17 pacientes (11,7%) apresentaram metástases à distância.

O curso clínico de tais neoplasias, geralmente, mostra-se insidioso, determinando a real necessidade de acompanhamento médico periódico.

2.3 Metástase

2.3.1 Aspectos clínicos e histopatológicos de neoplasias de glândulas salivares metastáticas

Atualmente, diversos estudos concentram-se no objetivo de avaliar os fatores correlacionados à biologia comportamental das neoplasias malignas primárias de glândulas salivares e, conseqüentemente, aos preditivos de agressividade e disseminação tumoral; não obstante, devido à dificuldade que permeia a metodologia de obtenção de suas respectivas metástases e a raridade dos casos, tais números descendem drasticamente.

Segundo Bradley (2001), o desenvolvimento de metástases à distância provenientes de tumores primários de glândulas salivares está diretamente associado ao tipo histológico e localização tumoral, sendo mais comumente relacionado ao carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucoepidermoide de alto grau, carcinoma de ducto salivar e tumores localizados na glândula submandibular, base de língua e região faringiana. Aqueles que não apresentam recorrências locorregionais têm o mesmo risco de evoluírem com doença metastática em comparação aos pacientes diagnosticados com reincidências tumorais.

Os sítios metastáticos, à distância, mais acometidos por neoplasias malignas de glândulas salivares são: pulmões (80%), ossos (15%), fígado e outros sítios anatómicos (5%). Metástases cerebrais e renais são raramente reportadas na literatura (Dawson et al., 2006; Karatzas et al., 2011; Venteicher et al, 2013).

Metástases regionais e à distância no carcinoma mucoepidermoide (CME) afetam cerca de 3 a 15% e 6 a 15% dos pacientes, respectivamente (Nascimento et al., 1986; Bradley, 2001), e as taxas de sobrevida de cinco e dez anos, situam-se em torno de 60% e 40%, respectivamente (Okabe et al., 2001). Para o carcinoma adenoide cístico (CAC), a ocorrência de metástases regionais e à distância chegam a 47% e 50%; a sobrevida de cinco anos fica entre 45% a 80%, diminuindo para entre 22% e 44% em 10 anos (Spiro; Huvos, 1992). No adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG), as metástases regionais podem ocorrer em 9% dos casos, as metástases à distância são raras e o prognóstico parece relativamente bom, sendo que cerca de 80% dos pacientes ficam livres da doença após o tratamento (Bradley, 2001).

Em um estudo desenvolvido por Teo et al. (2000), observou-se que entre os pacientes com carcinomas de parótida que desenvolveram metástase à distância com e sem recorrência locorregional, o sítio metastático mais incidente foi o pulmão, seguido pelos ossos e fígado. Em quatro pacientes que desenvolveram metástase à distância, o intervalo de recorrência foi entre 0,24 e 6,48 meses depois do diagnóstico do tumor primário. A média do tempo de sobrevida depois do diagnóstico da metástase à distância foi de 21,8 meses (variou de 4,6-90) a despeito da baixa resposta à quimioterapia.

Dentre as abordagens utilizadas para a doença metastática dos tumores das glândulas salivares, a ressecção cirúrgica compreende a terapêutica de eleição quando o acesso à massa tumoral é favorável, complementando-se com radioterapia adjuvante. No entanto, a intervenção clínica-cirúrgica é considerada, ainda, como método paliativo em uma grande proporção dos casos. Poucos estudos realizados reportam uma similaridade nas taxas de sobrevida em pacientes submetidos à metastasectomia pulmonar de carcinoma adenoide cístico quando comparada àqueles que não sofreram ressecção cirúrgica. A espera clínica seria uma estratégia terapêutica de eleição em pacientes nos quais a doença se apresente assintomática e com um baixo grau de crescimento, e, desta forma, reservando a utilização de quimioterapia sistêmica em caso de sintomatologia e de rápida progressão, ou para situações em que, devido a complicações locais, não é possível a metastasectomia ou radioterapia local (Locati et al. 2005; Bobbio et al., 2008).

2.3.2 Processo metastático

As neoplasias malignas pertencem a um grupo amplamente complexo de doenças, sendo a carcinogênese um processo abstruso e dinâmico, o qual engloba múltiplas etapas, fenômenos e eventos mutacionais cumulativos que interagem entre si em resposta a um agente causal. Pode considerar-se que uma neoplasia maligna resulta de alterações genéticas e funcionais que influem profundamente no maquinário celular, alterando suas características de proliferação, controle e morte.

Dentre os inúmeros eventos que conferem às células neoplásicas habilidades que as tornam capazes de se desvencilhar de mecanismos antitumorais inatos do organismo e realizar expansão clonal, podemos citar: auto-suficiência de sinais proliferativos; mutações genéticas (translocações cromossomais; ativação de oncogenes; desregulação de genes supressores de tumores); redução da expressão de moléculas de adesão de superfície celular; alterações no citoesqueleto; síntese e resposta a crescimento autócrino e parácrino; escape dos mecanismos pró-apoptóticos; potencial replicativo ilimitado; transição epitélio-mesênquima (TEM); fatores de mobilidade; secreção de proteases; angiogênese sustentada; capacidade de invasão e disseminação à distância (metástases) (Petruscelli, 2001; Thompson; Newgreen, 2005; Gupta; Massague, 2006).

O repertório de eventos tumorigênicos abriga fatores de extrema relevância clínica a despeito do prognóstico de neoplasias malignas: o potencial invasor e a ocorrência de metástases. Sua ocorrência é a principal causa associada à mortalidade em pacientes oncológicos (Perret, 2007).

Metástases são definidas como a disseminação de células tumorais de um órgão ou parte dele para outros locais não diretamente conectados. A propagação tumoral poder-se-á ocorrer por intermédio de três vias possíveis: (i) invasão linfática ou hematogênica; (ii) cavidades corporais anatómicas, como, por exemplo, a disseminação de um carcinoma do ovário na cavidade peritoneal, e (iii) através da combinação das vias referidas, devido às inúmeras intercomunicações dos sistema linfático e hematogênico (Vermeulen *et al.*, 2002).

A cascata metastática é altamente dinâmica e interligada aos processos fisiológicos, iniciando-se com a ruptura da interação local intercelular, alterando a

membrana basal, invadindo e infiltrando o tecido circunvizinho, atingindo e penetrando o interior dos vasos sanguíneos ou linfáticos (intravasamento), com a consequente circulação das células neoplásicas isoladas ou agregadas pela corrente sanguínea. Nessa fase, a neoplasia é considerada uma doença sistêmica. O processo metastático continua com a sobrevivência na circulação, a detenção em terminações capilares de órgãos distantes, escape destes vasos (extravasamento), infiltração de tecido adjacente, para o estabelecimento e posterior desenvolvimento de tumores secundários (Perret, 2007).

Dentre as inúmeras alterações fenotípicas em neoplasias malignas, no que se concerne a tais mudanças arquiteturais, diversos estudos relatam a participação crucial do fenômeno de transição epitélio-mesênquima (TEM) na indução e/ou desenvolvimento de metástases (Thierry et al. 2009, Huang et al. 2008).

A transição epitélio-mesênquima ocorre regularmente no desenvolvimento embrionário, na diferenciação de múltiplos tecidos e órgãos, e na reparação tecidual. Adicionalmente, o fenômeno TEM participa de certas situações patológicas, inclusive durante o desenvolvimento do processo metastático (Thierry et al, 2009).

Durante a progressão de um tumor *in situ* para um carcinoma invasivo, as células epiteliais tumorais adquirem atributos remanescentes aos das células mesenquimais, facilitando o processo de invasão neoplásica. Ocorre a perda de polaridade celular e de proteínas epiteliais, como citoqueratinas, E-caderinas, ocludinas, claudinas e cateninas caracterizando o fenômeno TEM, com consequente perda da adesão celular e indução à invasão tecidual ou vascular (Gregory et al., 2008).

2.3.3 Filamentos intermediários

A maioria das células eucarióticas é provida de um sistema de proteínas integrantes do citoesqueleto, cuja função primária é de fornecer resistência mecânica e, diferentemente de outras proteínas, apresentam características específicas de acordo com a célula integrante, sendo, também, os elementos mais relacionados à diferenciação celular. Esse sistema é formado por três subunidades protéicas diferentes: os microfilamentos de actina (MA), os microtúbulos de tubulina

(MT), e os filamentos intermediários (FIs), constituídos por um grupo de proteínas fibrosas heterogêneas (Alberts et al., 2004; Silveira et al., 2002). Os microfilamentos apresentam de 4 a 6 nm de diâmetro e peso molecular em torno de 43 kD e os microtúbulos diâmetro entre 22 e 25 nm e peso molecular de cerca de 60 kD. Os filamentos intermediários apresentam diâmetro intermediário entre 7 e 11 nm, mas peso molecular extremamente variável, entre 40 e 200 kD (Moll et al., 1982; Berkovitz; Barret, 1998; Silveira et al., 2002).

Os filamentos intermediários encontrados em vários tecidos são divididos em:

- **Tipo I:** citoqueratinas ácidas (tecidos epiteliais);
- **Tipo II:** citoqueratinas neutro-básicas (tecidos epiteliais);
- **Tipo III:** vimentina (células mesenquimais), desmina (células miogênicas), proteína glial ácida fibrilar (células gliais e astrócitos), periferina (neurônios);
- **Tipo IV:** neurofilamentos (neurônios), α -internexina (neurônios pré-natais);
- **Tipo V:** lamininas nucleares (lâmina nuclear das células eucarióticas);
- **Tipo VI:** nestina (células tronco neuroepiteliais).

Cada tipo celular apresenta FIs de um determinado grupo e, dessa forma, com o uso de anticorpos específicos para filamentos intermediários, podemos identificar uma célula neoplásica quanto à sua origem (Cheville et al., 2000).

A distribuição e peso molecular dos FIs de interesse em região de cabeça e pescoço podem ser observados na tabela 2.1

Tabela 2.1 - Filamentos intermediários – expressão em tecidos normais e em neoplasias

FILAMENTO INTERMEDIÁRIO	PESO MOLECULAR	TECIDOS NORMAIS	NEOPLASIAS
Vimentina	58 kD	Células mesenquimais	Sarcomas
CK	40-68 kD	Células epiteliais	Carcinomas
Neurofilamentos	68, 160, 200 kD	Neurônios	Ganglioneuromas
GFAP	5 kD	Células gliais Epêndima	Astrocitomas Ependimomas
Desmina	55 kD	Miócitos	Rabdomiossarcoma Leiomiiossarcoma

CK – Citoqueratina; GFAP – Proteína ácida fibrilar glial.

2.3.4 Citoqueratinas (CKs)

As citoqueratinas (CKs) constituem o maior grupo de filamentos intermediários, sendo as principais e mais abundantes proteínas estruturais encontradas nas células epiteliais (epitélio simples, estratificado, queratinizado e camada córnea. Representam, em humanos, aproximadamente 75% de todos os filamentos intermediários do citoesqueleto protéico – a maior parte das proteínas epiteliais – e são essenciais ao desenvolvimento e diferenciação das células epiteliais. Apresentam especificidade tecidual, o que confere a cada epitélio um padrão característico de expressão de CKs (Alberts et al., 2004).

Em contraste com os outros FIs que são compostos por apenas uma subunidade de proteína, as CKs constituem uma família complexa de polipeptídios

onde há semelhança bioquímica e imunológica entre os diversos tipos de epitélios. Uma única célula epitelial é capaz de sintetizar uma grande variedade de CKs que podem copolimerizar a fim de formar um único sistema de filamentos (Moll et al., 1982; Alberts et al., 2004).

São encontradas em tipos distintos de células epiteliais, presentes tanto em populações normais como neoplásicas. Estruturalmente, os filamentos de citoqueratinas estendem-se do limite nuclear à periferia celular, formando uma rede complexa e extensa que interage com a membrana plasmática, relacionando-se com desmossomos e hemidesmossomos (Chu; Weiss, 2002; Alberts et al., 2004).

Atualmente, são conhecidos 54 subtipos diferentes de CKs, que são classificadas de acordo com o seu peso molecular, o qual varia entre 40 e 70 kD; sua composição acídica ou básica, com pH variando entre 4,9 e 7,8; e seu ponto isoelétrico (Berkovitz; Barret, 1998; Silveira et al., 2002; Chu; Weiss, 2002). Assim, de acordo com o peso molecular, o pH e a presença de determinantes antigênicos, as CKs são divididas em dois tipos: ácidas ou tipo I, que são numeradas de K9-K20; e neutras ou básicas ou tipo II, numeradas de K1-K8 (Silveira et al., 2002).

Na maioria dos casos, uma subunidade de CK de baixo peso molecular se pareia com uma de alto peso molecular, assim como uma subunidade acídica irá se parear com uma básica; o componente básico de cada par é sempre cerca de 8 kD maior que o acídico, com relação molar de 1:1. Os pares são assim organizados: CKs 1/10, CKs 3/12, CKs 4/13, CKs 5/14, CKs 6/16 ou 6/17, CKs 7/19 e CKs 8/18. Ao menos, um par de cada subfamília é co-expresso em um determinado tecido epitelial (Chu; Weiss, 2002; Kirfel et al., 2003). Outras CKs são conhecidas e específicas do folículo piloso e fibra capilar, tais como CK25/28, CK31/40.

A distribuição das CKs pode ser observada na tabela 2.2

Tabela 2.2 – Expressão de ck em tecidos normais

CK/PAREAMENTO	TECIDOS NORMAIS
CK1/10	Queratinócitos
CK2/11	Queratinócitos
CK3/12	Camada córnea
CK4/13	Mucosa, epitélio estratificado
CK5/14	Queratinócitos, células mioepiteliais do epitélio glandular
CK6/16	Epiderme, epitélio estratificado não-queratinizado, unha, células luminais ductais das glândulas sudoríparas écrinas
CK7/19	Epitélio simples, células do trato intestinal e mesotelial, epitélio pseudoestratificado, urotélio.
CK8/18	Hepatócitos, células acinares pancreáticas, células tubulares renais, epitélio pseudoestratificado, epitélio glandular, urotélio
CK9	Queratinócitos
CK17	Camada basal, células mioepiteliais (expressão induzida após injúria)
CK20	Epitélio gastrointestinal, urotélio, Células de Merkel

Chu e Weiss (2002), Kirfel et al. (2003) e Karatzas et al. (2011)

A expressão de CKs varia entre os epitélios em seus diferentes estágios de desenvolvimento, durante o seu curso terminal de diferenciação e, eventualmente, pode ser característica a diferentes tecidos epiteliais, podendo funcionar como forma de classificação epitelial (Lourenço et al., 2008). Ainda, durante a transformação maligna do tecido epitelial, o padrão de expressão das CKs costuma ser mantido, podendo ser de utilidade diagnóstica. A maioria das diferenças encontradas pode ser explicada pela composição celular mais complexa da lesão maligna. Dessa forma, a análise imunoistoquímica da expressão de CKs pode ser considerada uma ferramenta útil na identificação e diferenciação dos diversos tipos epiteliais e suas origens, assim como na distinção de diferentes tipos celulares dentro de um mesmo tecido (Chu & Weiss, 2002; Nikitakis et al., 2004).

2.3.5 Expressão de citoqueratinas na mucosa normal dos tecidos bucais

De acordo com Silveira et al. (2002), a mucosa da cavidade bucal, constituída por epitélio pavimentoso estratificado, pode ser dividida em:

- **Tipo I:** correspondente à mucosa superficial ou de revestimento não-queratinizada;
- **Tipo II:** mucosa mastigatória queratinizada do palato duro e gengiva;
- **Tipo III:** mucosa especializada da superfície dorsal da língua em seus 2/3 anteriores.

A mucosa estratificada não-queratinizada expressa as CKs 4 e 13, respeitando a expressão encontrada em outros epitélios semelhantes. As áreas de epitélio queratinizado adicionam a expressão das CKs 1, 10 e 11. A camada basal de todos os queratinócitos expressa as CKs 5 e 14, e em menor proporção a CK19. As CKs de epitélio simples, 7, 8, 18 e 19, usualmente não são expressas neste epitélio (Silveira et al., 2002).

O resumo do padrão de expressão de CKs no epitélio da cavidade bucal, assim como a sua distribuição, encontra-se descrito na tabela 2.3.

Tabela 2.3 - Expressão de citoqueratinas (CKs) no epitélio oral normal.

CKs	EPITÉLIO	EXPRESSÃO POSITIVA
CK1	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK2	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK3	Epitélio estratificado queratinizado	Ausente na cavidade oral
CK4	Epitélio estratificado queratinizado	Epitélio sulcular e mucosa jugal
CK5	Epitélio estratificado queratinizado (queratinócitos suprabasais)	Camada basal de todos queratinócitos
CK6	Epitélio estratificado não-queratinizado	Papilas filiformes, mucosa oral e glândulas salivares
CK7	Epitélio simples	Botões gustatórios, células de Merkel e glândulas salivares
CK8	Epitélio simples	Botões gustatórios, células de Merkel e glândulas salivares e palato mole
CK9	Epitélio estratificado queratinizado	Ausente na cavidade oral
CK10	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK11	Epitélio estratificado queratinizado	Palato duro e gengiva
CK12	Epitélio estratificado queratinizado	Ausente na cavidade oral
CK13	Epitélio estratificado não-queratinizado	Epitélio sulcular, mucosa jugal e glândulas salivares
CK14	Epitélio estratificado queratinizado e não-queratinizado	Camada basal de todos os queratinócitos e glândulas salivares
CK15	Epitélio escamoso estratificado	Inconstante na cavidade oral
CK16	Epitélio estratificado não-queratinizado	Glândulas salivares
CK17	Epitélio estratificado não-queratinizado	Glândulas salivares
CK18	Epitélio simples	Palato mole, células de Merkel e glândulas salivares
CK19	Epitélio simples e camada basal de epitélio estratificado não-queratinizado	Palato mole, células de Merkel, botões gustatórios e glândulas salivares
CK20	Epitélio simples	Células de Merkel e botões gustatórios

A expressão de CKs no epitélio glandular é mais complexa e variável de acordo com o tipo de estrutura epitelial presente, encontrando-se resumida na tabela 2.4

Tabela 2.4 - Expressão de citoqueratinas (CKs) no epitélio de glândulas salivares normais

EPITÉLIO GLANDULAR	EXPRESSÃO POSITIVA
Ácinos	CKs 8 e 18
Células basais	CKs 5, 7, 14 e 19
Células mioepiteliais	CKs 4, 5, 6, 13, 14, 16, 17 e 19
Ductos intercalados e estriados	CKs 7, 8, 18 e 19
Ductos excretorios	CKs 4, 5, 6, 7, 8, 13, 14, 16, 17, 18 e 19

Berkovitz e Barret (1998) e Araujo e Sousa (1996)

Em relação à expressão de CKs em neoplasias primárias de glândulas salivares, Schwarz et al. (2011) analisaram características acerca da heterogeneidade morfológica de 14 casos de carcinoma adenoide cístico (CAC) e 8 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau (APBG). Após análise imunoistoquímica com citoqueratinas (CK 5 e CK7), notou-se variabilidade na imunoexpressividade de células neoplásicas entre os diferentes tumores e dentro da mesma massa tumoral. CAC demonstrou distribuição homogênea na expressão positiva de CK5/CK7 em células luminais, em contraste ao apresentado em APBG, no qual fora evidenciado marcação fraca ou ausente de CK5, e expressão difusa e intensa de CK7 nas células luminais.

Nikitakis et al. (2004) avaliou a expressão de CK7 e CK20 em 84 neoplasias malignas de glândulas salivares, sendo 26 casos de CME, 25 CAC, 11 APBG, 8 carcinoma de ductos salivares, 4 carcinomas de células acinares, 3 adenocarcinomas SOE, 2 carcinomas indiferenciados e 2 carcinomas de células basais. Imunorreatividade positiva para CK7 fora evidente em todas as neoplasias, apesar do padrão variável de intensidade da marcação. Ressaltou-se o padrão em certos tipos histológicos, como o CAC, no qual há preponderância de células luminais. Em contrapartida, 92.9% dos tumores foram negativos para CK20.

Foschini et al. (2002) realizou análise imunoistoquímica para as CKs 7, 8, 14, 17, 19 e 20 em carcinomas mucoepidermóides de baixo grau de malignidade. Em relação à expressão das citoqueratinas estudadas, quase todas as CKs apresentaram graduações variadas, com exceção da CK 20, a qual foi negativa na maioria dos casos, demonstrando que cada tipo celular, individualmente, apresentou um padrão específico. As células basais apresentaram positividade para as CKs 14 e 17, e focalmente para a CK 8. As células intermediárias, correspondentes ao maior componente celular das lesões de CME, apresentaram uma ampla variedade de expressão com positividade para as CKs 7, 8, 17 e 19, focalmente para a CK 14, e, raramente, para a CK 20. As células escamosas apresentaram positividade apenas para as CKs consideradas de alto peso molecular, 14 e 17, enquanto que as células mucosas apenas as apresentaram para as CKs de baixo peso molecular: 7, 8 e 19. As células colunares mostraram imunopositividade semelhante às intermediárias, ou seja, para as CKs de alto e baixo peso molecular, CKs 7, 8, 17 e 19, focalmente para a CK14 e raramente para a CK20.

A expressão de antígenos epiteliais como as CKs em neoplasias de glândulas salivares, bem como a gama diversificada de marcadores tumorais têm sido frequentemente estudados até o momento; não obstante, não há avaliação específica do padrão fenotípico de citoqueratinas nas neoplasias metastáticas de glândulas salivares. O entendimento desse aspecto pode gerar novas informações sobre o comportamento tumoral levando a análises mais precisas de seus aspectos. Essa é a proposta desta pesquisa.

3 PROPOSIÇÃO

3.1 Objetivos gerais

O objetivo deste estudo é identificar alterações fenotípicas comparativas entre os tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares, tratados no Hospital A.C. Camargo, São Paulo - Brasil, com o intuito de identificar fatores de risco associados, ou não, ao potencial metastático à distância e sua importância prognóstica.

3.2 Objetivos específicos

1. Analisar a casuística e estratificar os aspectos clínico-patológicos de neoplasias de glândulas salivares metastáticas do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center – São Paulo, Brasil;
2. Estudar os aspectos morfológicos das neoplasias primárias de glândulas salivares e suas metástases;
3. Estudar, por meio da técnica de imunoistoquímica, a expressão de citoqueratinas nas neoplasias primárias de glândulas salivares e de suas metástases.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Aspectos éticos

Para a execução deste trabalho, a pesquisa foi submetida e aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (CEP-FOUSP). O certificado de aprovação encontra-se anexado ao final deste projeto, sob o protocolo de número 166.130 (Anexo A).

4.2. Seleção dos casos

Foram pesquisadas as ocorrências de neoplasias de glândulas salivares com registro de metástase diagnosticadas e tratadas no A.C. Camargo Câncer Center, localizado na cidade de São Paulo (SP), durante o período de janeiro de 1970 a dezembro de 2010. O levantamento de dados ocorreu, inicialmente, por meio de leitura individualizada dos livros-laudo armazenados no acervo do Departamento de Anatomia Patológica da mesma Instituição. Baseando-se nos registros dos laudos de neoplasias epiteliais malignas de glândulas salivares com confirmação de metástases à distância, fora realizada pesquisa ativa dos prontuários correspondentes.

4.3 Critérios de inclusão

Foram selecionados e incluídos casos consecutivos diagnosticados como neoplasias malignas de glândulas salivares com ocorrência de metástase que continham:

1. Presença de todos os dados sócio-demográficos e clínico-patológicos supracitados;
2. Comprovação de metástases regionais ou distantes a partir de exames de imagem obtidos por radiografia (RX), tomografia computadorizada (TC), ressonância magnética (RM), e/ou exame cito e histopatológico revelador do comprometimento linfonodal e/ou de outros órgãos;
3. Presença de material em quantidade suficiente para a realização das análises pretendidas.

4.4 Critérios de exclusão

1. Casos que apresentaram laudos de neoplasias das glândulas salivares, mas que não tinham comprovação clínica ou histopatológica de metástase;
2. Blocos com material insuficiente ou área não representativa do tumor.

4.5 Coleta de dados

Para este estudo, foram selecionados, inicialmente, 69 casos de tumores primários de glândulas salivares com metástase detectada, diagnosticados e tratados no A.C. Camargo Câncer Center, localizado na cidade de São Paulo (SP), durante o período de janeiro de 1970 a dezembro de 2010. O levantamento de dados ocorreu por meio de leitura individualizada dos livros-laudo armazenados no acervo do Departamento de Anatomia Patológica da mesma Instituição. Baseando-se nos registros dos laudos de neoplasias epiteliais malignas de glândulas salivares com confirmação de metástases à distância, fora realizada pesquisa ativa dos prontuários correspondentes.

Para o levantamento inicial, foram considerados os seguintes parâmetros:

1. A relação dos diferentes tipos histológicos dos tumores das glândulas salivares descritos pela Organização Mundial de Saúde (Evenson et al., 2005);
2. Termos descritores dos tipos de glândulas salivares maiores (parótidas, submandibulares, sublinguais);
3. Termos descritores de topografias das glândulas salivares menores (lábio, mucosa de bochecha, mucosa de sulco vestibular, trígono retromolar, palato, palato mole, assoalho bucal, língua).

Do montante inicial, 26 casos foram excluídos por não conterem os parâmetros estipulados no estudo.

Os casos utilizados foram reavaliados quanto ao diagnóstico histopatológico, tendo como base a classificação estabelecidos pela OMS (Barnes *et al.*, 2005) (tabela 4.1).

Tabela 4.1 - Divisão histológica dos tumores epiteliais malignos de glândulas salivares (Evenson et al., 2005)

<i>Classificação</i>	<i>Histológica</i>
Carcinoma mucoepidermoide	Carcinoma de pequenas células
Carcinoma adenoide cístico	Carcinoma mioepitelial
Carcinoma ex-adenoma pleomórfico	Carcinoma linfoepitelial
Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau	Carcinoma oncocítico
Adenocarcinoma de céls. Acinares	Carcinossarcoma
Adenocarcinoma sem outras especificações	Adenoma pleomórfico metastatizante
Adenocarcinoma de células basais	Linfoadenocarcinoma sebáceo
Cistadenocarcinoma	Adenocarcinoma de células claras
Carcinoma indiferenciado	Adenoma pleomórfico metastatizante
Carcinoma epitelial-mioepitelial	Carcinoma epidermoide
Carcinoma dos ductos salivares	Adenocarcinoma sebáceo

4.6 Padronização dos Fatores Prognósticos

Foram avaliados como fatores prognósticos: a idade, o sexo, dados clínico-patológicos dos tumores (tipo histológico, localização por segmento corporal, dimensão do tumor, comprometimento de margens cirúrgicas, a invasão vascular e invasão perineural) e terapia efetuada. Estes fatores foram relacionados com o desenvolvimento de metástases à distância e com a recidiva local do tumor.

A amostra total foi dividida em dois subgrupos:

- 1) Tumores com metástase detectada e com resgate da neoplasia secundária;
- 2) Tumores com metástase detectada, sem resgate da neoplasia secundária.

Foi realizada uma avaliação dos padrões de expressão imunoistoquímica de citoqueratinas comparativa entre fenótipo dos tumores primários com metástase detectada e tumores metastáticos resgatados.

4.7 Análise histopatológica

O material fora obtido a partir de blocos de parafina e, então processado por técnicas histopatológicas de rotina. Foram selecionadas lâminas de cortes de 5 µm de espessura, as quais foram coradas com Hematoxilina & Eosina e, posteriormente, analisadas para a confirmação diagnóstica de neoplasias epiteliais malignas de glândulas salivares, obedecendo aos critérios sugeridos pela Organização Mundial de Saúde.

Para a avaliação dos padrões de expressão antigênica das neoplasias do estudo, devido à idade e degradação dos espécimes, somente 10 casos apresentavam material suficiente e representativo para análise laboratorial. Foram incluídos 10 casos de carcinomas adenoides císticos primários, e 10 casos de CACs metastáticos, sendo 4 pertencentes ao mesmo paciente (casos pareados).

4.8 Técnica de imunoistoquímica

Cortes histológicos de 3µm de espessura foram colhidos em lâminas previamente silanizadas. A seguir, foram desparafinizados em dois banhos sequenciais de xilol, com duração de 10 minutos cada em temperatura ambiente, sendo, posteriormente, hidratados em sequência descendente de etanol (100%, 90%, 70% e 50% respectivamente) e lavados em água corrente e destilada durante 5 minutos.

Após a lavagem em água corrente, realizou-se incubação do material em solução de peróxido de hidrogênio a 10%, durante o período de 25 minutos, em 5 banhos de 5 minutos cada, com o intuito de se bloquear a ação da peroxidase endógena tecidual e repetida a lavagem com água corrente e água destilada.

Em seguida, fora realizada recuperação dos epítomos antigênicos com solução de ácido cítrico monohidratado (10mM) em água destilada (pH 6,0), a 25°C e, então, os cortes foram incubados com o anticorpo primário diluído em solução de 1% BSA (bovine serum albumin - Sigma) em TRIS pH 7,4 em dois ciclos de 10

minutos aquecidos em forno de micro-ondas, a fim de se bloquear reações do soro primário com proteínas inespecíficas teciduais. Os anticorpos primários, as especificações e titulações empregadas encontram-se descritos na tabela 4.2

Tabela 4.2 - Anticorpos primários, clones, fabricantes e diluições empregados na análise imunoisto-Química

<i>Soro primário</i>	<i>Clone</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Título</i>	<i>Recuperação Antigênica</i>
CK5	AB24647	AbCAM	1:50	Citrato pH 6,0
CK7	RCK105	AbCAM	1:50	Citrato pH 6,0
CK8	35bH11	AbCAM	1:50	Citrato pH 6,0
CK14	LL002	AbCAM	1:50	Citrato pH 6,0
CK18	C-04	AbCAM	1:50	Citrato pH 6,0
CK19	A53-B/A2	AbCAM	1:50	Citrato pH 6,0

Subsequentemente, aguardou-se o equilíbrio térmico e os procedimentos seguintes foram sempre precedidos de duas lavagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS pH 7,4, durante 5 minutos cada. Fora, então, realizada adição do anticorpo secundário, igualmente diluído em solução de BSA 1%. Os espécimes seguiram para 2 ciclos de lavagem com TRIS (5 minutos cada) e expostos ao sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (Strep AB Complex/HRP DUet, Mouse/Rabbit, Dabo, 1:500) por 15 minutos. Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador 3´3-diaminobenzidina (DAB, Sigma) permitindo a evidenciação da reação por meio de coloração castanha, e incubados em câmara seca, a 37°C, durante 5 minutos.

Os cortes foram novamente lavados em água corrente e água destilada e contra-corados com Hematoxilina de Mayer durante 10 minutos. Posteriormente, as lâminas foram desidratadas através de 2 banhos em solução de etanol a 100%, diafinizadas em xilol com 2 trocas de 10 minutos cada e, finalmente, montadas em Bálsamo do Canadá. Concomitantemente, controles histológicos (glândula salivar sadia) foram utilizados durante as reações supracitadas.

Todas as lâminas foram submetidas à revisão por dois avaliadores independentes, e, havendo discordância diagnóstica, foram reavaliadas ou, quando necessário, um terceiro avaliador foi solicitado para estabelecimento de um consenso.

Os dados foram fotografados pelo equipamento fotográfico digital Olympus Evolt E – 330 acoplado a microscópio óptico Olympus Cover – 018.

4.9 Análise qualitativa e semi-quantitativa da expressão antigênica tumoral

Os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2010), exportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA) e submetidos à estatística descritiva.

A análise qualitativa foi desenvolvida a partir da observação e construção de índices do padrão de expressão antigênica pesquisados por microscópio óptico (Olympus Cover – 018). A expressão das CKs foi classificada baseando-se na média de células coradas em 10 diferentes campos de ampliação de 400x (área de campo 0,2mm²) de cada espécime, sob microscópio de luz visível. Os critérios de classificação qualitativa foram estabelecidos por intermédio de um índice obtido para a expressão imunoistoquímica, determinados por 3 patologistas. Foram considerados:

- **Negativo** – incluindo até 5% de positividade das células neoplásicas;
- **Positivo** – acima de 5% de positividade das células neoplásicas.

A análise semi-quantitativa baseou-se na avaliação da intensidade predominante nos tumores, classificando-os em três categorias:

1. Fraca;
2. Moderada;
3. Intensa.

Utilizando-se a objetiva de 200X, estimou-se o percentual de células tumorais expressas, categorizando-o nos seguintes intervalos: 0 a 19% (0), 20 a 39% (1), 40 a 59% (2) e 60 a 100% (3). A partir da imunopositividade avaliada, foi possível traduzir três categorias semi-quantitativas de expressão antigênica: **1-2**: expressão fraca; **3-4**: expressão moderada e **5-6**: expressão intensa.

5 RESULTADOS

5.1 Características sócio-demográficas da amostra

Foram analisados 43 pacientes diagnosticados com neoplasias malignas metastáticas de glândulas salivares, sendo que destes, 26 pacientes (59.5%) pertenciam ao gênero feminino e 17 (40.4%) masculino.

Doze pacientes foram excluídos do estudo pelas seguintes razões: prontuários incompletos, perda de segmento clínico.

Gráfico 5.1 - Distribuição das neoplasias metastáticas de glândulas salivares segundo o gênero

A idade variou de 13 a 72 anos, com média de 42.5 anos. Trinta e dois (74.4%) pacientes se auto-declararam leucoderma e onze (25.5%) pacientes não-melanoderma.

5.2 Localização tumoral das neoplasias primárias

A glândula parótida representou o sítio anatômico mais acometido em 23 casos (53.4%), seguido de 9 casos (20.9%) oriundos da glândula submandibular, 9 (20.9%) casos diagnosticados em glândulas salivares menores em região de palato e 2 (6.9%) casos ocorreram em glândula sublingual.

Gráfico 5.1 - Distribuição da localização anatômica das neoplasias primárias de glândulas salivares

5.3 Características clínico-histopatológicas do tumor primário

O tipo histológico correspondente ao tumor primário mais frequente fora o carcinoma adenoide cístico (CAC), totalizando 29 (67.4%) casos, sendo 55.1% mulheres e 44.8% homens, com uma idade média de 49 anos. O segundo tumor mais incidente observado foi adenocarcinoma (ADENOCA), abrangendo 8 (18.6%) casos, 71,4% indivíduos do gênero feminino e 28,5% masculino, com a média de idade apresentada de 39.5 anos. Em sequência, fora o carcinoma mucoepidermoide (CME), totalizando 4 (9.3%) casos e, destes, 75% indivíduos do gênero feminino e 25% masculino, com a média de idade de 37.5 anos de idade. Subsequentemente, o carcinoma ex-adenoma pleomórfico acometendo 2 (4.65%) casos, sendo 1 (50%) mulher e 1 (50%) homem, com idade média correspondendo a 47 anos. Aspectos histológicos ilustrativos dos casos analisados podem ser vistos nas Figuras 3 e 4.

Gráfico 5.2 - Distribuição dos tipos histológicos de neoplasias primárias de glândulas salivares

Tabela 5.1 - Distribuição das neoplasias malignas metastáticas de origem epitelial da amostra estudada, provenientes do A.C. Camargo Câncer Center, diagnosticadas e tratadas no período de 1970 a 2010, de acordo com sua natureza histológica e principais dados sócio-demográficos e clínicos

<i>Diagnóstico</i>	<i>n</i>	<i>Homem</i>	<i>Mulher</i>	<i>Faixa etária</i>
CAC	29	13 (44,8%)	16 (55,1%)	28-70
ADENOCA	8	2 (25%)	6 (75%)	16-63
CME	4	1 (25%)	3 (75%)	13-62
CA ex-AP	2	1 (50%)	1 (50%)	22-72
Total	43 (100%)	17 (40.4%)	25 (59.5%)	42.5 (média)

CAC – Carcinoma adenoide cístico; **CME** – Carcinoma mucoepidermoide; **Ca ex-AP** - Carcinoma ex-adenoma pleomórfico; **ADENOCA** – Adenocarcinoma.

Das 29 neoplasias diagnosticadas como CAC, 11 (37.9%) eram originárias da glândula parótida, 9 (31%) casos provenientes das glândulas salivares menores da região de palato, 8 (27,5%) tumores presentes em glândula submandibular e 1 (3,4%) caso oriundo de glândula sublingual.

Gráfico 5.3 - Distribuição de Carcinoma adenoide cístico quanto à localização

Tabela 5.2 - Distribuição das neoplasias malignas primárias de origem epitelial selecionadas para compor a amostra, provenientes do A.C. Camargo Cancer Center, diagnosticadas e tratadas no período de 1970 a 2010, segundo: tipos histológicos e localização do tumor primário

<i>Neoplasia</i>	<i>N</i>	<i>Parótida</i>	<i>Menores</i>	<i>Submandibular</i>	<i>Sublingual</i>
CAC	29	11 (37.9%)	9 (31%)	8 (27.5%)	1 (3.4%)
ADENOCA	8	8 (100%)	0	0	0
CME	4	3 (%)	0	0	1
CA ex-AP	2	1 (50%)	0	1 (50%)	0
Total	43	23	9 (20.9%)	9 (20.9%)	2 (6.9%)

Ainda em relação ao CAC, o padrão histológico mais incidente foi o misto (cribriforme e tubular), englobando 15 (51.7%) casos, seguido por 9 (31%) tumores de padrão cribriforme e 5 (17.2%) sólidos.

Padrão histológico CAC

Gráfico 5.4 - Distribuição de Carcinoma adenoide cístico quanto ao padrão histológico

Adenocarcinoma correspondeu ao segundo tipo histológico mais frequente, sendo observado em 8 (18.6%) casos, e, dentre os subtipos histológicos compreendeu 3 (37.5%) o subtipo polimorfo de baixo grau (APBG), 2 casos pertencentes à variante de ductos salivares (25%), 1 (12.5%) à variante de células claras, 1 (12.5%) carcinoma de células acinares e 1 (12.5%) adenocarcinoma indiferenciado.

Gráfico 5.5 Distribuição de Adenocarcinomas quanto às variantes histológicas

5.3.1 Dimensões clínicas

As dimensões clínicas dos tumores variaram entre 1 a 12 cm, com uma média de 5,0 cm. Dezesesseis (37.2%) pacientes apresentaram massas tumorais $\leq 2,0$ cm, treze (30.2%) pacientes apresentaram tumor entre 2,1 a 4,0 cm de diâmetro e treze (30.2%) apresentaram tumor $\geq 4,0$ cm de diâmetro.

Dimensões tumorais

Gráfico 5.6 - Distribuição do número de pacientes quanto às dimensões tumorais

5.3.2 Margem cirúrgica

A partir da análise microscópica concernente à margem da ressecção cirúrgica tumoral, vinte e cinco (58.1%) pacientes apresentaram acometimento das margens. O tipo histológico mais acometido fora o CAC, o qual envolveu 9 (36%) casos, seguido de 5 (20%) casos de adenocarcinoma e 3 (12%) casos de CME. Todos pacientes diagnosticados com Carcinoma ex-adenoma pleomórfico apresentaram margens cirúrgicas livres de neoplasia.

Gráfico 5.8 – Distribuição das neoplasias de glândulas salivares quanto ao acometimento de margens cirúrgicas

5.3.3 Invasão vascular

Evidenciou-se invasão angiolinfática em 10 (23.2%) pacientes, sendo 8 (80%) diagnosticados com CAC, 1 (10%) portador de CME e 1 (10%) com adenocarcinoma, variante de ductos salivares. Invasão vascular linfática exclusiva fora observada em 6 (13.9%) pacientes, dos quais 2 (33.3%) foram diagnosticados com CAC, 2 (33.3%) pacientes com CME e 2 (33.3%) pacientes com adenocarcinoma (variantes de ductos salivares).

5.3.4 Invasão perineural

Em relação à presença de invasão perineural, fora observado o acometimento em 20 (46.5%) casos de neoplasias primárias, sendo o tipo histológico CAC o mais incidente, envolvendo 16 (37.2%) tumores, dois (4.65%) pacientes diagnosticados

com CME e dois (4.65%) casos de adenocarcinoma, sendo 1 (2.32%) a variante de ductos salivares e 1 (2.32%) adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

Invasão perineural

Gráfico 5.7 - Distribuição das neoplasias de glândulas salivares quanto à presença de invasão perineural

Figura 5.1 - Aspectos histopatológicos do carcinoma adenoide cístico

Figura 5.1 – Legendas:

A: Carcinoma adenoide cístico predominantemente do tipo tubular, com algumas estruturas cribriformes. Note as estruturas neoplásicas tubulares (ductiformes). (hematoxilina e eosina, aumento original X40)

B: Carcinoma adenoide cístico predominantemente do tipo tubular, com envolvimento de feixe neural. (hematoxilina e eosina, aumento original X100)

C e D: Carcinoma adenoide cístico do tipo cribriforme: note em D a formação de pseudocistos contendo material amorfo mucoide. (hematoxilina e eosina, aumento original X100 e X400, respectivamente)

E e F: Carcinoma adenoide cístico predominantemente do tipo sólido. Note em F pequenas aberturas lumbais de permeio aos blocos de células neoplásicas basaloides. (hematoxilina e eosina, aumento original X100 e X400, respectivamente)

Figura 5.2 - Padrões histológicos do carcinoma mucoepidermoide

Figura 5.2 - Legendas:

A e B: Carcinoma mucoepidermóide de baixo grau: note a predominância de células mucosas na composição do tumor. (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X400, respectivamente)

C e D: Carcinoma mucoepidermóide de grau intermediário: a neoplasia ilustrada mostra a presença de células mucosas intermediárias e escamosas. (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X400)

E e F: Carcinoma mucoepidermóide de alto grau: a neoplasia é composta predominantemente por células intermediárias e escamosas, sem queratinização. Apenas escassas células com citoplasma amplo (mucosas) são vistas. (hematoxilina e eosina, aumento original X40 e X400, respectivamente)

5.4 Metástases à distância

Dentre os pacientes diagnosticados com neoplasias de glândulas salivares que evoluíram com metástases à distância, 29 (67.4%) desenvolveram metástase em pulmão, sendo que destes, 4 (13.7%) também apresentaram metastatização em sistema nervoso central (SNC). Quatorze (32.5%) pacientes apresentaram metástase óssea, e 6 (13.9%) pacientes evoluíram com metástase hepática. Os aspectos histopatológicos das metástases estudadas foram ilustrados nas Figuras 5.3 e 5.4.

Gráfico 5.8 – Distribuição dos órgãos acometidos por metástase à distância em pacientes com neoplasias de glândulas salivares

Dezesseis (55.1%) pacientes evoluíram com metástase em mais de 1 órgão (doença plurimetastática), sendo o CAC o tipo histológico mais incidente (68.7%), seguido de CME em 4 (25%) pacientes e 1 (6.25%) caso de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

Metástases múltiplas - Tipos histológicos

Gráfico 5.9 - Distribuição da ocorrência de tipos histológicos em metástases múltiplas à distância em pacientes com neoplasias de glândulas salivares

Figura 5.3 - Aspectos histopatológicos de metástases de carcinoma adenóide cístico

Figura 5.3 – Legendas:

A e B: metástase pulmonar de carcinoma adenóide cístico. Note em A as ilhas de carcinoma adenóide cístico no centro do parênquima pulmonar e em B, a interface da neoplasia com a parede dos alvéolos pulmonares. (hematoxilina e eosina, aumento original X40 e X100, respectivamente)

C e D: metástase pulmonar de carcinoma adenóide cístico. Em C, notar a presença de ilha neoplásica cribriforme no interior de um bronquíolo, e em D, a presença da neoplasia no estroma pulmonar. (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X400, respectivamente)

E e F: ilhas metastáticas de carcinoma adenóide cístico ao redor de vaso sanguíneo e no interior do vaso no parênquima pulmonar. (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X400, respectivamente)

G e H: Carcinoma adenóide cístico metastático ao redor de feixe vâsculo nervoso e ilha neoplásica sólida com comedo necrose em H. (hematoxilina e eosina, aumento original X400 e X400, respectivamente)

Figura 5.4 - Aspectos histopatológicos de metástases de carcinoma mucoepidermoide e adenocarcinoma de ducto salivar

Figura 5.4 – Legendas:

A e B: metástase cerebral de carcinoma mucoepidermoide: notar a predominância de células mucosas na neoplasia metastática e o alto grau de pleomorfismo celular em B. (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X400, respectivamente)

C e D: metástase pulmonar de carcinoma mucoepidermoide. Notar a pouca diferenciação das células neoplásicas. (hematoxilina e eosina, aumento original X100 e X400, respectivamente)

F e G: metástase pulmonar de carcinoma de ducto salivar. Notar as estruturas típicas descritas como pontes romanas na estrutura da neoplasia metastática. (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X400, respectivamente)

5.5 Abordagem terapêutica das neoplasias metastáticas

Dentre os 43 pacientes analisados que evoluíram com neoplasias de glândulas salivares metastáticas, a conduta terapêutica mais utilizada foi a ressecção cirúrgica (metastasectomia), adotada em 30 (69.7%) casos, sendo a torocotomia e ressecção pulmonar em cunha a abordagem principal em 19 (44.1%) casos.

Trinta e cinco (81.3%) pacientes foram submetidos à Radioterapia, sendo em 30 (85.7%) casos empregada como complementação à cirurgia, e em 5 (14.3%) casos, adotada como modalidade isolada.

Quimioterapia fora realizada em 15 (34.8%) pacientes, sendo utilizada sempre em associação à outra modalidade terapêutica.

Dois (2.6%) pacientes foram tratados somente com cuidados paliativos e 2 (2.6%) não aceitaram nenhuma intervenção terapêutica e abandonaram o tratamento.

5.6 Status clínico na última informação

Ao final do presente estudo, 5 (11.6%) pacientes encontravam-se vivos, sem doença; 11 (25.5%) pacientes estavam vivos, com doença metastática remanescente; e 27 (62.7%) pacientes evoluíram ao óbito em decorrência à doença neoplásica.

Gráfico 5.12 – Distribuição dos pacientes que apresentaram neoplasias metastáticas de glândulas salivares quanto ao status clínico obtido na última informação colhida

5.7 Análise do padrão de expressão antigênica

Na análise do padrão de expressão antigênica dos espécimes representativos de cada caso incluído no estudo, de uma maneira geral, as neoplasias malignas de glândulas salivares revelaram um padrão fenotípico similar no tumor primário e no tumor metastático, apresentando imunopositividade pronunciada na maioria das CKs estudadas, variando de fraca a intensa, localizadas, majoritariamente, em células luminais de estruturas ductais.

A avaliação dos espécimes imunomarcados com citoqueratina (CK) 5 revelou expressão fraca em 6 (60%) casos e moderada em 4 (40%) casos de carcinomas adenoides císticos primários, evidenciado nos componentes celulares luminais. Em contrapartida, mostrou-se ausente em todos ($n = 10$) os espécimes metastáticos pulmonares (100%).

Citoqueratina 7 foi avaliada e expressa, principalmente, nas células luminais neoplásicas em 9 (90%) tumores primários. Em relação às metástases, manteve o mesmo perfil de imunoexpressividade positiva moderada para células luminais neoplásicas em 80% (8 casos), havendo ausência de expressão em áreas de invasão perivascular em 2 (20%) casos, e perda de imunomarcção em regiões próximas à estrutura pleural em 6 (60%) casos.

A análise de CKs 8 e 18 exibiu padrão similar à CK7, no qual houve positividade moderada para células luminais em 9 (90%) neoplasias primárias, e em 10%, notou-se expressão de fraca intensidade. Os tumores metastáticos foram evidenciados pela marcação moderada de componentes luminais nas áreas centrais do tumor em 90% dos casos (9 casos), e imunorreatividade negativa nas áreas tumorais periféricas, adjacentes ao parênquima pulmonar.

O padrão de marcação da CK14 revelou expressão moderada nas células luminais dos tumores primários em 7 (70%) casos e marcação fraca em 30%. A expressão imunoistoquímica do marcador nas metástases revelou positividade fraca em 40% dos casos, expressividade moderada nas células luminais de 60% dos espécimes (6 casos). Fora observado, inclusive, positividade moderada de estruturas tubulares em 3 (30%) casos, em 2 (20%) casos de áreas tumorais sólidas. Positividade fraca fora exibida em pneumócitos em 20% dos espécimes e perda de

marcação em áreas da periferia tumoral, correspondentes à transição com a pleura pulmonar em 8 (80%) casos.

Citoqueratina 19 fora evidenciada igualmente nos componentes luminais neoplásicos de tumores primários em 9 (90%) dos espécimes. As amostras metastáticas exibiram imunomarcação positiva em áreas periféricas transicionais com pneumócitos em 40% dos casos. Expressão moderada das células luminais em áreas centrais foi verificada em 8 (80%) casos.

Figura 5.5 – Análise comparativa da distribuição de CKs em CAC predominantemente tubular, primário de parótida e metastático pulmonar

Figura 5.5 – Legendas:

A1 e A2: Carcinoma adenoide cístico com predomínio de variante cribriforme (A1). Carcinoma adenoide cístico metastático em pulmão, com variante sólida predominante (A2) (hematoxilina e eosina, aumento original 400x).

B1 e B2: Imunoexpressividade positiva intensa de CK7 em células luminais neoplásicas (B1). Positividade moderada de CK7 em ilhas sólidas tumorais metastáticas em pulmão (B2) (aumento original 400x).

C1 e C2: Positividade moderada para CK 14 em componentes luminais e marcação fraca no citoplasma de células mioepiteliais neoplásicas (C1). Expressão positiva de CK14 em áreas isoladas de células neoplásicas metastáticas e perda de marcação em áreas da periferia tumoral, correspondentes à transição com a pleura pulmonar (C2) (aumento original 400x).

D1 e D2: Imunomarcação positiva de CK8/18 em células neoplásicas luminais do tumor primário (D1). Expressão moderada de CK8/18 em componentes luminais nas áreas centrais do tumor metastático e perda de imunorreatividade na periferia tumoral (D2) (aumento original 400x).

E1 e E2: Expressão positiva intensa de CK19 nos componentes luminais do CAC primário (E1). Positividade fraca de CK19 em áreas periféricas transicionais com pneumócitos (E2) (aumento original 400x).

Figura 5.6 - Exemplos da expressão de citoqueratinas em carcinoma adenóide cístico primário predominantemente cribriforme e metastático pulmonar

Figura 5.6 – Legendas:

A e B: Carcinoma adenoide cístico com predomínio de variante cribriforme (A). Carcinoma adenoide cístico metastático em pulmão, com aspecto cribriforme predominante (A2) (hematoxilina e eosina, aumento original X200 e X100).

C e D: Intensa expressão de CK7 em células luminais neoplásicas do tumor primário (C). Positividade intensa de CK7 nos pneumócitos que circundam as ilhas neoplásicas do pulmão e em células luminais neoplásicas (D) (aumento original X100 e X100, respectivamente).

E e F: Positividade moderada para CK 14 em componentes luminais e marcação fraca no citoplasma de células mioepiteliais neoplásicas (E). Expressão positiva de CK14 em áreas isoladas de células neoplásicas metastáticas e perda de marcação em áreas da periferia tumoral, correspondentes à transição com a pleura pulmonar (F) (aumento original X100 e X100, respectivamente).

G e H: Imunomarcação de CK8/18 em células neoplásicas luminais do tumor primário (G). Expressão moderada de CK8/18 em componentes luminais nas áreas centrais do tumor metastático e perda de imunorreatividade na periferia tumoral (H) (aumento original X100 e X100, respectivamente).

I e J: Expressão positiva intensa de CK19 nos componentes luminais do CAC primário (I). Positividade forte nas células luminais da neoplasia metastática e fraca em áreas periféricas transicionais com pneumócitos (J) (aumento original X200 e X200, respectivamente).

6 DISCUSSÃO

As neoplasias de glândulas salivares constituem uma vertente de tumores caracterizada pela ampla heterogeneidade em sua apresentação clínica, distinção histológica e comportamento biológico (Pinkston; Cole, 1999; Eveson et al., 2005). A série casuística do presente estudo analisou, inicialmente, 69 pacientes que desenvolveram doença metastática à distância proveniente de neoplasias primárias de glândulas salivares, sendo incluídos 43 pacientes que apresentaram os parâmetros estipulados pelo estudo. A idade dos pacientes do referido trabalho variou entre 13 a 72 anos, com média de 42.5 anos. Esse dado encontra-se em conformidade com a literatura, a qual relata picos de prevalência entre a 4ª década de vida (Walhberg et al., 2002; Evenson et al., 2005). Apesar de não haver um consenso na literatura quanto à predileção por gênero, nosso estudo avaliou o predomínio de indivíduos do sexo feminino em 59.5% (26 pacientes), frente a 17 (40.4%) homens.

No que se concerne à localização tumoral das neoplasias malignas primárias de glândulas salivares, no presente estudo observou-se a maior incidência em glândula parótida (53.4%), seguido de 9 casos (20.9%) oriundos da glândula submandibular, 9 (20.9%) casos diagnosticados em glândulas salivares menores em região de palato e somente 2 (6.9%) casos provenientes da glândula sublingual. Dados estes que encontram-se àqueles descritos na literatura (Nagler; Laufer, 1997; Nikitakis et al., 2004).

Corroborando a associação entre a frequência dos tipos histológicos das neoplasias malignas das glândulas salivares, o tipo histológico correspondente ao tumor primário mais frequente reportado trata-se do carcinoma mucoepidermoide (CME), seguido do carcinoma adenoide cístico (CAC) (Guntinas-Lichius et al., 2004). Em contrapartida ao exposto na literatura, em nosso estudo evidenciamos o carcinoma adenoide cístico (CAC) como tumor mais incidente, totalizando 29 (67.4%) casos, sendo 55.1% mulheres e 44.8% homens, com uma idade média de 49 anos. O segundo tumor mais frequentemente observado foi o adenocarcinoma (ADENOCA), abrangendo 8 (18.6%) casos, 71,4% indivíduos do gênero feminino e 28,5% masculino, com a média de idade apresentada de 39.5 anos. E, em terceiro

lugar, o carcinoma mucoepidermoide (CME), totalizando 4 (9.3%) casos e, destes, 75% indivíduos do gênero feminino e 25% masculino, com a média de idade de 37.5 anos de idade.

Um dos aspectos notórios em relação às características comportamentais de neoplasias mais agressivas – acarretando diretamente a um pior prognóstico – ressalta-se o neurotropismo que certos tumores, como o carcinoma adenoide cístico, apresentam (Barnes et al., 2005). Evidenciamos a presença de invasão perineural em 46.5% (20) dos casos de neoplasias primárias, sendo o tipo histológico CAC o mais incidente, envolvendo 16 (37.2%) tumores, dois (4.65%) pacientes diagnosticados com CME e dois (4.65%) casos de adenocarcinoma, sendo 1 (2.32%) a variante de ductos salivares e 1 (2.32%) adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

A suscetibilidade para o desenvolvimento de metástases à distância em neoplasias de glândulas salivares correlaciona-se, preponderantemente, a alguns fatores de caráter incisivo, tais como: diagnóstico precoce, tipo histológico, estadiamento tumoral e localização do tumor primário. No presente estudo, uma análise da casuística de um centro oncológico fora realizada abrangendo o período de 3 décadas (1970 a 2010), sendo observados 69 casos de tumores primários de glândulas salivares com metástase detectada. Em uma revisão da literatura (Garden et al., 1994), 8.1% de 835 pacientes com neoplasias de glândulas salivares menores evoluíram com metástases à distância; não obstante, disseminações neoplásicas à distância detectadas no momento do diagnóstico inicial também devem ser consideradas.

A diversidade histológica de algumas neoplasias corresponde a um fator notório na predição do risco de metástases. Alguns estudos (Bradley, 2001; Vermeulen et al., 2002) avaliaram a associação do desenvolvimento de metástases à distância em pacientes portadores de neoplasias de glândulas salivares, estando diretamente relacionada ao tipo histológico, sendo o carcinoma adenoide cístico o mais comumente reportado, seguido pelo carcinoma mucoepidermoide de alto grau, carcinoma de ducto salivar. Em nossa casuística, os tipos histológicos mais incidentes e envolvidos com maior risco de desenvolvimento de metástases compreenderam: CAC (67.4%), ADENOCA (18.6%), CME (9.3%) e CaExAP (4.65%). Alguns sítios anatômicos são, também, mais frequentemente relacionados

à disseminação tumoral à distância. Paciente com carcinomas de glândulas salivares maiores e menores possuem uma incidência de metástases em locais distantes de 20 a 40%. Neoplasias oriundas da glândula submandibular apresentaram uma incidência de metástases à distância em 37% dos casos, seguido de 24% em glândulas salivares menores e 17% em parótida (Bradley, 2001). Em nosso estudo, 53.4% das neoplasias que evoluíram como metástase à distância eram provenientes da glândula, seguido da glândula submandibular e glândulas salivares menores (20.9% em ambas as localizações), e 6.9% em glândula sublingual.

Em 1999, Van der Poorten et al. avaliaram 135 pacientes portadores de carcinomas em parótida, dos quais 48 desenvolveram metástase à distância. Dentre os sítios anatômicos mais acometidos, 42% foram diagnosticados com metástases pulmonares, 21% apresentaram metástase esquelética, 19% evoluíram com doença plurimetastática e o restante desenvolveu metástase hepática, cerebral e em medula óssea. Em nossa avaliação, os pacientes diagnosticados com neoplasias de glândulas salivares que evoluíram com metástases à distância, os pulmões compreenderam ao sítio metastático mais incidente (67.4%), seguido de metástases ósseas em 32.5% dos pacientes, comprometimento hepático em 13.9% e 13,7% em cérebro. Em relação a disseminação em mais de um órgão, 55.1% pacientes evoluíram com doença plurimetastática, sendo o CAC o tipo histológico mais incidente (68.7%), seguido de CME em 25% dos pacientes e em 6.25% dos casos de adenocarcinoma polimorfo de baixo grau.

Considera-se de extrema valia ressaltar a necessidade de avaliações odontológicas e médicas minuciosas em todos os pacientes, na presença, ou não, de alterações clínicas, sejam estas sintomáticas ou assintomáticas. Neoplasias malignas em região cabeça e pescoço correspondem a eventos raros, assim como a ocorrência de doença metastática, cujos sinais clínicos, tipicamente, mostram-se insidiosos e, muitas vezes, não específicos. Especialmente em pacientes idosos, é notória a camuflagem de sinais e sintomas por outras comorbidades sistêmicas. Apesar da raridade de tais neoplasias no ramo oncológico de cabeça e pescoço, a diagnose e a instituição de terapia precoce podem prevenir complicações futuras a esses pacientes. Todos devem ser submetidos ao acompanhamento clínico anual e realizar, rotineiramente, radiografias torácicas. Na suspeita de possível doença metastática, a investigação dever-se-á utilizar de outros recursos diagnósticos, como

tomografia computadorizada de tórax, suplementada por exames laboratoriais, broncoscopia, mapeamento ósseo, testes funcionais séricos hepáticos, ultrassonografia abdominal e exames de imagem em sistema nervoso central (ressonância magnética ou tomografia computadorizada) (Bradley, 2001).

A principal abordagem terapêutica em pacientes com neoplasias metastáticas de glândulas salivares compreende, quando acessível e não havendo comprometimento a estruturas vitais, a metastasectomia, podendo haver associação à radioterapia. A escolha do tratamento quimioterápico é utilizada em doenças recorrentes, em tumores não resgatados e/ou não favoráveis ao tratamento ressectivo (Kies et al., 2006). Em nossa casuística, a conduta terapêutica mais utilizada foi a ressecção cirúrgica (metastasectomia), adotada em 69.7% casos, sendo a toracotomia e ressecção pulmonar em cunha a abordagem principal em 44.1% dos pacientes. Em 81.3% dos casos, tratamento radioterápico foi utilizado, sendo em 85.7% casos empregada como complementação à cirurgia, e em 14.3% casos, adotada como modalidade isolada. Quimioterapia fora realizada em 34.8% dos pacientes, sendo utilizada sempre em associação à outra modalidade terapêutica. Cuidados paliativos corresponderam à alternativa terapêutica em 2.6% dos pacientes, e em outros 2.6%, nenhuma intervenção terapêutica foi adotada por não aceitação dos pacientes.

Apesar do exponencial avanço científico concernente ao campo oncológico, atualmente ainda carece-se de protocolos terapêuticos vigentes e eficazes no manejo de pacientes com doenças metastáticas provenientes de glândulas salivares. Indubitavelmente, faz-se necessário o aprofundamento contínuo a despeito dos mecanismos biológicos de tais neoplasias, assim como para o uso de terapêutica alvo-específica. Ao final do presente estudo, 62.7% pacientes evoluíram ao óbito em decorrência à doença neoplásica metastática e suas complicações sistêmicas, 25.5% pacientes estavam vivos, com doença metastática remanescente e apenas 11.6% encontravam-se vivos, sem doença ativa.

No presente trabalho, realizamos a análise do perfil fenotípico de neoplasias malignas de glândulas salivar primárias e metastáticas, a partir do estudo da caracterização do padrão de expressão de moléculas do citoesqueleto, denominadas citoqueratinas. Foram incluídos 10 casos de carcinomas adenoides císticos primários, e 10 casos de CACs metastáticos, sendo 4 pertencentes ao mesmo paciente. O padrão de expressão de citoqueratinas revelou que, em termos

gerais, a massa metastática manteve um fenótipo similar ao do tumor primário. Não obstante, dependendo da área tumoral, notou-se a perda de diferenciação fenotípica, o que possivelmente repercute um caráter mais agressivo do comportamento biológico neoplásico.

Nossos resultados mostraram um padrão homogêneo na expressão pronunciada na maioria das CKs estudadas, variando de fraca a intensa, localizadas, majoritariamente, em células luminais de estruturas ductais. Schwarz et al. (2011) analisaram características acerca da heterogeneidade morfológica de 14 casos de carcinoma adenoide cístico (CAC), demonstrando uma distribuição homogênea na expressão positiva de CK5/CK7 em células luminais dos espécimes tumorais. Nossos resultados exibiram imunomarcção fraca de CK5 em 60% dos casos e moderada em 40% casos de carcinomas adenoides císticos primários, evidenciado nos componentes celulares luminais. Em contrapartida, mostrou-se ausente em todos ($n = 10$) os espécimes metastáticos pulmonares (100%).

Citoqueratina 7 foi avaliada e expressa, principalmente, nas células luminais neoplásicas em 9 (90%) tumores primários. Em relação às metástases, manteve o mesmo perfil de imunoexpressividade positiva moderada para células luminais neoplásicas em 80%, em conformidade à imunorreatividade positiva de CK7 analisada por Nikitakis et al. (2004).

A análise de CKs 8 e 18 exibiu padrão similar à CK7, no qual houve positividade moderada para células luminais em 9 (90%) neoplasias primárias, e em 10%, notou-se expressão de fraca intensidade. Os tumores metastáticos foram evidenciados pela marcação moderada de componentes luminais nas áreas centrais do tumor em 90% dos casos, e imunorreatividade negativa nas áreas tumorais periféricas, adjacentes ao parênquima pulmonar.

O padrão de marcação da CK14 revelou expressão moderada nas células luminais dos tumores primários em 70% dos casos e marcação fraca em 30%. A expressão imunoistoquímica do marcador nas metástases revelou positividade fraca em 40% dos casos, expressividade moderada nas células luminais de 60% dos espécimes.

Citoqueratina 19 fora evidenciada igualmente nos componentes luminais neoplásicos de tumores primários em 90% dos espécimes. As amostras metastáticas exibiram imunomarcção positiva em áreas periféricas transicionais

com pneumócitos em 40% dos casos. Expressão moderada das células luminais em áreas centrais foi verificada em 80% casos.

A perda de expressão dos marcadores em áreas tumorais periféricas, adjacentes ao parênquima pulmonar, a priori, corrobora com a predição de alteração do citoesqueleto das células neoplásicas, promovendo, assim, uma maior capacidade de migração e agressividade dessas células.

Foram observadas limitações na seleção e aproveitamento de casos para a composição de uma amostra representativa, sendo proporcionalmente compatível à raridade destes tumores, ao que tange à escassez de material, ou mesmo a ausência dos espécimes, devido, também, à idade avançada dos tumores resgatados (muitos datados de mais de 2 décadas).

7 CONCLUSÕES

Objetivos gerais: O objetivo do presente estudo compreende a identificação de alterações fenotípicas comparativas entre os tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares, tratados no A.C. Camargo Cancer Center, São Paulo - Brasil, com o intuito de identificar fatores de risco associados, ou não, ao potencial metastático à distância e sua importância prognóstica.

Conclusão geral: *Foram identificadas alterações fenotípicas entre neoplasias primárias e metastáticas das glândulas salivares, cujos impactos de risco, potencial metastático e importância prognóstica não puderam ser determinados.*

Objetivo específico 1: Analisar a casuística e estratificar os aspectos clínico-patológicos de neoplasias de glândulas salivares metastáticas do Departamento de Anatomia Patológica do A.C. Camargo Cancer Center – São Paulo, Brasil.

Conclusão específica 1: *A doença metastática não corresponde a um evento incomum em pacientes portadores de carcinomas de glândulas salivares. Ainda, neoplasias metastáticas de glândulas salivares incidem na vida adulta, não havendo predileção por sexo.*

Objetivo específico 2: Estudar os aspectos morfológicos das neoplasias primárias de glândulas salivares e suas metástases

Conclusão específica 2: *O tipo histológico mais comumente associado ao desenvolvimento de metástases à distância é o carcinoma adenoide cístico. Os pulmões correspondem ao sítio metastático mais acometido em neoplasias malignas de glândulas salivares.*

Objetivo específico 3: Estudar, por meio da técnica de imunoistoquímica, a expressão de citoqueratinas nas neoplasias primárias de glândulas salivares e de suas metástases.

Conclusão específica 3: *Neoplasias primárias de glândulas salivares e suas respectivas metástases apresentam um padrão fenotípico heterogêneo e com variações de expressão das proteínas do citoesqueleto.*

REFERÊNCIAS

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. Citoesqueleto. In: Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, editores. *Biologia molecular da célula*. 4ª ed. New York: Garland Publishing; 2004. p.907-82.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransk YD. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press, 2005.

Batsakis JG. Tumours of the head and neck. Clinical and pathological considerations. 2nd ed. Baltimore London: Williams & Wilkins; 1982.

Batsakis JG.,Luna MA. Histopathologic grading of salivary gland neoplasm: Mucoepidermoid carcinomas. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1990 Oct; 99(10 Pt1):835-8.

Berkovitz BK, Barret AW. Cytokeratin intermediate filaments in oral and odontogenic epithelia. *Bull Group Int Rech Sci Stomatol Odontol*. 1998 Jan-Mar; 40(1): 4-23.

Bobbio A, Copelli C, Ampollini L, Bianchi B, Carbognani P, Bettati S, Sesenna E, Rusca M. Lung metastasis resection of adenoid cystic carcinoma of salivary glands. *Eur J Cardiothorac Surg*. 2008 May;33(5):790-3.

Bradley PJ. Distant metastases from salivary glands cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2001 Jul-Aug;63(4):233-42.

Cheuk W, Chan JKC. Salivary gland tumors. In: Fletcher CDM, editor. *Diagnostic Histopathology of Tumors*. 2nd ed. London, Edinburgh, New York, St Louis, Sydney, Toronto: Churchill Livingstone; 2000. p.231-312. v1.

Cheville JC, Rao S, Iczkowski KA, Lohse CM, Pankratz VS. Cytokeratin expression in seminoma of the human testis. *Am J Clin Pathol*. 2000 Apr;113(4):583-8.

Chu PG, Weiss LM. Keratin expression in human tissues and neoplasms. *Histopathol*. 2002 May; 40(5): 403-39.

Dardick I. Color atlas text of salivary gland pathology. New York: Igaku – Shoin Medical Publishers; 1996.

Dawson SJ, Murray RM, Rischin D. Hypocalcemia associated with bone metastases in a patient with salivary-gland carcinoma. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006; 3:104–7.

de Araújo VC, de Sousa SO. Expression of different keratins in salivary gland tumours. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Jan;32B(1):14-8.

Ellis, GL. Auclair, P. Tumors of Salivary Glands, in Armed Forces Institute of Pathology, Atlas of Tumor Pathology, 4rd Series. Washington; 2008. p. 155-75.

Eveson JW, Auclair P, Gnepp DR Tumors of the Salivary Glands. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D., editors. Pathology and genetics of head and neck tumors. World Health Organization Classification of Tumors. Lyon: IARC Press; 2005, p. 209-81.

Eveson JW, Cawson RA. Tumours of the minor (oropharyngeal) salivary glands: a demographic study of 336 cases. *J Oral Pathol*. 1985;14(6):500-9.

Figun ME Garino RR. Anatomia odontológica: funcional e aplicada. 3.ed. São Paulo: Panamericana; 2003.

Foschini MP, Marucci G, Eusebi V. Low-grade mucoepidermoid carcinoma of salivary glands: characteristic immunohistochemical profile and evidence of striated duct differentiation. *Virchows Arch*. 2002 May; 440(5):536-42.

Garden AS, Weber RS, Ang KK, Morrison WH, Matre J, Peters LJ. Postoperative radiation therapy for malignant tumors of minor salivary glands. Outcome and patterns of failure. *Cancer*. 1994 May 15;73(10):2563-9.

Gnepp DR, Brandwein MS, Henley JD. Salivary and lacrimal glands. In: Gnepp DR, editor. Diagnostic Surgical Pathology of the Head and Neck. 1sted, Philadelphia: WB Saunders Company; 2001. p.325-430.

Gregory PA, Bracken CP, Bert AG, Goodall GJ. MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle*. 2008 Oct;7(20):3112-8.

Guntinas-Lichius O, Kick C, Klusmann JP, Jungehuelsing M, Stennert E. Pleomorphic adenoma of the parotid gland: a 13-year experience of consequent management by lateral or total parotidectomy. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2004; 261(31): 143-6.

Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell.* 2006 Nov 17; 127(4): 670-95.

Guzzo M, Ferrari A, Marcon I, Collini P, Gandola L, Pizzi N. et al. Salivary gland neoplasm in children: the experience of the Institute Nazionale Tumori of Milan. *Ped Blood Cancer.* 2006 Nov; 47(6): 806-10.

Horn-Ross PL, Ljung BM, Morrow M. Environmental factors and the risk of salivary gland cancer. *Epidemiol* 1997; 8;414-9.

Huang Q, Gumireddy K, Schrier M, le Sage C, Nagel R, Nair S, Egan DA, Li A, Huang G, Klein-Szanto AJ, Gimotty PA, Katsaros D, Coukos G, Zhang L, Puré E, Agami R. The microRNAs miR-373 and miR-520c promote tumour invasion and metastasis. *Nat Cell Biol.* 2008 Feb;10(2):202-10.

Jones A, Fujiyama C, Turner K, Cranston D, Williams K, Stratford I, Bicknell R, Harris AL. Role of thymidine phosphorylase in an in vitro model of human bladder cancer invasion. *J Urol.* 2002 Mar;167(3):1482-6.

Karatzas A, Katsanos K, Maroulis I, Kalogeropoulou C, Tzorakoleftherakis E, Karnabatidis D. Multi-modality curative treatment of salivary gland cancer liver metastases with drug-eluting bead chemoembolization, radiofrequency ablation, and surgical resection: a case report. *J Med Case Rep.* 2011 Aug 25;5:416.

Katchburian E., Arana V. *Histologia e embriologia oral: texto – atlas – correlações clínicas.* 2 ed. Buenos Aires - Rio de Janeiro: Panamericana-Guanabara Koogan; 2004.

Kies MS, Lewin J, Ginsberg L, Lippman SM. Head and Neck Cancer. In: Strauss M, Loeb MS, Edmonson K, editors. *The MD Anderson manual of medical oncology.* United States of America: McGraw-Hill Companies; 2006. p. 291-311.

Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. *Cell Mol Life Sci*. 2003 Jan; 60(1): 56-71.

Kokemueller H, Eckardt A, Brachvogel P, Hausamen JE. Adenoid cystic carcinoma of the head and neck – a 20 years experience. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33(1): 25–31.

Lima RA, Tavares MR, Dias FL, Kligerman J, Nascimento MF, Barbosa MM et al. Clinical prognostic factors in malignant parotid gland tumors. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 2005; 133(5): 702-8.

Locati LD, Guzzo M, Bossi P, Massone PP, Conti B, Fumagalli E, Bareggi C, Cantu G, Licitra L. Lung metastasectomy in adenoid cystic carcinoma of salivary gland. *Oral Oncol* 2005; 41:890-4.

Lourenço SV, Kamibeppu L, Fernandes JD, Sotto MN, Nico MM. Relationship of adhesion molecules expression with epithelial differentiation markers during fetal skin development. *J Cutan Pathol*. 2008 Aug;35(8):731-7.

Loyola AM, Araujo VC. Carcinoma Mucoepidermoide: estudo clínico e histológico. *RPG*. 1996 Abr/Mai/Jun; 3(2): 115-21.

Luna MA. Salivary mucoepidermoid carcinoma: revisited. *Adv Anat Pathol*. 2006 Nov; 13(6): 293-307.

Magrin J, Kowalski LP, Benevides GM, Andrade WP, Pinto CAL. Tumores de glândulas salivares. In: Kowalski LP, Guimarães GC, Salvajoli JV, Feher O, Antoneli CBG. *Manual de condutas diagnósticas e terapêuticas em oncologia*. 3 ed. São Paulo: Âmbito Editores; 2006. p. 382-7.

Mariano FV, da Silva SD, Chulan TC, de Almeida OP, Kowalski LP. Clinicopathological factors are predictors of distant metastasis from major salivary gland carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2011 May;40(5):504-9.

Moll R, Franke WW, Schiller DL, Geiger B, Krepler R. The calatolg of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell*. 1982 Nov; 31(1): 11-24.

Myers E, Ferris R. Salivary gland disorders. 2nd ed. New York: Springer; 2002. p. 449.

Nagler RM, Laufer D. Tumors of the major and minor salivary glands: review of 25 years of experience. *Anticancer Res.* 1997 Jan-Feb;17(1B):701-7.

Nascimento AG, Amaral AL, Prado LA, Kligerman J, Silveira TR. Adenoid cystic carcinoma of salivary glands. A study of 61 cases with clinicopathologic correlation. *Cancer.* 1986 Jan 15;57(2):312-9.

Neville BW, Damm DD, Allen, CM, Bouquot, JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* Trad. 3a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.

Nikitakis NG, Tosios KI, Papanikolaou VS, Rivera H, Papanicolaou SI, Ioffe OB. Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. *Mod Pathol.* 2004 Apr; 17(4): 407-15.

Okabe M, Inagaki H, Murase T, Inoue M, Nagai N, Eimoto T. Prognostic significance of p27 and Ki-67 expression in mucoepidermoid carcinoma of the intraoral minor salivary gland. *Mod Pathol.* 2001 Oct;14(10):1008-14.

Perret GY. Metastatic spread: mechanisms and therapies. *J Soc Biol.* 2007;201(3):237-41.

Petruzzelli GJ. The biology of distant metastasis in head and neck cancer. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec.* 2001; 63(4): 192-201.

Pinkston JA, Cole P. Incidence rates of salivary gland tumors: results from a population based study. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1999; 120(6): 834-40.

Régis De Brito Santos I, Kowalski LP, Cavalcante De Araujo V, Flávia Logullo A, Magrin J. Multivariate analysis of risk factors for neck metastases in surgically treated parotid carcinomas. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2001 Jan;127(1):56-60.

Rosai J. Major and minor salivary glands. In: Rosai J, editor. *Rosai and Ackerman's Surgical Pathology.* 9th ed. St Louis: Mosby; 2004. v.1 p.873-916.

Schwarz S, Müller M, Ettl T, Stockmann P, Zenk J, Agaimy A. Morphological heterogeneity of oral salivary gland carcinomas: a clinicopathologic study of 41 cases with long term follow-up emphasizing the overlapping spectrum of adenoid cystic carcinoma and polymorphous low-grade adenocarcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2011 Apr;4(4):336-48.

Seifert G, Sobin LH. Histological typing of salivary gland tumors (International Histological Classification of tumours). 2nd ed. Berlin: Springer-Verlag: World Health Organization; 1991.

Silveira EJD, Medeiros KB, Queiroz LMG, Figueiredo CRLV. Citoqueratinas – Aplicação na Patologia Oral. *RBO Rev Bras Odontol*. 2002 Jan/Fev; 59(1): 46-9.

Spiro RH, Huvos AG. Stage means more than grade in adenoid cystic carcinoma. *Am J Surg*. 1992 Dec;164(6):623-8.

Suzuki M, Ichimiya I, Matsushita F, Mogi G. Histological features and prognosis of patients with mucoepidermoid carcinoma of the parotid gland. *J Laryngol Otol*. 1998 Oct;112(10):944-7

Swanson GM, Burns PB. Cancers of the salivary gland: workplace risks among women and men. *Ann Epidemiol* 1997; 7; 369-74.

Teo PML, Chan ATC, LEE W.Y. et al. Failure patterns and factors affecting prognosis of salivary gland carcinoma: Retrospective study. *Hong Kong Med J*. 2000; 6(1): 29-36.

Thierry JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009; 139, 871-90.

Thompson EW, Newgreen DF, Tarin D. Carcinoma invasion and metastasis: a role epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Res*. 2005; 65(14): 5991-5.

Van der Poorten VL, Balm AJM, Hilgers FJM, Tan IB et al. The development of prognostic score for patients with parotid carcinoma. *Cancer*. 1999; 85(9): 2057-67.

Vargas PA, Gerhard R, Araujo Filho VJ, Castro IV. Salivary gland tumors in a Brazilian population: a retrospective study of 124 Cases. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 2002; 57(6): 271-6.

Vaughan ED. Management of malignant salivary gland tumours. *Hosp Med*. 2001 Jul;62(7):400-5.

Venteicher AS, Walcott BP, Sheth SA, Snuderl M, Patel AP, Curry WT, Nahed BV. Clinical features of brain metastasis from salivary gland tumors. *J Clin Neurosci*. 2013 Nov;20(11):1533-7.

Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, Beliën JA, de Waal RM, Van Marck E, Magnani E, Weidner N, Harris AL, Dirix LY. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *Eur J Cancer*. 2002 Aug;38(12):1564-79.

Wahlberg P, Anderson H, Biörklund A, Möller T, Perfekt R. Carcinoma of the parotid and submandibular glands--a study of survival in 2465 patients. *Oral Oncol*. 2002 Oct;38(7):706-13.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Análise clínica, histopatológica e imunoistoquímica do fenótipo de tumores primários e tumores metastáticos de Glândulas Salivares.

Pesquisador: Sílvia Vanessa Lourenço

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 07907812.8.1001.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 166.130

Data da Relatoria: 06/12/2012

Apresentação do Projeto:

O objetivo deste estudo é identificar alterações fenotípicas comparativas entre os tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares provenientes de acervo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, com o intuito de identificar fatores de risco associados, ou não, ao potencial metastático à distância e sua importância prognóstica. Para isso, serão selecionados casos de tumores primários de glândulas salivares com metástase detectada, provenientes do acervo do Departamento de Anatomia-Patológica do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, durante o período de janeiro 1970 a agosto de 2011. O número de casos será ainda estimado de acordo com a presença dematerial nos arquivos, através, inicialmente, de análise visual em livros do acervo, os quais contêm laudos impressos. Os dados clínicos, incluindo idade, gênero, raça, localização do tumor, estadiamento clínico, tratamento efetuado, recorrência e situação clínica na última avaliação serão obtidos a partir dos prontuários clínicos (disponíveis no Dep forma digital e sumarizados em fichas padronizadas para o estudo. Análise do perfil sócio-demográfico, clínico e histopatológico será realizada a partir da amostra total coletada. Amostra total será dividida em dois subgrupos: 1) Tumores com metástase detectada e com resgate da neoplasia secundária; 2) Tumores com metástase detectada, sem resgate da neoplasia secundária. Será realizada uma avaliação dos padrões de expressão imunoistoquímica comparativa entre fenótipo dos tumores primários com metástase detectada e tumores metastáticos resgatados. As amostras utilizadas (e devidamente identificadas) serão armazenadas no acervo do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo deste estudo é identificar as possíveis alterações fenotípicas comparativas entre os tumores primários e tumores metastáticos de glândulas salivares, com o intuito de identificar fatores de risco associados, ou não, ao potencial metastático à distância e sua importância prognóstica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

A pesquisa não apresenta riscos ou benefícios diretos para o sujeito já que serão utilizados material coletado para exames anatomo-patológicos de um acervo específico. Por outro lado, os sujeitos serão beneficiados indiretamente em virtude da contribuição para obtenção de conhecimentos que poderão, eventualmente, auxiliar no entendimento da biologia tumoral e, talvez, serem aplicados na prática de procedimentos diagnósticos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Os pesquisadores trabalharão com material biológico armazenado em um acervo e garantem a manutenção do sigilo quanto à identidade dos sujeitos a despeito de utilizarem dados dos prontuários dos mesmos. Após a utilização para pesquisa, o material biológico estudado será devolvido ao acervo de origem.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, São Paulo, assinado por membro não vinculado à pesquisa. Não houve a necessidade de TCLE por tratar-se de dados secundários coletados não por ocasião da pesquisa.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação. Segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011, contudo não cabe ao Sistema CEP/CONEP legislar sobre o acesso e USO DO PRONTUÁRIO médico (entenda-se odontológico também), porém cabe determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 196/96, itens III.1.2a e IV.1.2g. O CEP-FOUSP solicita Carta de autorização pelo uso de prontuários do responsável pela Instituição, ressaltando o cumprimento destas normativas. Segundo Carta Nº 0212/CONEP/CNS, de 21 de outubro de 2010, a INSTITUIÇÃO CO-PARTICIPANTE deve emitir declaração que concordar com o parecer ético emitido pelo CEP da instituição proponente, no caso o CEP-FOUSP, conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução CNS 196/96. Declarar que está ciente de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7980 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

suas co-responsabilidades como instituição co-participante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Projeto apresentado dentro dos preceitos éticos exigíveis.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 08 de Dezembro de 2012

Assinador por:
Marcia Turolla Wanderley
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br