**ESTUDO COMPARATIVO MORFOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA β -CATENINA EM CARCINOMAS EX-
ADENOMAS PLEOMORFOS, ADENOMAS PLEOMORFOS E
GLÂNDULAS SALIVARES**

Renata Falchete do Prado

Dissertação apresentada à Faculdade de
Odontologia de Bauru da Universidade de
São Paulo, como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em
Odontologia, área de Patologia Bucal.

(Edição Revisada)

BAURU

2005

**ESTUDO COMPARATIVO MORFOLÓGICO E IMUNO-
HISTOQUÍMICO DA β -CATENINA EM CARCINOMAS EX-
ADENOMAS PLEOMORFOS, ADENOMAS PLEOMORFOS E
GLÂNDULAS SALIVARES**

Renata Falchete do Prado

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia, área de Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

(Edição Revisada)

BAURU

2005

Ficha Técnica:

Renata Falchete do Prado: concepção original, execução, digitação e fotomicrografia.

Luís Antônio de Assis Taveira: orientação, concepção original e fotomicrografia.

Alberto Consolaro: colaborador.

Luciana Sassa Marocchio: revisão final.

Marta Miyazawa: fotomicrografia.

Valdir João Afonso: revisão vernacular

Maria Cristina Carrara Felipe: auxílio administrativo e técnico.

Fátima Aparecida Silveira: serviços laboratoriais.

Laboratório de Consultoria em Patologia: procedimentos imuno-histoquímicos

Papel e arte / Encadernação Manzano: serviço de cópias e encadernação

PRADO, Renata Falchete do

P882e Estudo comparativo morfológico e imuno-histoquímico da β -catenina em carcinomas ex-adenomas pleomorfos, adenomas pleomorfos e glândulas salivares./Renata Falchete do Prado – Bauru, 2005.

xx , 121 p. : il. ; 30cm.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Odontologia de Bauru.
Universidade de São Paulo.

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Colaborador: Prof. Dr. Alberto Consolaro

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Bauru, 18 de fevereiro de 2005.

Aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

Protocolo: 111/2003.

Data: 4 de novembro de 2003.

RENATA FALCHETE DO PRADO

Data e local de nascimento	21 de março de 1981 Ilha Solteira – São Paulo
Filiação	Antônio Luís Baptista do Prado Aparecida Falchete do Prado
1999 - 2002	Curso de Graduação em Odontologia pela Universidade Estadual Paulista – UNESP
2003-2004	Mestrado em Odontologia, área de Patologia Bucal, na Faculdade de Odontologia de Bauru – USP
Associações	International Association for Dental Research Sociedade Brasileira de Pesquisa Odontológica

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio e Aparecida, pelo amor, carinho, paciência, apoio e compreensão indispensáveis para meu amadurecimento e concretização de um sonho.

“Dous horizontes fecham nossa vida:

Um horizonte, — a saudade

Do que não há de voltar;

Outro horizonte, — a esperança

Dos tempos que hão de chegar;

No presente, — sempre escuro, —

Vive a alma ambiciosa

Na ilusão voluptuosa

Do passado e do futuro.”

Machado de Assis

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor **Luís Antônio de Assis Taveira**, pela orientação deste trabalho, pela amizade, confiança, estímulo e dedicação, o meu reconhecimento e, eterna dívida, muito obrigada!

Ao Professor Doutor **Alberto Consolaro** pelo exemplo a ser seguido, pelo rigor científico, pelos conhecimentos fornecidos, e pela amizade, o meu reconhecimento e o meu muito obrigada!

Às Professoras **Doutora Denise Tostes Oliveira** e **Doutora Vanessa Soares Lara**, pelos ensinamentos científicos e pessoais, pela convivência em amizade e apoio constantes, o meu reconhecimento e o meu muito obrigada!

AGRADEÇO À MINHA FAMÍLIA

Aos meus pais, **Antônio** e **Aparecida**, que desde meus primeiros passos nunca hesitaram em me encorajar e sempre me ensinavam os caminhos da felicidade, revelando-se exemplos a sempre serem seguidos e acima de tudo pelo amor infinito.

À minha irmã, **Juliana**, pelo constante carinho, apoio, e pela nossa união.

Ao meu **Caique** pelas constantes provas de amor e cada segundo da vida que aguarda meus passos profissionais sem jamais cercear meus ideais, em nome da realização do “nosso” projeto de vida.

AGRADEÇO AOS MEUS AMIGOS

À minha querida orientadora de toda a graduação Professora Doutora Renata Callestini, por me apresentar o maravilhoso caminho das minúcias da patologia, e pelo carinho e exemplo de vida.

À minha querida amiga **Luciana Sassa Marocchio**, pelo exemplo de vida, pelos anos vividos em amizade, por confiar em mim e por aprendermos juntas as responsabilidades da vida.

Ao meu querido amigo **Amélio Borges Taveira**, pela amizade infinita, convivência e exemplo de vida.

Aos companheiros de mestrado **Bethânia, Camila, Lidiane, Renata, Renato, Thiago**, pela amizade, pelo convívio e pelo aprendizado.

Aos companheiros inseparáveis de pós-graduação **Adriana, André, Danieli, Danilo, Karla, Kátia, Lígia, Thaís, Renato, Zanda**, por todos felizes momentos que passamos juntos.

Aos fabulosos funcionários da Patologia da FOB-USP **Fátima Aparecida, Maria Cristina e Valdir João** pela colaboração indispensável, amizade, consideração, e pela paciência.

À equipe de apoio da Patologia da FOB-USP, **Eva, Gilmar, Osiel e Richarland**, pela amizade, consideração, e principalmente pela paciência.

A todos os colegas pós-graduandos **Aline, Andréa, Carlos, Ana Carolina, Erick, Erica Martins, Érica Sinara, Janaína, João Adolfo, Leda, Maria Fernanda, Maria Renata, Marta, Patrícia, Rosário, Simone, Suzana e**

Tânia o meu muito obrigada pelo convívio, pela amizade e pela troca de experiências.

À querida colega **Camila Lopes Cardoso** pela paciência, pelo aprendizado em conjunto e pela amizade.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-graduação da FOB-USP, **Giane, Margareth, Ana Letícia e Solange**, pela atenção e disponibilidade sempre.

A todos os funcionários da Biblioteca da FOB-USP, particularmente, **Vera Regina, Rita de Cássia, Ademir, Ana Paula, Jane, César, Cybelle e Valéria**, pela atenção e profissionalismo.

A todos os funcionários da reprografia, em nome do **Salvador**, o meu muito obrigada.

AGRADEÇO A DEUS

Simplesmente pela vida...

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

À Direção da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa da Diretora Professora Dra. Maria Fidela de Lima Navarro.

À Comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, na pessoa de seu presidente Professor Dr. José Carlos Pereira.

À Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo.

Ao PROAP pelo auxílio pecuniário na pessoa do coordenador do curso de Pós-Graduação em Patologia Bucal Professor Alberto Consolaro.

À CAPES pelo auxílio pecuniário.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS.....	xii
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xviii
RESUMO.....	xx
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	5
2.1 Vernáculo médico.....	6
2.2 Adenoma Pleomorfo.....	7
2.3 Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo.....	18
2.4 β -Catenina.....	24
3 PROPOSIÇÃO.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
4.1 Obtenção e seleção da amostra.....	35
4.2 Caracterização da amostra.....	35
4.3 Análise microscópica.....	36
4.3.1 Hematoxilina e Eosina.....	36
4.3.2 Critérios para análise microscópica.....	36
4.4 Análise imuno-histoquímica.....	38
4.4.1 Critérios de seleção da amostra.....	38
4.4.2 Técnica imuno-histoquímica.....	39
4.4.3 Critérios para análise imuno-histoquímica.....	40
4.5 Análise estatística.....	42
5 RESULTADOS.....	43
5.1 Caracterização da amostra.....	44
5.2 Análise microscópica em H.E.....	51
5.3 Análise microscópica imuno-histoquímica da β -catenina.....	65
5.4 Análise estatística.....	73
6 DISCUSSÃO.....	76
6.1 Da concepção do trabalho.....	77
6.2 Da metodologia empregada.....	78
6.3 Dos resultados obtidos.....	80
6.4 De um caso especial.....	90
7 CONCLUSÕES.....	92
ANEXOS.....	94
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	108
ABSTRACT.....	118
APÊNDICE.....	120

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Quadro elaborado para coleta de dados referentes às características microscópicas das lesões coradas pela hematoxilina e eosina.	37
FIGURA 2	Quadro correspondente à graduação estabelecida para a quantificação da expressão da β -catenina.	40
FIGURA 3	Quadro elaborado para coleta de dados referentes às peculiaridades imuno-histoquímicas dos casos de adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos.	41
FIGURA 4	Quadro elaborado para coleta de dados referentes às peculiaridades imuno-histoquímicas dos casos do grupo controle de glândulas salivares.	42
FIGURA 5	A – Dados relativos aos gêneros da amostra.	45
	B – Gráfico referente à caracterização da amostra com relação ao gênero.	45
FIGURA 6	A – Dados relativos à localização das lesões da amostra.	46
	B – Gráfico referente à caracterização da amostra com relação à localização das lesões.	46
FIGURA 7	A – Dados relativos à faixa etária de ocorrência das lesões.	47
	B – Gráfico referente à caracterização da amostra com relação à faixa etária de ocorrência das lesões.	47
FIGURA 8	A – Dados relativos ao tamanho das lesões da amostra.	48
	B – Gráfico relativo à caracterização da amostra com relação ao tamanho das lesões.	48
FIGURA 9	A – Dados relativos à evolução das lesões da amostra.	49

	B – Gráfico relativo à caracterização da amostra com relação à evolução das lesões.	50
FIGURA 10	A – Dados relativos à presença de sintomatologia nas lesões da amostra.	51
	B – Gráfico relativo à caracterização da amostra com relação à presença de sintomatologia nas lesões.	51
FIGURA 11	Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao epitélio das lesões.	52
FIGURA 12	Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao tecido glandular normal das lesões.	53
FIGURA 13	Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao tecido neoplásico dos adenomas pleomorfos.	56
FIGURA 14	Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao tecido neoplásico dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos.	58
FIGURA 15	Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação à cápsula das lesões.	59
FIGURA 16	Quadro correspondente à caracterização dos achados de atipia no tecido neoplásico dos adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos.	60
FIGURA 17	Adenoma pleomorfo apresentando microscopicamente componente epitelial formando ilhotas, cordões e estruturas ductais com estroma fibroialino. Notam-se células adiposas distribuídas no estroma neoplásico. (H.E.; aumento original=100X).	61
FIGURA 18	Aspectos microscópicos do adenoma pleomorfo com estroma condróide com células semelhantes aos condrócitos e na área central com focos de mineralização (componente osteóide) e tecido mixóide. (H.E.; aumento original=400X).	61
FIGURA 19	Estruturas ductais dos adenomas pleomorfos com	62

	duas camadas celulares: internamente as células luminais e externamente células claras mioepiteliais, além de substância eosinofílica no interior do ducto. (H.E.; aumento original=400X).	
FIGURA 20	Adenoma pleomorfo apresentando microscopicamente células claras organizadas em estruturas acinares. (H.E.; aumento original=100X).	62
FIGURA 21	Células mioepiteliais plasmocitóides de adenoma pleomorfo. (H.E.; aumento original=400X).	63
FIGURA 22	Células mioepiteliais fusiformes dos adenomas pleomorfos (H.E.; aumento original=400X).	63
FIGURA 23	Notar a proximidade da neoplasia benigna (adenoma pleomorfo) com a glândula salivar remanescente. Destaca-se a presença de cápsula. (H.E.; aumento original=100X).	64
FIGURA 24	Carcinoma ex-adenoma pleomorfo apresentando microscopicamente células neoplásicas do carcinoma espinocelular originado. Destaca-se presença de pérolas córneas. (H.E.; aumento original=100X).	64
FIGURA 25	A – Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos do grupo controle de glândulas salivares maiores.	65
	B – Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos do grupo controle de glândulas salivares menores.	66
FIGURA 26	Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos de adenomas pleomorfos.	67
FIGURA 27	Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos de	68

	carcinomas ex-adenomas pleomorfos.	
FIGURA 28	Aspectos microscópicos imuno-histoquímicos da marcação pela β -catenina nos ductos das glândulas salivares menores do grupo controle. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=100X).	69
FIGURA 29	Detalhe dos ductos marcados pela β -catenina das glândulas salivares menores do grupo controle. Destaca-se o padrão de marcação tanto citoplasmático como na superfície celular. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X).	69
FIGURA 30	Aspectos microscópicos da marcação pela β -catenina nos ductos das glândulas salivares maiores do grupo controle. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=100X).	70
FIGURA 31	Detalhe dos ductos marcados pela β -catenina das glândulas salivares maiores do grupo controle. Destaca-se forte imunopositividade na superfície celular. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X).	70
FIGURA 32	Aspectos microscópicos da marcação da β -catenina nas estruturas ductais dos adenomas pleomorfos. Destaca-se a marcação citoplasmática e na superfície das células neoplásicas. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X).	71
FIGURA 33	Aspectos microscópicos da imunopositividade para a β -catenina nas estruturas acinares dos adenomas pleomorfos. Destaca-se a leve intensidade da marcação citoplasmática e na superfície das células neoplásicas. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X).	71
FIGURA 34	Carcinoma ex-adenoma pleomorfo revelando microscopicamente forte imunopositividade para a β -	72

	catenina nas estruturas ductais (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X).	
FIGURA 35	Aspecto da marcação pela β -catenina na superfície das células de ilhota com metaplasia escamosa em carcinoma ex-adenoma pleomorfo. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=40X).	72
FIGURA 36	Quadro correspondente ao nível de concordância.	73
FIGURA 37	A – Quadro referente às informações estatísticas da β -catenina nos casos de adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos. B – Quadro referente às informações estatísticas da β -catenina nos casos de adenomas pleomorfos e glândulas salivares. C – Quadro referente às informações estatísticas da β -catenina nos casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e glândulas salivares.	75
FIGURA 38	Detalhe dos núcleos celulares marcados pela β -catenina. Destaca-se a disposição em paliçada e a presença de estrutura semelhante a membrana basal neste caso de adenoma de células basais (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X)	91
ANEXO A	Quadro com as características microscópicas de cada uma das lesões de adenomas pleomorfos coradas pela hematoxilina e eosina.	95
ANEXO B	Quadro com as características microscópicas de cada uma das lesões de carcinomas ex-adenomas pleomorfos coradas pela hematoxilina e eosina.	101
ANEXO C	Características clínicas e diagnósticos do grupo controle com glândulas salivares.	102
ANEXO D	Quadro com os dados imuno-histoquímicos de cada caso do grupo controle de glândulas salivares	102

	menores.	
ANEXO E	Quadro com os dados imuno-histoquímicos de cada caso do grupo controle de glândulas salivares maiores.	103
ANEXO F	Quadro com o dados imuno-histoquímicos de cada caso de adenomas pleomorfos.	104
ANEXO G	Quadro com o dados imuno-histoquímicos de cada caso de carcinomas ex-adenomas pleomorfos.	107

LISTA DE ABREVIATURAS

α -SMA – *do inglês* - *α -smooth muscle actin* - α -actina de músculo liso
Acin – Acinares
AgNOR – *do inglês* - *Argyrophilic nucleolar organizer region* - Impregnação pela Prata da Região Organizadora do Nucléolo
APC – *do inglês* - *adenomatous polyposis coli* - Polipose Adenomatosa do Cólon
BMP – *do inglês* - *bone morphogenetic protein* - Proteína óssea morfogenética
BRCA1 – *do inglês* *breast cancer 1*- gene do câncer de mama 1
Cáps – Cápsula
Cél – Célula
Compo – Componente
Descon – Descontínua
DNA – *do inglês* - *Deoxyribonucleic acid* - ácido desoxirribonucléico
EMT – *do inglês* - *epithelial to mesenchymal transition* – transição epitelial para mesenquimal
Eosi – Eosinofílica
Ep – Epitélio
Est – Estruturas
Estrat – Estratificado
Fem – Feminino
FGF – *do inglês* - *Fibroblastic growth factor* - Fator de Crescimento Fibroblástico
FISH – *do inglês* - *Fluorescence in situ hybridization* - Fluorescência em Hibridização In Situ
H₂O₂ – Peróxido de Hidrogênio
Hiper cel – Hiper celularidade
Hiper cro – Hiper cromatismo
Ilh – Ilhotas
Inf – Informação
Infil – Infiltrado
Infl – Inflamatório
Int – Interior
LEF – *do inglês* - *lymphoid enhancer binding factor* – fator linfóide realçador de ligação.
LIFR – *do inglês* - *leukemia inhibitory factor receptor* – receptor do fator inibitório de leucemia
Masc – Masculino
MIB – Ki67 – antígeno nuclear associado à proliferação celular
Mieopit – Mioepitelial
MN – Mononuclear
NCAM – *do inglês* - *neural cell adhesion molecule* - Molécula de Adesão de Célula Neural
OMS – Organização Mundial da Saúde
PCR – *do inglês* - *Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase
PLAG1 – *do inglês* - *pleomorphic adenoma gene 1* – Gene 1 do adenoma pleomorfo
Pleomorf – Pleomorfismo
Predomin – Predominantemente
RNA – *do inglês* - *Ribonucleic acid* - ácido ribonucléico

RT-PCR – *do inglês - Reverse Transcriptase – Polimerase Chain Reaction* - Reação em Cadeia da Polimerase Via Transcriptase Reversa

SMMH – *do inglês - smooth muscle myosin heavy chains* - Cadeias Pesadas de Miosina de Músculo Liso

Sub – Substância

TCF – *do inglês - T-cell-specific factor* – fator específico de células T

µm – Micrometro

Viol – Violação

RESUMO

O adenoma pleomorfo é o tipo de tumor de glândula salivar mais comum e caracteriza-se pela diversidade morfológica. Sua transformação maligna origina os carcinomas ex-adenomas pleomorfos. A molécula β -catenina participa nas junções celulares e tem sido intensamente associada à carcinogênese das neoplasias humanas, sua atividade metastática e ainda à transformação maligna de adenomas em carcinomas de alguns órgãos como, por exemplo, o estômago. O objetivo deste trabalho foi traçar o perfil clínico e morfológico de todos os adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos dos arquivos do Departamento de Estomatologia, Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP compreendendo o período de 1963 até 2003. Em seguida, marcar imuno-histoquimicamente e comparar a expressão da β -catenina em dez glândulas salivares normais, 16 adenomas pleomorfos e três carcinomas ex-adenomas pleomorfos no intuito de observar sua importância na patogênese das lesões e estabelecer correlações com os aspectos microscópicos. A técnica padrão do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase foi utilizada para marcação do anticorpo monoclonal β -catenina. Como resultados, o gênero mais afetado pelo adenoma pleomorfo e carcinoma ex-adenoma pleomorfo foi o feminino, com faixa etária da 3^a a 5^a e 6^a a 7^a décadas de vida, respectivamente. A localização mais freqüente foi no palato para ambos, assim como as características microscópicas representativas foram o estroma fibroialino, as estruturas epiteliais em ilhotas, cordões e ductos para os adenomas e nos carcinomas a metaplasia escamosa, as estruturas ductais, acinares, e as células claras. Observou-se a diminuição estatisticamente significativa ($p=0,008$) da expressão da proteína nos adenomas pleomorfos em comparação às glândulas. Estes resultados sugerem a participação da β -catenina no desenvolvimento dos adenomas pleomorfos.

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde⁷⁷ classifica o adenoma pleomorfo como uma neoplasia benigna das glândulas salivares caracterizada pelos pleomorfismos: celular e arquitetural. À análise microscópica, elementos epiteliais e mioepiteliais modificados apresentam-se imersos em uma matriz mucóide, mixóide ou condróide. A lesão pode possuir ou não cápsula fibrosa⁸³. Os componentes epiteliais podem formar ductos, lençóis, cordões ou ilhotas celulares sólidas. A metaplasia escamosa pode ser encontrada em 25% dos adenomas pleomorfos.

O carcinoma ex-adenoma pleomorfo corresponde à transformação maligna de células epiteliais do adenoma pleomorfo, estando presente na mesma neoplasia dois componentes: o benigno ou adenomatoso e o maligno ou carcinomatoso. Com a transformação maligna, verificam-se algumas características que incluem a destruição dos tecidos normais, invasividade, pleomorfismo celular, mitoses atípicas, padrões anormais e necrose²⁷.

A revisão e comparação dos perfis clínico-microscópicos foi a forma inicial de estudo destas lesões com o intuito de colaborar com os conhecimentos a respeito de sua morfologia e estabelecer correlações com os aspectos clínicos encontrados com os já descritos na literatura.

Apesar de numerosos trabalhos discutirem a etiopatogenia do adenoma pleomorfo e do carcinoma ex-adenoma pleomorfo^{15,20,60,100}, algumas perguntas permanecem sem resposta... Qual componente glandular origina os adenomas pleomorfos? Por que alguns adenomas apresentam metástases sendo denominados

adenomas pleomorfos metastatizantes? O que provoca o desenvolvimento de uma neoplasia maligna nos adenomas pleomorfos?

A forma de organização das células epiteliais dos adenomas pleomorfos em diversos padrões e diferentes níveis de diferenciação⁷⁷ estimulou o estudo das moléculas constituintes das junções celulares, que participam no arranjo tecidual nestas neoplasias³. A β -catenina é uma das proteínas da família das cateninas, responsáveis pela ligação da molécula de adesão transmembrana intercelular E-caderina ao citoesqueleto de actina³. Esta molécula tem sido estudada como uma importante proteína na carcinogênese humana, o que despertou o interesse pela determinação de sua expressão em adenomas pleomorfos e sua variante maligna por sua possível influência na transformação maligna e também em glândulas salivares normais como parâmetro de comparação. A β -catenina interage com o domínio citoplasmático da E-caderina e com a α -catenina que por sua vez liga-se ao citoesqueleto de actina, constituindo as junções aderentes célula-célula⁶⁷. Esta proteína também interage no sistema de sinalização Wingless/Wnt. Wingless é uma sinalização sp célula-célula das Drosófilas que regula vários processos do desenvolvimento do organismo e o Wnt é uma molécula análoga nos vertebrados⁶². Além de participar como constituinte das junções aderentes apresentando-se na superfície celular, a β -catenina também encontra-se citoplasmática, até que seja degradada ao ligar-se a proteínas codificadas pelo gene *APC* (*adenomatous polyposis coli*), gene supressor de tumor, importante regulador positivo para apoptose⁹. Ainda pode localizar-se no interior do núcleo celular, onde atua como cofator para transcrição ao interagir com os *LEF/TCF* (*lymphoid enhancer binding factor/T-cell-specific factor*), fatores de transcrição que fazem parte de uma grande família de alta

mobilidade arquitetural^{62,67,71}. Esta interação com produtos da família dos fatores linfóides juntamente com a ligação da β -catenina com o Wnt pode controlar a transcrição, apoptose e proliferação celular⁶². A superexpressão desta proteína também altera a morfologia celular induzindo um processo denominado de EMT (epithelial to mesenchymal transition), atenua o processo de bloqueio do ciclo celular induzido por radiação, podendo estar associada a eventos biológicos durante o desenvolvimento de uma neoplasia⁶². Também se verifica na literatura o envolvimento da β -catenina na transformação maligna de lesões adenomatosas no estômago e no esôfago de Barret^{34,63}.

Na literatura, o estudo desta proteína de adesão foi realizado em duas neoplasias de glândulas salivares: o carcinoma mucoepidermóide⁸¹ e o carcinoma adenóide cístico⁸⁰. Ainda não foram publicados trabalhos que, através de técnicas imuno-histoquímicas, estudassem a expressão da β -catenina em adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos. Portanto, a determinação para avaliação e comparação dos perfis imuno-histoquímicos destas lesões com as glândulas salivares foi a forma utilizada neste estudo com o intuito de colaborar com os conhecimentos a respeito da etiopatogenia destas lesões, na tentativa de esclarecer algumas das dúvidas já citadas.

2 Revisão da Literatura

2 REVISÃO DA LITERATURA

Neste capítulo, procurou-se apresentar os trabalhos selecionados pertinentes ao assunto de acordo com a ordem cronológica de publicação, para a exposição da evolução do conhecimento a respeito do adenoma pleomorfo e sua variante maligna, o carcinoma ex-adenoma pleomorfo e da molécula de adesão celular β -catenina.

2.1 VERNÁCULO MÉDICO

Inicialmente, para a melhor compreensão do significado dos nomes das lesões estudadas resgatou-se sua etimologia. Do grego extrai-se os termos *adên, adénos* “glande, glândula”. Também do grego, o sufixo “oma”, é um pospositivo, derivado da palavra *óγκóma, atos* “inchação, tumor”. O termo “pleo” representa um antepositivo, de origem grega da palavra *pleíón, ón, on* “mais numeroso, maior”. Ainda de origem grega, o pospositivo “morfo” é formador de adjetivos, às vezes substantivados, derivado de *morphê* “forma”. Para finalizar os termos de origem grega, carcinoma vem da palavra *karkínóma, atos* que significa “cancro, tumor canceroso”, entretanto, também tem origem do latim *carcinoma*. No latim verifica-se o sufixo “ex” da preposição *ex/e* que significa “movimento para fora, tirado de, acabamento”²¹.

Em consulta à terminologia médica, de acordo com o Dicionário Médico Stedmans^{2,13,66,68} esta nominata significa:

*Adenoma*² é uma neoplasia benigna do tecido epitelial na qual as células neoplásicas formam estruturas semelhantes às das glândulas, normalmente bem

circunscrita, tendendo a comprimir ao invés de infiltrar ou invadir os tecidos adjacentes.

*Carcinoma*¹³ abrange uma variedade de tipos de neoplasias malignas derivadas do tecido epitelial de diferentes órgãos como, por exemplo, pele, intestino, brônquios, glândula prostática, mamária e colo de útero. São identificados microscopicamente com base na invasividade, perda da polaridade do núcleo, perda da diferenciação celular, variação em tamanho e forma das células, hipercromatismo do núcleo e perda da relação núcleo citoplasma. Pode ser indiferenciado ou lembrar um dos tipos de epitélio normal.

*Pleomorfo*⁶⁶ representa um sinônimo de *polimórfico*⁶⁸ que significa apresentar mais de uma forma morfológica.

2.2 ADENOMA PLEOMORFO

Esta neoplasia benigna acomete diversas glândulas humanas como, por exemplo: lacrimais⁸, auditivas⁴⁶, do esôfago⁶, da mama¹⁷, do septo nasal⁸⁵, entretanto, neste estudo, centraram-se esforços para revisão da literatura das neoplasias acometendo glândulas salivares.

Dentre as denominações do adenoma pleomorfo, nos estudos mais antigos, verificou-se freqüentemente o termo tumor misto^{7,27,28}, pois se acreditava em sua origem a partir de dois folhetos germinativos: epitelial e mesenquimal.

Para WILLIS⁹⁶, em seu livro de 1948, o adenoma pleomorfo constituía uma neoplasia originada e composta somente de epitélio das glândulas salivares e com rara presença de tecidos conjuntivo mucoso, cartilagenoso e ósseo. O autor

considerava inadequado o uso do termo tumor misto pela conotação de origem mista, e preferia a denominação “pleomorfo” considerando-a mais apropriada.

Dentre os vários estudos etiopatogênicos dos adenomas pleomorfos, MURATA; TETSUHIKO⁵⁴, em 1966, através de técnicas histoquímicas, demonstraram a localização de fosfatases ácidas e alcalinas, esterase inespecífica, β -glucoronidase, aminopeptidase, desidrogenase succínica em adenomas pleomorfos e glândulas salivares normais. Encontraram um padrão similar de intensidade das reações enzimáticas em ambos grupos estudados. Em glândulas salivares normais, a fosfatase alcalina pôde ser identificada em células mioepiteliais e vasos sanguíneos. A ausência desta enzima nas células neoplásicas sugeriu, segundo os autores, a impossibilidade da origem dos adenomas nas células mioepiteliais. Já a similaridade do padrão de marcação das desidrogenases das estruturas neoplásicas e células ductais normais sugeriu a origem do tumor em elementos ductais ou acinares. A teoria histogênica aceita foi a epitelial.

TAKEUCHI et al.⁸⁷, em 1975, realizaram cultura celular, técnicas histoquímicas, análise bioquímica de glicosaminoglicanas e observações à microscopia eletrônica de adenomas pleomorfos para estabelecer inter-relações entre os aspectos morfológicos e as características biológicas das células neoplásicas. Seus resultados indicaram a presença não somente de sulfato de condroitina 6 e 4, e ácido hialurônico com também heparan sulfato. Entretanto o significado dos achados do estudo não foi inteiramente compreendido pelos autores que associaram a morfologia alongada e a maior atividade proliferativa das células epiteliais à presença do heparan sulfato. Além disso, em 1978⁸⁸, tentaram elucidar a histogênese das células produtoras de glicosaminoglicanas nos adenomas pleomorfos. Para tal, utilizaram a

radioautografia (técnica utilizada para localizar células que incorporam sulfato e provavelmente produzem heparan sulfato) e perceberam que a síntese das glicosaminoglicanas das células neoplásicas foi similar à observada nas glândulas salivares normais e sialoadenites das células acinotubulares, comprovando sua origem epitelial nas células dos ductos ou ácinos glandulares⁸⁸.

Conforme a evolução destes e outros estudos e a partir do estabelecimento do consenso geral da origem epitelial da neoplasia, o termo adenoma pleomorfo tornou-se mais adequado, com determinada variação nos livros e publicações em língua portuguesa para adenoma pleomórfico³⁹, termo não é encontrado nos dicionários.

Para analisar a presença das células plasmocitóides ou hialinas em adenomas pleomorfos de glândulas salivares maiores e menores e discutir sua natureza, BUCHNER; DAVID; HANSEN¹¹, em 1981, avaliaram cortes microscópicos corados em HE. Estas células apresentaram-se ovais ou poliédricas com um núcleo excêntrico e citoplasma homogêneo eosinofílico sem granularidade distinguindo-as dos oncócitos. A partir da observação de filamentos intermediários no citoplasma das células plasmocitóides à microscopia eletrônica de transmissão, os autores sugeriram que estas são células mioepiteliais modificadas e pelas características de suas organelas, talvez representassem células em degeneração.

Localizar as proteínas denominadas específicas do sistema nervoso: proteína S-100, proteína glial ácida fibrilar e astroproteína em adenomas pleomorfos foi o objetivo do estudo de NAKAZATO et al.⁵⁷, de 1982, através de técnicas imuno-histoquímicas. Houve a presença de imunopositividade para as proteínas nos adenomas estudados, com especial atenção à proteína S-100. Devido à localização

das células marcadas, os autores acreditam que a proteína S-100 evidenciou células de linhagem mioepitelial.

O estabelecimento da presença de células neoplásicas epiteliais e mioepiteliais no adenoma pleomorfo enquadró-o como uma neoplasia composta (com dois tipos celulares), e não mista (com dois folhetos embrionários) como o denominavam^{7,27}.

Comparando as características ultraestruturais de áreas epiteliais sólidas e regiões estromais de 24 adenomas pleomorfos, tanto de glândulas salivares menores como de glândulas salivares maiores, DARDICK et al.¹⁸, em 1983, procuraram investigar o padrão de crescimento, organização e modificação das células neoplásicas e o desenvolvimento inicial da matriz intercelular. Ainda desenvolveram um modelo histogênico cujo início é representado por um ducto intercalar, cujas células mioepiteliais ao iniciarem o desenvolvimento da neoplasia permanecem ao redor das células luminais e proliferam-se formando ilhotas sólidas. A partir da deposição de matriz intercelular e seu acúmulo, as células vão distanciando-se, diferenciando-se e revelando padrões mixóides, condróides, mucóides, osteóides ou fibroialinos conforme a produção das células mioepiteliais diferenciadas. Os autores postularam que os adenomas pleomorfos resultam da transformação neoplásica da unidade ducto-acinar completa ao invés de uma célula ductal em particular.

Na segunda parte de seu trabalho experimental¹⁹, avaliaram mais precisamente as áreas estromais. Durante a análise ultra-estrutural das células das áreas condromixóides, observaram no interior das células estruturas como tonofilamentos e desmossomos, e ainda, lâmina basal (características epiteliais). A partir da inter-relação destas observações com os achados das células das áreas de

transição entre porções sólidas celulares e estromais dos adenomas pleomorfos, os autores afirmaram que as principais células neoplásicas das regiões condromixóides eram células mioepiteliais¹⁹.

Frente à dificuldade na distinção entre as células epiteliais e mioepiteliais do adenoma pleomorfo, levando em consideração o interesse em sua identificação, TRIANTAFYLLOU⁹⁰, em 1986, tentou através da histoquímica, marcar as células mioepiteliais com amido-preto e azofloxina, ainda não testadas em glândulas salivares. A marcação foi positiva em células alongadas do estroma, células ovais em ilhotas sólidas e células alongadas ao redor de estruturas tubulares, as quais foram consideradas pelo autor como mioepitélio neoplásico.

O epitélio estratificado pavimentoso possui zonas de distribuição da queratina em seus diferentes pesos moleculares, sendo os menores pesos moleculares encontrados nas camadas basais e os altos pesos moleculares nas camadas espinhosa e granulosa⁵². No estudo de MORI et al.⁵² observou-se a marcação similar nos ductos glandulares e nas estruturas ductiformes dos adenomas pleomorfos analisados com positividade para queratina de baixo e alto peso molecular. A marcação irregular pela queratina de diversos pesos moleculares nas células de origem mioepitelial segundo os autores sugere a existência de diferentes níveis de diferenciação destas células.

SAKU et al.⁷³ acreditavam que as moléculas da membrana basal contribuíam para a variedade morfológica do componente estromal dos adenomas pleomorfos. Estes autores encontraram na matriz extracelular dos adenomas estudados quatro tipos de constituintes da membrana basal: colágeno tipo IV, laminina, heparan sulfato e entactina. A entactina foi observada ao redor de células mioepiteliais dispersas no estroma condróide. O colágeno tipo IV e a laminina

apresentaram maior positividade nos estromas hialinos e fibrosos enquanto o heparan sulfato foi mais expressivo nos estromas mixóides e condróides sugerindo a participação destas moléculas na diversidade dos padrões da matriz extracelular dos adenomas pleomorfos.

A técnica de AgNOR foi utilizada por FUJITA; TAKAHASHI; OKABE²⁵, em 1992, com a finalidade de estabelecer a atividade proliferativa de adenomas pleomorfos e glândulas salivares, compará-las e correlacionar esta atividade com os aspectos microscópicos dos adenomas. Os ductos intercalares foram as estruturas com maior número de dots de AgNOR nas glândulas salivares normais. Em adenomas pleomorfos, os amontoados sólidos de células demonstraram maior atividade proliferativa, sendo também associados à transformação maligna. A diminuição da capacidade proliferativa das áreas mais populosas de células para as mais esparsas relaciona-se ao grau de diferenciação celular e à atividade secretória, segundo os autores.

FLISS et al.²⁴, em 1992, compararam as características morfológicas, com especial atenção à cápsula, de adenomas pleomorfos localizados superficial e profundamente na parótida, com o intuito de apresentar suas diferenças prognósticas. Segundo os autores os adenomas pleomorfos profundos permitem que o tratamento indicado seja a enucleação simples da lesão. As neoplasias superficiais demonstraram neste trabalho uma tendência a invadirem mais a cápsula e também a serem mais agressivas com relação à recorrência. Os tumores profundos apresentaram cápsula madura e sua menor invasão pelas células neoplásicas, características estas, justificadas pelos autores pela localização anatômica, estando os lóbulos profundos circunscritos pelo osso temporal superiormente, músculos

vertebrais e pré-vertebrais, lateralmente pela mandíbula, posteriormente pelo digástrico e pterigóide medial possibilitando uma resposta tecidual eficiente na contenção dos adenomas pleomorfos.

Através de técnica imuno-histoquímica para marcação da proteína óssea morfogenética (BMP) em adenomas pleomorfos, LIANJIA et al.⁴⁴, em 1993, encontraram positividade em um número limitado de células mioepiteliais modificadas: plasmocitóides e células fusiformes em estruturas hialinas sugerindo que certas células mioepiteliais, que produzem BMP, podem sofrer alterações condróides. Segundo os autores, provavelmente as características condroosteóides dos adenomas pleomorfos resultem da interação das proteínas ósseas morfogenéticas com as glicosaminoglicanas e o cálcio.

As alterações genéticas nos oncogenes *c-myc*, *c-Ha-RAS*, *c-erbB-2* e *c-sis* nos adenomas pleomorfos foram alvo do estudo de XUE et al.⁹⁹, de 1993. Estes genes, direta ou indiretamente participam da divisão celular e sua alteração poderia representar o início do desenvolvimento de uma neoplasia. Os autores encontraram superexpressão dos genes *c-myc*, *c-Ha-RAS*, *c-erbB-2*. A superexpressão do *c-myc* pode levar a célula a reiniciar o ciclo celular e proliferar, já o gene *ras* pode alterar a transdução de sinais transmembrana, que ao sofrer uma mutação pode levar à ativação do gene *c-Ha-RAS*, também importante na proliferação celular.

CHIDZONGA; PEREZ; ALVAREZ¹⁴, em 1995, avaliaram fichas clínicas e cortes microscópicos de 206 adenomas pleomorfos dentre outras lesões glandulares. Houve maior predominância do gênero feminino, com a faixa etária variando de 21 a 50 anos. Segundo os autores, 39,8% dos adenomas pleomorfos ocorrem em parótida, e 26,7% em palato. O tempo de evolução da lesão foi em

média de dois anos e meio e o tratamento foi variado conforme as indicações de parotidectomia parcial, total, submandibulectomia total e enucleação local da lesão em palato. Devido à perda do acompanhamento dos pacientes após três anos de cirurgia, os autores não avaliaram os índices de recorrência.

De todos os adenomas pleomorfos, 50% apresentam normalidade citogenética, mas anormalidades são encontradas, principalmente aberrações nos cromossomos 8 e 12³⁶. KOOLS et al.³⁶, em 1995, realizaram estudo para mapear a região 12q13-q15 através da técnica de FISH (*fluorescence in situ hybridization*), com o objetivo de identificar um possível gene envolvido na patogênese do adenoma pleomorfo. Perceberam que, no cromossomo 12 dos adenomas pleomorfos, os possíveis locais de descontinuidade do gene para o estabelecimento de uma mutação distribuem-se em uma longa região do DNA ultrapassando a região preestabelecida.

MATSUSHITA et al.⁴⁷ estudaram os fatores de proliferação fibroblásticos (FGFs) divididos em ácidos e básicos, segundo seus pontos isoeletrônicos, através de técnicas imuno-histoquímicas, cromatografia e análise por *Western blot* em cultura de células. As células ductais de glândulas parótidas normais e as células neoplásicas luminais dos adenomas pleomorfos de parótida foram positivas para os FGFs. Através da inter-relação deste fato com os resultados obtidos a partir da estimulação das células em cultura, os autores sugeriram que os FGFs estimulam a proliferação celular.

SAVERA; GOWN; ZARBO⁷⁶ estudaram imuno-histoquimicamente a expressão da actina muscular (α -SMA), cadeias pesadas de miosina de músculo liso (SMMH) e calponina em adenomas pleomorfos para marcar seletivamente células mioepiteliais e analisar a importância destas células na morfologia destas neoplasias.

Os autores perceberam que somente algumas células mioepiteliais neoplásicas bem diferenciadas eram positivas para a α -SMA e SMMH. Também puderam notar a ausência de marcação por estes anticorpos nas áreas condróides, áreas mixóides e ilhotas de células epitelióides. Já a calponina foi expressa na maioria das células mioepiteliais bem diferenciadas e em parte das células menos diferenciadas, como por exemplo, células plasmocitóides, células metaplásicas escamosas, sugerindo sua origem mioepitelial.

Através da análise por *Northern blot*, KAS et al.³³, em 1997, detectaram o gene *PLAG1* (*pleomorphic adenoma gene 1*). Este gene foi identificado como um gene constantemente rearranjado por translocações, envolvendo a região 8q12 em adenomas pleomorfos. A análise pelo *Southern blot* do DNA de adenomas pleomorfos revelou rearranjos em determinada região do gene *PLAG1*, sugerindo a possibilidade do *PLAG1* fusionar-se ao gene posicionado no braço curto do cromossomo três no locus 21 (posição do *CTNNB1*). A fusão ocorria no exon 3 do *PLAG1*, idêntico ao exon 1 do *CTNNB1*, o gene da β -catenina. Os autores utilizaram a técnica RT-PCR para os genes *PLAG1* e *CTNNB1* para amplificarem o RNA de diversos adenomas pleomorfos e demonstraram a expressão do produto da fusão dos dois genes. Segundo os autores, estas alterações podem representar o primeiro exemplo de “*promoter swapping*” em tumores sólidos e desencadear implicações funcionais na fusão dos mRNA e na concentração das proteínas expressas por estes genes nas células neoplásicas.

39% dos adenomas pleomorfos com alteração genética apresentam rearranjos envolvendo a banda 8q12³³. VOZ et al.⁹², em 1998, caracterizaram um segundo parceiro de translocação do *PLAG1*, o gene desta localização. O gene

associado ao *PLAG1*, neste estudo, foi o receptor do fator inibitório da leucemia (*LIFR*). Esta translocação leva a superegulação da expressão do gene *PLAG1* sobre o controle do *LIFR*, envolvido na diferenciação, sobrevivência e proliferação de uma variedade de células fetais e adultas. Segundo os autores, interessante a β -catenina e o *LIFR* possuem funções semelhantes e a ligação do *LIFR* com a carcinogênese foi descrita pela primeira vez.

GERRARD; DONALDSON²⁶, em 1998, relataram um caso de importância para a concepção deste estudo. Seu paciente acometido pela polipose adenomatosa familiar, apresentava também um adenoma pleomorfo e um melanoma. Estudos já demonstraram a participação da β -catenina na patogênese tanto da polipose adenomatosa familiar como na do melanoma⁷¹. A polipose adenomatosa familiar é uma doença autossômica dominante caracterizada pelo desenvolvimento de múltiplos pólipos de cólon e reto, normalmente percebida na adolescência⁷¹. A polipose adenomatosa familiar e a doença de Crohn são consideradas fatores de risco para a malignização. A progressão para carcinoma é denominada “*the adenoma – carcinoma sequence*” e é acompanhada por uma série de alterações genéticas bem conhecidas que envolvem a ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumores, como, por exemplo, o gene *APC*, alterando o metabolismo e a função da β -catenina¹⁶. Segundo os autores este foi o primeiro caso de adenoma pleomorfo associado a esta doença relatado na literatura. A análise de rotina de um nevo localizado na pele região parotídea pré-auricular revelou um melanoma maligno, correspondendo a um diagnóstico precoce de fundamental importância ao paciente.

Através de seu estudo utilizando microscopia eletrônica, ZHAO et al.¹⁰¹, em 1999, confirmaram que as próprias células epiteliais produzem diversas

glicosaminoglicanas assim deduzindo que estas células são as responsáveis pela produção do componente mesenquimal do adenoma pleomorfo. As células plasmocitóides, segundo os autores, também produzem glicosaminoglicanas contribuindo na formação das áreas condromixóides.

VOZ et al.⁹³, em 2000, estudando o *PLAG1*, acreditaram que a expressão alterada deste gene reflete-se em genes alvos participando na carcinogênese das neoplasias de glândulas salivares. Os autores sugerem que a ativação transcricional do *PLAG1* em glândulas salivares é responsável pela superexpressão do fator de crescimento peptídico *IGF-II* e que a atividade carcinogênica do *PLAG1* resulta de sua regulação positiva na expressão do *IGF-II*, potente estimulador da proliferação celular em neoplasias humanas.

ALVES et al.⁴, em 2002, preocuparam-se em traçar um perfil clínico, microscópico e imuno-histoquímico dos adenomas pleomorfos de glândulas submandibulares. Clinicamente observaram a presença de área tumefata associada à dor. A idade média foi de 47 anos. Microscopicamente, as neoplasias exibiam abundante estroma condromixóide. A ressecção da glândula associada à neoplasia foi o tratamento de escolha na maioria dos casos. A partir dos achados imuno-histoquímicos, os autores verificaram que os adenomas pleomorfos estudados possuíam baixo índice de proliferação e a ausência da expressão do gene p53 mutante.

A importância dos índices de recorrência de adenomas pleomorfos em glândulas parótidas incentivou KORAL et al.³⁷ a avaliarem 15 casos de adenomas pleomorfos recorrentes após a cirurgia inicial, de dois até 34 anos, com média de 16,3 anos. Através da revisão da literatura e de seus próprios casos, os autores

observaram que as recorrências apresentavam-se múltiplas e acreditaram que após a enucleação, pseudopodes alojados na cápsula são deixados na glândula, originando recorrência multifocal, tanto que em casos com remoção de margem de segurança com tecido sadio, a frequência de recorrência diminui.

Dando continuidade ao seu estudo sobre o gene *PLAG1* dos adenomas pleomorfos, em 2004, VOZ et al.⁹⁴ realizaram estudo para testar os possíveis genes que sofreriam alterações por associação ao *PLAG1*, seja por mutações, translocações, testando 12000 genes, utilizando duas amostras de glândulas salivares normais e dois adenomas pleomorfos. Destes genes testados, 627 apresentaram alguma alteração de expressão nos casos de adenomas pleomorfos avaliados quando comparados com as glândulas salivares. Dos 627 genes, 373 apresentaram-se com maior expressão nos dois adenomas e 254 foram encontrados em menor quantidade. Classificando os genes conforme suas funções, os autores puderam perceber que numerosos aspectos fisiológicos são alterados nos adenomas pleomorfos devido às alterações de expressão de genes para fatores de crescimento, fatores de transcrição, reguladores da apoptose, proteínas sinalizadoras e genes do ciclo celular. Outros genes alterados representam o grupo dos codificadores de proteínas da matriz celular e do citoesqueleto. Segundo os autores o *PLAG1* também regula a angiogênese, sendo de fundamental importância seu papel na patogênese dos adenomas pleomorfos.

2.3 CARCINOMA EX-ADENOMA PLEOMORFO

Dentre as denominações do carcinoma ex-adenoma pleomorfo, nos estudos mais antigos, verificou-se frequentemente o termo tumor misto maligno²⁷, pois se originava do *tumor misto* (adenoma pleomorfo).

Nas publicações atuais na língua inglesa, verifica-se a variação entre duas formas: *carcinoma in pleomorphic adenoma*^{53,56} e *carcinoma ex-pleomorphic adenoma*^{22,70}. Optou-se neste estudo pelo uso do termo carcinoma ex-adenoma pleomorfo que enfatiza a origem de uma neoplasia maligna a partir uma neoplasia benigna.

NAGAO et al.⁵⁶, em 1981, selecionaram uma série de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e analisaram suas características clínicas e microscópicas, comparando-as então, com adenomas pleomorfos sem transformação maligna. Os autores encontraram diferenças entre o gênero mais acometido sendo masculino na variante maligna e feminino na benigna. Ainda puderam perceber o aumento da probabilidade de malignização em neoplasias de tamanho superior a cinco centímetros e a tendência da malignização ocorrer em pacientes com mais de 50 anos. Segundo os autores as características microscópicas observadas já vinham sendo descritas na literatura como, por exemplo: invasão capsular, dos tecidos vizinhos, ilhotas de células malignas em áreas de adenoma pleomorfo benigno, envolvimento vascular, figuras de mitose entre outras.

GNEPP²⁷, em 1993, estabeleceu o grupo de adenomas pleomorfos malignos abrangendo três entidades patológicas distintas clínica e microscopicamente: carcinoma ex-adenoma pleomorfo, carcinossarcoma e adenoma pleomorfo metastatizante. O carcinoma ex-adenoma pleomorfo representa a transformação maligna do componente epitelial de uma neoplasia benigna, estando presente na mesma neoplasia ambos componentes. Segundo o autor, com a transformação maligna, a neoplasia adquire algumas características que incluem destruição dos tecidos normais, invasividade, anaplasia, pleomorfismo celular,

mitoses atípicas, padrões anormais e necrose. O carcinosarcoma é definido como o verdadeiro tumor misto onde a transformação maligna ocorre em ambos componentes epitelial e conjuntivo. O adenoma pleomorfo metastatizante representa um adenoma pleomorfo com características morfológicas de benignidade que desenvolve metástases.

Levando em consideração a participação de vários protooncogenes na transformação maligna de diversas neoplasias humanas, DEGUCHI; HAMANO; HAYASHI²⁰, em 1993, preocuparam-se em avaliar a expressão do *c-myc*, *ras*, *p21* e *p53* em adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos. A expressão destas proteínas foi observada em adenomas pleomorfos benignos e a superexpressão, nos carcinomas ex-adenomas pleomorfos. Segundo os autores estas oncoproteínas demonstraram-se importantes no prognóstico dos adenomas pleomorfos com especial referência à transformação maligna.

A utilização de diversas técnicas laboratoriais permitiu a percepção da superexpressão da proteína C-erbB-2, que constitui um receptor de fatores de crescimento, em várias neoplasias humanas¹⁵. COSTA ROSA et al.¹⁵, em 1996, avaliaram a expressão desta proteína em carcinomas ex-adenomas pleomorfos e compararam os achados nas porções malignas e benignas de cada lesão. Os autores demonstraram a forte marcação positiva do c-erbB-2 nas áreas de alto grau de malignidade e verificaram a negatividade nas áreas carcinomatosas de baixo grau de malignidade. Sugeriram que a proteína pode ser associada ao prognóstico da lesão e a amplificação do gene *c-erbB-2* associada à transformação maligna do adenoma pleomorfo.

LI et al.⁴³, em 1997, pela técnica de FISH procuraram avaliar anormalidades no cromossomo 17 e no gene *p53* em carcinomas ex-adenomas pleomorfos. A monossomia do cromossomo 17 foi mais freqüentemente observada nos adenomas pleomorfos em comparação aos tecidos glandulares controles. Segundo os autores, a perda do cromossomo 17 pode participar no processo de transformação maligna dos adenomas pleomorfos. Os autores perceberam a maior ocorrência da polissomia do cromossomo 17 em carcinomas ex-adenomas pleomorfos em comparação aos adenomas benignos e esta polissomia associou-se a mutações (deleções) no gene *p53*.

FÉLIX et al.²³, em 1999, compararam a marcação imuno-histoquímica de laminina e colágeno tipo IV em adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos verificando o aumento de laminina nos carcinomas em comparação aos adenomas sugerindo uma associação entre as propriedades metastáticas e esta molécula da matriz extracelular. O colágeno tipo IV ao redor das células neoplásicas foi mais encontrado nos carcinomas ex-adenomas pleomorfos suportando a hipótese de sua participação na capacidade de migração celular e invasão dos tecidos pelas células neoplásicas.

As células neoplásicas bizarras em adenomas pleomorfos benignos foram alvo do estudo de TAKEDA⁸⁶, de 1999, que encontrou esta característica em quatro (2,9%) espécimes de sua amostra composta por 137 adenomas. O autor verificou a origem mioepitelial destas células, positivas para S100 e vimentina. Não houve diferença significativa na marcação pelo MIB-1 em adenomas com e sem células bizarras. Segundo o autor, a distinção entre os adenomas pleomorfos com células bizarras e os carcinomas ex-adenomas pleomorfos deve ser realizada em todos os

espécimes enviados para análise e o termo adenoma pleomorfo com células bizarras deve ser utilizado quando de sua ocorrência.

HARADA²⁸, em 2000, avaliou as características morfológicas de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e estabeleceu os possíveis fenótipos dos carcinomas desenvolvidos: adenocarcinoma, carcinoma espinocelular, carcinoma ductal, adenocarcinoma de baixo grau, carcinoma epitelial mioepitelial, carcinoma sarcomatóide, carcinossarcoma. Segundo o autor, a frequência de malignização aumenta como resultado da permanência do adenoma pleomorfo sem tratamento precoce.

O local de desenvolvimento do carcinoma ex-adenomas pleomorfos é desconhecido. OHTAKÉ et al.⁶⁰, em 2002, avaliaram a presença e distribuição de células atípicas em adenomas pleomorfos encontrando 51% dos tumores estudados com esta característica. A morfologia das células atípicas sugeriu, segundo os autores, história de mitose anormal, portanto acreditam que estas células são mais encontradas em áreas de proliferação intensa e agressiva e justificando sua predominância em ilhotas sólidas em comparação às áreas mixocondróides. Ao observar cortes preparados imuno-histoquimicamente com anticorpos para p53 e PCNA, os autores identificavam maior número de células atípicas em comparação aos cortes corados por hematoxilina e eosina. Provavelmente, as ilhotas com concentração de células atípicas representam um foco de possível malignização ou um carcinoma ex-adenoma pleomorfo em sua fase inicial, sendo necessária, segundo os autores, a atenção à presença destas células atípicas nos adenomas pleomorfos.

Os genes *BRCA1* (gene do câncer de mama-1), FGF- 9 (gene do fator de crescimento fibroblástico – 9) e do retinoblastoma localizam-se nos cromossomos

13q1-2 e 15q1⁵³. No estudo de MORIO et al.⁵³, de 2002, as alterações genéticas no componente benigno dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos foram encontradas nestes locais. Estes resultados, segundo os autores sugerem que o aumento no número de anormalidades ou o acúmulo de aberrações cromossômicas podem estar relacionados à carcinogênese ou à transformação maligna destas lesões.

WEBER et al.⁹⁵ em 2002, hipotetizaram que uma metilação em genes promotores poderia causar uma indução do aumento da renovação celular afetando a fase de transição G1/S do ciclo celular. A partir do aumento da proliferação celular, as células epiteliais do adenoma pleomorfo poderiam apresentar maior risco de adquirir outras alterações genéticas ou citogenéticas estabelecendo o quadro de transformação maligna em carcinoma ex-adenoma pleomorfo.

SALEH, et al.⁷⁴, em 2003 descreveram as características imuno-histoquímicas de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e adenomas pleomorfos com relação à expressão do N-CAM (*neural cell adhesion molecule*), ou seja, molécula de adesão celular neural. Sua expressão pode diminuir o potencial invasivo das células neoplásicas. Os autores perceberam a expressão da proteína nas células luminárias diferenciadas das estruturas ductiformes com duas camadas nos quatro casos de adenomas pleomorfos, enquanto que nos casos de carcinomas a expressão foi quase nula, em algumas áreas dispersa pelo remanescente benigno, o que os levou a sugerir uma função supressora de tumor para o N-CAM e sua utilização para auxiliar no diagnóstico de carcinomas ex-adenomas pleomorfos incipientes.

Entretanto, em 2004, no estudo de PERSCHBACHER, et al.⁶⁵, os cinco casos de adenomas pleomorfos foram negativos para a molécula de adesão neural, enquanto que sua expressão foi observada em 31,4% dos 22 casos de carcinomas

adenóides císticos principalmente em células mioepiteliais, em 11 dos 13 adenocarcinomas polimorfos de baixo grau nas células mioepiteliais e algumas células luminais. Ambos trabalhos utilizaram anticorpo da mesma marca comercial, diferenciando-se na metodologia de recuperação antigênica, entretanto, ambos com controle positivo da reação.

2.4 β -CATENINA

As células epiteliais são unidas por proteínas transmembrana de ligação, as quais representam uma grande família de moléculas de adesão célula-célula Ca^{2+} dependentes, chamadas caderinas³. As caderinas que foram sendo descobertas receberam o nome de acordo com os principais tecidos onde foram encontradas: E-caderina está presente em vários tipos de células epiteliais. Um domínio citoplasmático altamente conservado destas E-caderinas interage com o córtex de actina através de, pelo menos, três proteínas de ligação intracelular chamadas catenina³.

Em seu estudo sobre a E-caderina (também chamada de uvomorulina), VESTWEBER; KEMLER⁹¹, em 1984, sugeriram que a uvomorulina representasse uma importante molécula reguladora dos mecanismos de adesão celular dos epitélios. Os autores observaram que se utilizando um anticorpo para a uvomorulina, um padrão de quatro pesos moleculares protéicos era reconhecido: 123, 102, 92, e 84kDa. A partir daí, OZAWA; BARIBAULT; KEMLER⁶⁴, em 1989, detectaram em seu estudo três proteínas (102, 88 e 80 kDa) que formavam complexos com a uvomorulina, ou E-caderina, através de seu domínio citoplasmático. Os autores, diante de um novo grupo de proteínas propuseram a nomenclatura catenina α , β e γ .

Acreditaram que estas proteínas eram a base molecular da ancoragem das caderinas ao citoesqueleto, uma vez que, NAGAFUCHI; TAKEICHI⁵⁵, em 1988 propuseram que o domínio citoplasmático das E-caderinas regularia a função de adesão celular provavelmente através da interação com componentes do citoesqueleto.

NORRIS et al.⁵⁹, em 1996, caracterizaram o gene da β -catenina (*CTNNB1*). Este gene localiza-se na posição 3p21. Compõe-se de 12 introns separando 13 exons. Os autores sequenciaram 10 dos 12 introns, pois acreditam que os demais são extremamente extensos, dificultando sua amplificação pela técnica de PCR.

RUBINFELD et al.⁷¹ em 1997, observaram acúmulos anormais de β -catenina em sete de 26 linhagens de células de melanomas humanos. Estes autores tentaram encontrar os possíveis fatores que levassem à superexpressão da proteína nas células neoplásicas e perceberam que havia mutações no gene da β -catenina, e também no gene *APC* (*adenomatous polyposis coli, um gene supressor de tumor*). A ligação da β -catenina com o Lef (*lymphoid enhancer factor*) foi outro achado do estudo dos autores que acreditam que o aumento da concentração celular da β -catenina interfere na progressão dos melanomas.

Segundo POLLACK et al.⁶⁷, em 1997, durante a organogênese, o rearranjo celular tem papel fundamental na morfogênese e tubulogênese, processos indispensáveis na formação de órgãos como pulmão, fígado, pâncreas, glândulas mamárias. Para avaliar o papel da β -catenina na morfogênese epitelial utilizaram células de rim canino e perceberam que a β -catenina liga-se à proteína APC em sua porção NH₂-terminal, e participa do desenvolvimento normal dos túbulos. Sua interação atua diretamente na organização dos microtúbulos que são necessários para a formação e estabilização de extensões celulares durante a tubulogênese.

Posteriormente, verificou-se que além de participar como constituinte das junções aderentes, a β -catenina citoplasmática liga-se à proteína do gene APC, gene supressor de tumor, importante regulador positivo para apoptose, para ser degradada⁹.

ORFORD; ORFORD; BYERS⁶² em 1999 avaliando o papel da β -catenina em suas interações com o Wnt/Wn e o APC, acreditaram que ela poderia inibir a apoptose. Através da análise da expressão e das consequências da superexpressão de β -catenina em culturas de células de rim canino observaram que a superexpressão da β -catenina alterou a morfologia celular induzindo um processo denominado de EMT (*epithelial to mesenchymal transition*); estimulou a proliferação celular; atenuou o processo de bloqueio do ciclo celular induzido por radiação bem como inibiu a apoptose induzida por suspensão. Os autores acreditam que nos estádios iniciais da progressão das neoplasias, a ativação da sinalização pela β -catenina promove a formação do adenoma e garante a proliferação e sobrevivência das células epiteliais anormais.

As diferentes interações moleculares da β -catenina e plakoglobina (proteína homóloga à β -catenina com função semelhante na adesão celular e sinalização) na adesão, sinalização e carcinogênese foram alvo do estudo de BEN-ZE'EV; GEISER⁹, em 1998, no qual, algumas evidências permitiram a sugestão de que a atividade supressora de tumores da proteína APC relaciona-se ao seu potencial de proteólise da β -catenina, suprimindo a transcrição oncogênica. Concluíram que as mutações no gene APC, na β -catenina e a superexpressão de caderina-E e α -catenina são fenômenos responsáveis pelo acúmulo de β -catenina no citoplasma e/ou núcleo podendo ativar os mecanismos carcinogênicos da β -catenina com, por exemplo, a

transcrição. Uma vez no interior do núcleo, a β -catenina atua como cofator para transcrição interagindo com os LEF/TCF (*lymphoid enhancer binding factor/T-cell-specific factor*) fatores de transcrição, membros de uma grande família de alta mobilidade arquitetural.

Numerosos estudos avaliando a expressão da β -catenina são encontrados na literatura. Diversas neoplasias e alterações teciduais foram estudadas com relação às características imuno-histoquímicas e até mesmo genéticas desta proteína de adesão celular. Dentre os interessantes estudos associando a β -catenina a fenômenos como transformação neoplásica, invasão e metástase podemos citar os estudos de ZHU, et al.¹⁰², em carcinoma uroteliais e renais; de MONAGHAN et al.⁵⁰, em osteomas osteóides, osteossarcomas, condroblastomas e condrossarcomas; de BRYDEN et al.¹⁰, em cânceres primários de próstata e metástases ósseas; de SUGIO et al.⁸⁴, e SEKINE et al.⁷⁹, em blastomas pulmonares, carcinoma de pulmão e micrometástases na medula óssea; de INAGAWA et al.³¹, em carcinomas hepatocelulares; de RYU et al.⁷² nas alterações fenotípicas dos condrócitos; de LEE et al.⁴⁰, em carcinomas de ovário; de MORENO-BUENO et al.⁵¹, em hiperplasias endometriais atípicas, carcinomas endometriais e carcinomas não-endometriais; de XU et al.⁹⁷, em carcinomas tireoideanos da variante morular-cribiforme associados à polipose adenomatosa familiar; de TEJPAR; LI; YU⁸⁹, em fibromatoses abdominais (também denominadas do tipo desmóide); de CATTELINO et al.¹², na morfogênese dos vasos sanguíneos; de KIM³⁴ em lesões adenomatosas no estômago; entre outros. Entretanto restringiu-se a revisão de literatura criteriosa às pesquisas importantes para o melhor entendimento da dissertação e posterior embasamento para discussão.

Investigando a distribuição das integrinas, caderinas e cateninas em carcinomas espinocelulares da cavidade bucal, BAGUTTI; SPEIGHT; WATT⁵, em 1998, não encontraram acúmulos intranucleares de β -catenina. Observaram uma expressão reduzida da E-caderina, das cateninas e integrinas nos carcinomas menos diferenciados. Portanto, sugeriram a necessidade de estudo mais detalhado das consequências da expressão diminuída das cateninas na adesão entre os queratinócitos, proliferação e diferenciação celular utilizando-se modelos *in vitro*.

SHIBUYA et al.⁸⁰, em 1999, analisaram as moléculas de adesão E-caderina, α e β -cateninas em carcinomas adenóides císticos das variantes: trabecular, cribiforme e tubular. Os autores verificaram que a molécula E-caderina esteve presente em todos os casos da amostra enquanto que as α e β -cateninas estiveram ausentes na variante cribiforme, demonstrando que as células neoplásicas dos carcinomas adenóides císticos expressam E-caderina para a adesão intercelular, mas o complexo caderina-catenina pode não estar funcionando, o que facilita a dissociação das células neoplásicas e as metástases.

Através de técnica imuno-histoquímica, PUKKILA et al.⁶⁹, em 2001, avaliaram a marcação das cateninas nos carcinomas espinocelulares da cavidade bucal e faringe. Observaram acúmulos nucleares de β -catenina em 23% dos espécimes preparados cujo controle interno da reação estabeleceu-se pela presença de glândulas salivares e epitélio imunopositivos. Uma menor sobrevida nos casos onde foram observados os acúmulos nucleares foi percebida levando os autores a afirmar que esta foi a primeira descrição de importância da β -catenina nos tumores de cabeça e pescoço.

SHIEH, et al.⁸¹, em 2003, estudando o carcinoma mucoepidermóide, realizaram técnicas imuno-histoquímicas para os anticorpos N, P e E-caderinas, e α , β , e γ -cateninas. Através da inter-relação entre aspectos clínicos e microscópicos os autores estabeleceram correlações entre a expressão alterada destas moléculas de adesão com a sobrevida e prognóstico dos pacientes. A expressão da β -catenina foi significativamente correlacionada com a graduação microscópica, o estágio clínico e a sobrevida do paciente.

O esôfago de Barret é uma complicação do refluxo gastroesofágico de longa duração, no qual o epitélio estratificado pavimentoso da mucosa da região distal do esôfago torna-se metaplásico colunar. Esta alteração aumenta a possibilidade de malignização¹⁶. OSTERHELD et al.⁶³, em 2002, marcaram imuno-histoquimicamente a β -catenina para tentar correlacionar a marcação citoplasmática e nuclear com o prognóstico do paciente com adenocarcinoma do esôfago de Barret. Perceberam que a expressão alterada β -catenina é comum em adenocarcinomas do esôfago de Barret e correlaciona-se com a sobrevida do paciente, o que confirma que a diminuição da β -catenina na superfície celular e sua localização nuclear frequentemente relacionam-se às neoplasias humanas.

SATO et al.⁷⁵, em 2002, utilizaram como metodologia para indução de displasia e carcinoma a adição da substância iniciadora e promotora da carcinogênese 4-nitroquinotina-1-óxido na água administrada aos animais. Após quatro a cinco meses, com o estabelecimento das lesões macroscopicamente na língua dos ratos, os autores compararam a expressão da β -catenina com o anticorpo ki-67 em mucosa normal, displasias epiteliais e carcinomas espinocelulares e analisaram a possível presença de mutações no exon três da β -catenina por PCR na tentativa de obter um

novo critério de análise da possibilidade de transformação maligna da displasia epitelial. Os autores observaram expressão da β -catenina na superfície celular das células epiteliais normais e no citoplasma e núcleo celulares nas áreas de displasia epitelial e carcinoma espinocelular. Apesar das displasias terem apresentado altas taxas de β -catenina nuclear, os autores ressaltaram a importância de outras proteínas na proliferação celular nos períodos iniciais do desenvolvimento das neoplasias bucais. Segundo eles, a mutação no exon três da β -catenina não participa da carcinogênese das neoplasias de cabeça e pescoço. Baseando-se nas características da marcação imuno-histoquímica da β -catenina durante a carcinogênese, consideram que seu acúmulo pode refletir na capacidade de transformação maligna das displasias epiteliais humanas.

A diminuição da expressão da β -catenina em carcinomas laríngeos correlacionou-se diretamente com a diminuição da diferenciação das células neoplásicas do estudo imuno-histoquímico de LOPEZ-GONZALEZ et al.⁴⁵ Segundo os autores, a alteração da expressão da proteína de adesão celular eleva o potencial neoplásico de dispersão, invasão e metástase de carcinomas espinocelulares laríngeos.

Em 2004, KAPLAN et al.³², através de observações em culturas celulares puderam descrever outro recente e importante papel da β -catenina no interior da célula: sua participação na fase de divisão celular mitótica regulando a separação dos centrômeros. Inibindo a expressão da proteína através de manipulação do RNA, os autores verificaram que os centrômeros dividem-se, mas não são capazes de estabelecer a divisão bipolar, permanecendo centralmente localizados. Segundo os

autores, a β -catenina pode regular o dinâmico processo que envolve muitas proteínas estruturais e motoras durante a divisão celular.

3 PROPOSIÇÃO

Através da coleta dos dados das fichas clínicas e análise microscópica de cortes corados em HE dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP dos casos de adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos propusemo-nos a:

- traçar um perfil clínico-microscópico de todos os adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos compreendendo o período de 1963 até 2003 e discuti-lo com base na literatura pertinente;

Utilizando a análise imuno-histoquímica de 16 casos de adenomas pleomorfos, três casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e dez casos de glândulas salivares normais, marcados pela β -catenina propusemo-nos a:

- comparar o perfil imuno-histoquímico de marcação pela β -catenina nos adenomas pleomorfos com um grupo controle contendo glândulas salivares com padrão de normalidade e discutir as possíveis funções da β -catenina no desenvolvimento dos adenomas pleomorfos;

- comparar o perfil imuno-histoquímico de marcação pela β -catenina nos adenomas pleomorfos com um grupo de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e discutir as possíveis funções da β -catenina na transformação maligna do adenoma pleomorfo.

4 Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção e seleção da amostra

A amostra foi selecionada a partir dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do Departamento de Estomatologia da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, compreendendo o período de 1963 a 2003. Foram obtidos 58 casos de adenomas pleomorfos e três casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos.

Foram selecionados os cortes microscópicos de tecidos moles, independentemente da procedência, provenientes de biópsias incisoriais ou excisoriais, sem distinção entre ambas. Estes apresentaram coloração preservada, lâminas e lamínulas sem fraturas, assim como não continham artefatos de técnica que inviabilizassem análise criteriosa. Quando da necessidade de novos cortes, os blocos de parafina correspondentes apresentavam material suficiente e superfície de corte preservada e livre de qualquer tipo de contaminação ou dano.

4.2 Caracterização da amostra

Para cada caso foram registrados e tabulados todos os dados: idade, gênero, localização, tamanho e evolução da lesão, bem como sintomatologia presente. Estas informações foram obtidas a partir das fichas clínicas arquivadas. Todos os dados obtidos foram transcritos para um quadro elaborado para esta finalidade (Figura 1).

4.3 Análise microscópica

4.3.1 Hematoxilina-eosina

Os cortes microscópicos foram corados pela hematoxilina-eosina segundo o protocolo de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica da FOB-USP.

4.3.2 Critérios para a análise microscópica

A observação das diversas características microscópicas foi descritiva, e os dados coletados foram organizados em quadro específico que segue (Figura 1), confeccionado com tópicos e subtópicos dos achados microscópicos, e a maioria foi registrada de acordo com o sua quantidade. Ainda preconizou-se a padronização do aumento das lentes objetivas do microscópio Olympus CH2 utilizado para a observação de cada estrutura em especial, conforme a necessidade de aumento para sua identificação e distinção com outras estruturas. (ver Figura 1). Foram obtidas fotomicrografias em microscópio Zeiss Axioskop 2 Plus e fotomicroscópio Zeiss MC80 DX.

Figura 1 - Quadro elaborado para coleta de dados referentes às características microscópicas das lesões coradas pela hematoxilina e eosina.
* Conforme quantidade Po-pouco M-médio Mt-muito **G-generalizado L-localizado

4.4 Análise imuno-histoquímica

4.4.1 Critérios de seleção da amostra

4.4.1.1 Casos de Adenoma Pleomorfo:

- A. Espécime recente;
- B. Bloco de parafina correspondente com superfície de corte bem conservada e material suficiente para confecção de novos cortes;
- C. Riqueza na diversidade morfológica da lesão, levando-se em consideração todos os possíveis achados microscópicos da lesão.

4.4.1.2 Casos de Carcinomas ex-Adenoma Pleomorfo:

Os únicos três casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos enviados ao Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP por serem casos recentes foram incluídos na amostra.

4.4.1.3 Casos do grupo controle:

Do mesmo arquivo do serviço de anatomia patológica foram selecionados dez blocos de casos de diagnósticos variados como, por exemplo, cisto de retenção mucosa (mucocele e rânula), lábio duplo, glândula sublingual superficialmente localizada, sialolitíase e tecido glandular com padrão de normalidade, perfazendo cinco casos de glândulas salivares menores e cinco de glândulas salivares maiores. Sendo que os critérios seguintes foram utilizados

- A. Espécime recente;

- B. Conter tecido de glândulas salivares com padrão de normalidade;
- C. Bloco de parafina correspondente com superfície de corte bem conservada e material suficiente para confecção de novos cortes.

4.4.2 Técnica imuno-histoquímica

Nos casos selecionados, foi realizada a marcação imuno-histoquímica pelo anticorpo monoclonal β -catenina mAb BD Transduction Laboratories. Foram testadas duas diluições: 1:60 e 1:125; e a diluição ideal foi de 1:125. Para controle positivo da reação foram utilizados espécimes diagnosticados como fibromatoses abdominais. Como controle interno da reação foram utilizados: epitélio pavimentoso estratificado presente em alguns casos, filetes nervosos e ductos glandulares. Para controle negativo da reação não se utilizou o anticorpo primário.

Cortes de três μ m foram obtidos e fixados nas lâminas a 70 °C por 12 horas. Realizou-se desparafinização em xilol (quatro banhos de cinco minutos), hidratação dos cortes em PBS por cinco minutos e a remoção da peroxidase endógena com H₂O₂ 3%, por cinco minutos. A recuperação antigênica foi realizada em steamer, em solução de ácido cítrico pré-aquecida a 2,1%, PH 6.00, por 40 minutos em temperatura de até 100°C. Foi utilizado o sistema de detecção Dako K4001 Envision System anti-mouse labeled polimer HRP. As lâminas foram incubadas em geladeira a quatro graus Celsius *overnight*; ao serem retiradas da geladeira as lâminas foram lavadas com PBS e o cromógeno foi o Diaminobenzidine (DAB) a 0,1% por cinco minutos. Os cortes foram submetidos a um banho em água destilada e os cortes contracolorados com Hematoxilina de Mayer, e montados utilizando-se lamínulas.

4.4.3 Critérios para análise imuno-histoquímica

Foram elaborados quadros específicos com os achados microscópicos passíveis de serem marcados tanto nos adenomas pleomorfos como nos carcinomas ex-adenomas pleomorfos e glândulas salivares (Figura 3 e 4). A marcação foi registrada de acordo com o número de células marcadas e a intensidade da positividade para o marcador em questão através de graduação cruzada (Figura 2), e ainda observou-se presença e controle interno da reação (Figura 3 e 4):

<i>Intensidade de marcação</i>	<i>Quantidade de células marcadas</i>		
	1/3	1/3 - 2/3	> 2/3
Leve	+	++	++
Moderada	++	+++	+++
Intensa	++	+++	++++

Figura 2 - Quadro correspondente à graduação estabelecida para a quantificação da expressão da β -catenina.

Número do Caso														
Marcação da β -catenina			N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S
TECIDO NEOPLÁSICO	Estroma	Mixóide												
		Condróide												
		Mucóide												
		Fibroialino												
		Osteóide												
	Componente epitelial Padrão	Cribiforme												
		Lobular												
		Lençóis												
		Ilhotas e cordões												
		Estruturas acinares												
	Ductos	Simples												
		Duplos												
		Sub. Eosi. Int.												
	Componente mioepitelial	Plasmocitóides												
		Fusiformes												
		Claras												
	Metaplasia	Escamosa												
		Oncocítica												
	Cápsula Fibrosa	Contínua												
		Descontínua												
	Achados de Atipia	Hipercel.												
		Hipercro.												
		Pleomorf.												
		Bizarrismo												
		Viol. Cápsula												
Controle Interno														

Figura 3 - Quadro elaborado para coleta de dados referentes às peculiaridades imuno-histoquímicas dos casos de adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos.

N=Nuclear C=Citoplasmática S=Superfície celular

Número do Caso																
Marcação da β -catenina		N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S
Unidade glandular	Ductos Intercalares															
	Ductos Estriados															
	Ductos excretores															
	Células Acinares Mucosas															
	Células Acinares Serosas															
	Células Mioepiteliais															
Septos Interlobulares	Células Inflamatórias															
	Vasos Sanguíneos															
	Nervos															
	Fibras colágenas															
	Fibroblastos															
Controle Interno																

Figura 4 - Quadro elaborado para coleta de dados referentes às peculiaridades imuno-histoquímicas dos casos do grupo controle de glândulas salivares.

N=Nuclear C=Citoplasmática S=Superfície celular

4.5 Análise estatística

Depois de decorrido um período mínimo de três semanas da primeira observação, todos os cortes microscópicos foram analisados novamente para a realização da avaliação do índice de concordância intra-observador, o teste Kappa³⁸.

Realizamos análise estatística da marcação pela β -catenina em adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos e entre adenomas pleomorfos e glândulas salivares. O teste estatístico selecionado foi *t-student*, considerando significantes os valores de probabilidade inferiores a 0,05.

5 Resultados

5 RESULTADOS

Neste capítulo, consideraram-se os componentes teciduais visualizados na microscopia óptica tanto nos cortes microscópicos corados em H.E. como pela imuno-histoquímica. Os dados foram demonstrados por meio de figuras em forma de quadros e fotomicrografias dos adenomas pleomorfos, carcinomas ex-adenomas pleomorfos e glândulas salivares normais.

5.1 Caracterização da Amostra

A amostra de 58 adenomas pleomorfos, três carcinomas ex-adenomas pleomorfos e dez glândulas salivares normais obtidos a partir dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, compreendendo o período de 1963 a 2003 tiveram as características individualmente apresentadas nos anexos A, B e C. A amostra apresentou as seguintes características.

5.1.1 Relação entre o gênero e a frequência dos Adenomas Pleomorfos

Os casos analisados mostraram expressivo acometimento do gênero feminino onde se observaram 40 casos (69,0%) e apenas 18 deles foram encontrados no gênero masculino (31,0%), figuras 5A e 5B.

5.1.2 Relação entre o gênero e a frequência dos Carcinomas ex-Adenomas Pleomorfos

Aqui também se observou uma maior frequência no gênero feminino com dois casos (66,7%) e um caso do gênero masculino (figuras 5A e 5B).

Lesão/ gênero	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex- Adenoma n=3	
	T	%	T	%
Masc.	18	31,0	1	33,3
Fem.	40	69,0	2	66,7%

Figura 5A - Dados relativos aos gêneros da amostra

Figura 5B - Gráfico referente à caracterização da amostra com relação ao gênero

5.1.3 Relação entre a localização e a frequência dos Adenomas Pleomorfos

Quanto à localização, em 30 casos (51,8%) as lesões estavam no palato, em oito (13,8%), na glândula parótida. Outras localizações significantes foram na mucosa jugal e lábios com oito (13,8%) e cinco (8,6%) casos respectivamente. Em

cinco casos não constava o relato da localização da lesão nos registros (figuras 6A e 6B).

5.1.4 Relação entre a localização e a frequência dos Carcinomas ex-Adenomas Pleomorfos

Quanto à localização, os três casos (100%) estavam no palato (figuras 6A e 6B).

Lesão/ Localização	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex- Adenoma n = 3	
	T	%	T	%
Palato	30	51,8	3	100
Parótida	8	13,8	0	0
Mucosa Jugal	8	13,8	0	0
Lábio	5	8,6	0	0
Submandibular	1	1,7	0	0
Maxila	1	1,7	0	0
Inf. Ausente	5	8,6	0	0

Figura 6A - Dados relativos à localização das lesões da amostra

Figura 6B - Gráfico referente à caracterização da amostra com relação à localização das lesões

5.1.5 Relação entre a idade e a frequência do Adenoma Pleomorfo

Quanto à idade, os pacientes eram acometidos com maior frequência entre as terceira e quinta décadas de vida. Em seguida, as segunda e sexta décadas de vida foram igualmente representativas na ocorrência da lesão com 8,6% dos casos. Em seis registros não foi relatada a idade (figuras 7A e 7B).

5.1.6 Relação entre a idade e a frequência do Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo

Um pouco diferente dos resultados apresentados para os adenomas pleomorfos, nos carcinomas ex-adenomas pleomorfo os pacientes eram acometidos em idades mais avançadas (figuras 7A e 7B).

Lesão/ década de vida	Adenoma n = 58		Carcinoma ex- Adenoma n =3	
	T	%	T	%
Primeira	1	1,7		
Segunda	5	8,6		
Terceira	10	17,4		
Quarta	10	17,4		
Quinta	13	22,4		
Sexta	5	8,6	1	33,3
Sétima	4	6,8	1	33,3
Oitava	3	5,1		
Nona	1	1,7		
Inf. Ausente	6	10,3	1	33,4

Figura 7A – Dados relativos à faixa etária de ocorrência das lesões

Figura 7B – Gráfico referente à caracterização da amostra com relação faixa etária de ocorrência das lesões

5.1.7 Relação entre o tamanho e a frequência do Adenoma Pleomorfo

Nesta lesão, 17,4% das neoplasias possuíam menos de dois centímetros de diâmetro enquanto que 20,5% enquadraram-se entre dois e três centímetros e 18,9% eram maiores. Estando ausente nos demais casos. (figuras 8A e 8B).

5.1.8 Relação entre o tamanho e a frequência do Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo

Dois (66,7%) de nossos carcinomas ex-adenomas pleomorfos eram menores que dois centímetro de diâmetro e o restante não continha informação a respeito nos registros (figuras 8A e 8B).

Lesão/ Tamanho	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex- Adenoma n = 3	
	T	%	T	%
Menor que 2 centímetros de diâmetro	10	17,4	2	66,7
Entre 2 e 3 centímetros de diâmetro	12	20,5	0	0
Maior que 3 centímetros de diâmetro	11	18,9	0	0
Inf. Ausente	25	43,1	1	33,3

Figura 8A – Dados relativos ao tamanho das lesões da amostra

Figura 8B – Gráfico referente à caracterização da amostra com relação ao tamanho das lesões

5.1.9 Relação entre o tempo de evolução e a frequência do Adenoma Pleomorfo

Segundo informações registradas, seis (10,3%) pacientes conviveram mais de oito anos com a neoplasia. Outros seis casos tiveram evolução de menos de um ano de duração até o momento do diagnóstico, enquanto que 19 (32,7%) permaneceram com a lesão entre um e oito anos. Em 27 registros não foi relatado o tempo de evolução (figuras 9A e 9B).

5.1.10 Relação entre o tempo de evolução e a frequência do Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo

Dois (66,7%) dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos tiveram evolução de seis meses, enquanto que um caso não continha informação a respeito nos registros (figuras 9A e 9B).

Lesão/ Evolução	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex-Adenoma n = 3	
	T	%	T	%
Até 1 ano	6	10,3	2	66,7
Entre 1 e 4 anos	14	24,1	0	0
Entre 4 e 8 anos	5	8,6	0	0
Entre 8 e 12 anos	2	3,5	0	0
Entre 20 e 24	2	3,5	0	0
Entre 28 e 32	2	3,5	0	0
Inf. Ausente	27	46,5	1	33,3

Figura 9A – Dados relativos à evolução das lesões da amostra

Figura 9B – Gráfico referente à caracterização da amostra com relação à evolução das lesões

5.1.11 Relação entre a sintomatologia e a frequência dos Adenomas Pleomorfos

Os casos analisados mostraram ausência de sintomatologia em 30 casos (51,8%) e apenas três deles (5,1 %) queixaram-se de dor (figuras 10A e 10B).

5.1.12 Relação entre a sintomatologia e a frequência dos Carcinomas ex-Adenomas Pleomorfos

Não houve sintomatologia presente nos registros nos casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos (figuras 10A e 10B).

Lesão/ Sintomatologia	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex- Adenoma n=3	
	T	%	T	%
Presente	3	5,1	0	0
Ausente	30	51,8	1	33,3
Inf. ausente	25	43,1	2	66,7

Figura 10A - Dados relativos à presença de sintomatologia nas lesões da amostra

Figura 10B - Gráfico referente à caracterização da amostra com relação à presença de sintomatologia nas lesões

5.2 Análise microscópica em H.E.

5.2.1 Revestimento epitelial correspondente à mucosa bucal nos Adenomas Pleomorfos

Na figura 11, encontramos dados referentes ao revestimento epitelial da mucosa bucal. Vinte e cinco dos 58 casos analisados destes tumores eram revestidos por epitélio estratificado pavimentoso; em 30 casos, o epitélio estava ausente. Dos 58 adenomas pleomorfos, três (5,1%) apresentavam ulceração no epitélio (figura 11).

5.2.2 Revestimento Epitelial correspondente à mucosa bucal do Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo

No carcinoma ex-adenoma pleomorfo, o revestimento epitelial esteve presente em um dos três casos analisados e apresentava-se pavimentoso estratificado. Não se observou ulceração superficial em nenhum dos casos (figura 11).

Lesão/Epitélio	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex-Adenoma n = 3	
	T	%	T	%
Ep. strat. Pavimentoso	25	43,1	1	33,3
Epitélio ulcerado	3	5,1	0	0
Epitélio ausente	30	51,8	2	66,7

Figura 11 – Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao epitélio das lesões

5.2.3 Adenoma Pleomorfo: aspectos morfológicos conjuntivos

Entre outros achados, nos cortes examinados, em sua porção glandular foram encontrados ácinos mucosos e serosos de glândulas salivares em 31 casos (53,5%), estando ausentes nos demais. A presença de fibrose intersticial nos casos de existência de tecido glandular perfaz um total de 15 casos (25,8%). Um infiltrado inflamatório na maioria das vezes difuso distribuído por entre as estruturas glandulares foi observado em 14 casos. A proximidade dos tecidos glandulares com a neoplasia (figura 23), permitindo uma relação de íntima associação foi notada em oito casos (13,8%) dos 58 analisados (figura 12).

5.2.4 Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo: aspectos morfológicos conjuntivos

No Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo não houve a presença de nenhum achado em sua porção glandular, estando ausente nos três (100%) casos analisados (figura 12).

Lesão/Tecido glandular	Adenoma Pleomorfo n = 59				Carcinoma ex-Adenoma n = 3			
	Presente		Ausente		Presente		Ausente	
	T	%	T	%	T	%	T	%
Ácinos Mucosos e/ou Serosos	31	53,5	27	46,5	0	0	3	100
Fibrose intersticial	15	25,8	43	74,2	0	0	3	100
Infiltrado infl. MN	14	24,1	44	75,9	0	0	3	100
Associação com neoplasia	8	13,8	50	86,2	0	0	3	100

Figura 12 – Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao tecido glandular normal das lesões

5.2.5 Adenoma Pleomorfo: componente neoplásico

Quanto ao tipo estromal, observou-se na maioria dos casos a predominância do estroma fibroialino com 28 dos casos (48,4%) com grande quantidade deste componente. As quantidades média e pouca do estroma fibroialino somaram 19 casos. Sua ausência perfez 11 casos da amostra analisada. Em seguida, grande quantidade de estroma mixóide foi observada em 20 casos (34,5%). Sua presença em relevância pequena e média ocorreu em 20 casos, estando ausente nos demais casos observados. Uma totalidade de 19 adenomas apresentou alguma quantidade de estroma condróide, sendo que a maioria (nove casos) demonstrava este componente em pequena quantidade e seis, em grande quantidade. Os estromas mucóide e osteóide foram os menos freqüentes, com 5 e 2 casos respectivamente, como mostra a figura 13. Um caso contendo estroma condróide, osteóide e mixóide pode ser observado na fotomicrografia da figura 18.

A presença de grande quantidade células adiposas no interior da lesão foi observada em dois casos e em menor relevância, em dez casos. Algumas células

adiposas podem ser vistas na figura 17. Na maioria dos casos não houve infiltração da neoplasia por células inflamatórias mononucleadas exceto em 15 casos que variaram em intensidade, sendo na maioria leve.

Os pequenos vasos sanguíneos neoformados foram marcadamente observados em 24 dos casos (41,5%). Alguns adenomas pleomorfos apresentaram-se menos irrigados no total de 19 (32,7%).

Somente dois casos apresentaram forte presença do padrão cribiforme de organização das células epiteliais e dois com pequenas áreas com esta característica, que esteve ausente nos demais. O padrão de organização das células epiteliais formando redes foi pouco freqüente, com dois casos com sua marcante presença. Avaliando as células de citoplasma claro, 38 (65,5%) demonstraram ausência e 20 casos a presença de células claras em organização acinar como exemplificada na figura 20, variando a quantidade igualmente entre muita e pouca (nove casos cada). Os padrões de arranjo celular mais freqüentes em grande quantidade foram em lençóis e ilhotas e cordões com respectivamente 25 (43,1%) e 29 (50,1%) casos.

As células epiteliais e mioepiteliais da lesão também se organizaram formando ductos. Dos 58 casos, 43 (74,1%) apresentaram ductos de duas camadas celulares, normalmente com células mioepiteliais claras compondo a camada externa, como ilustrado pela figura 19. Destes, 29 (50,1%), possuíam grande quantidade de ductos duplos. Os ductos de uma só camada estiveram presentes em 33 casos e na maioria das vezes apresentaram-se em pequena quantidade. O lúmen das estruturas ductais continha material eosinofílico em 38 casos, sendo que na maioria das vezes observou-se sua grande quantidade 26 (44,9%). O aumento do diâmetro dos ductos

levando a um padrão de dilatação ductal foi outra característica marcante em 15 (25,8%) dos casos e em menor quantidade em outros 14 casos.

Observou-se a presença de células mioepiteliais claras (figura 20) em grande quantidade em 27 (46,6%) casos. Em seguida, as células mioepiteliais fusiformes ou alongadas como apresentadas na figura 22 marcaram intensa presença em 24 (41,5%). As células mioepiteliais plasmocitóides, demonstradas na figura 21, foram observadas em grande número em 23 casos (39,6%) e estiveram presentes em pequena e média quantidade juntas em 11 casos, enquanto que as claras em seis e as fusiformes em quatro casos.

A metaplasia escamosa das células neoplásicas foi notada em grande quantidade em oito casos. Foi observada em média e pequena quantidade em outros oito casos. Já a metaplasia oncocítica foi menos freqüente, perfazendo nove casos no total, sendo que, somente em um caso esteve presente intensamente.

Lesão/Características		Adenoma Pleomorfo n = 58								
		Ausente		Pouco		Médio		Muito		
		T	%	T	%	T	%	T	%	
Estroma	Mixóide	18	31,1	9	15,5	11	18,9	20	34,5	
	Condróide	39	67,4	9	15,5	4	6,8	6	10,3	
	Mucóide	53	91,3	2	3,5	1	1,7	2	3,5	
	Fibroialino	11	18,9	8	13,8	11	18,9	28	48,4	
	Osteóide	56	96,6	0	0	1	1,7	1	1,7	
	Tecido adiposo	46	79,3	9	15,5	1	1,7	2	3,5	
	Infilt. infl. Predomin. MN	43	74,1	11	18,9	2	3,5	2	3,5	
	Neoformação vascular	1	1,7	19	32,7	14	24,1	24	41,5	
Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	54	93,0	2	3,5	0	0	2	3,5
		Redes	51	88,0	4	6,8	1	1,7	2	3,5
		Lençóis	20	34,5	6	10,3	7	12,1	25	43,1
		Ilhotas e Cordões	11	18,9	11	18,9	7	12,1	29	50,1
		Estruturas acinares	38	65,5	9	15,5	2	3,5	9	15,5
	Ductos	Simples	25	43,1	19	32,7	4	6,8	10	17,4
		Duplos	15	25,8	8	13,8	6	10,3	29	50,1
		Sub. Eosinofílica no Interior	20	34,5	8	13,8	4	6,8	26	44,9
		Dilatados	29	50,1	7	12,1	7	12,1	15	25,8
Componente mioepitelial	Plasmocitóides	24	41,5	6	10,3	5	8,6	23	39,6	
	Fusiformes	30	51,7	1	1,7	3	5,1	24	41,5	
	Claras	25	43,1	6	10,3	0	0	27	46,6	
Metaplasia	Escamosa	42	72,5	3	5,1	5	8,6	8	13,8	
	Oncocítica	49	84,5	7	12,1	1	1,7	1	1,7	

Figura 13 – Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao tecido neoplásico dos adenomas pleomorfos

5.2.6 Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo: componente neoplásico

Em virtude do tamanho de amostra, optamos, neste segmento do capítulo dos resultados, pela descrição das características relevantes de cada um dos três carcinomas ex-adenomas pleomorfos analisados no que tange o componente neoplásico benigno das lesões (Figura 14).

a)Caso 1- Os cortes microscópicos revelam tecido neoplásico com grande quantidade de estroma fibroialino e discreta porção de estroma mixóide com alguns vasos sanguíneos em neoformação. As células epiteliais formam estruturas em lençóis, redes e ácinos em grande quantidade e algumas têm padrão cribiforme. Observam-se muitos ductos duplos, alguns dilatados com média quantidade de material eosinofílico em seu interior e poucos ductos simples. Nota-se predominância de células mioepiteliais claras e muita metaplasia escamosa.

b)Caso 2- Os cortes microscópicos revelam tecido neoplásico com moderada neoformação vascular e de estroma fibroialino; células epiteliais formando grande quantidade de estruturas em lençóis, algumas estruturas ductais com duas camadas e pequena quantidade de material eosinofílico no lúmen. Observam-se ainda, numerosas células plasmocitóides.

c)Caso 3- Os cortes microscópicos revelam tecido neoplásico com moderada neoformação vascular e de estroma fibroialino; células epiteliais formando grande quantidade de estruturas em lençóis; muitas estruturas ductais com duas camadas e grande quantidade de material eosinofílico no lúmen. Notam-se ainda, algumas células plasmocitóides, muitas células mioepiteliais claras formado estruturas acinares além de intensa metaplasia escamosa.

Lesão/Características		Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo								
		n = 3								
		Ausente		Pouco		Médio		Muito		
		T	%	T	%	T	%	T	%	
Estroma	Mixóide	2	66,7	1	33,3	0	0	0	0	
	Condróide	3	100	0	0	0	0	0	0	
	Mucóide	3	100	0	0	0	0	0	0	
	Fibroialino	0	0	0	0	2	66,7	1	33,3	
	Osteóide	3	100	0	0	0	0	0	0	
	Tecido adiposo	3	100	0	0	0	0	0	0	
	Infilt. infl. Predomin. MN	3	100	0	0	0	0	0	0	
	Neoformação vascular	0	0	0	0	3	100	0	0	
Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	2	66,7	0	0	1	33,3	0	0
		Plexiforme	2	66,7	0	0	0	0	1	33,3
		Lençóis	0	0	0	0	0	0	3	100
		Ilhotas e Cordões	3	100	0	0	0	0	0	0
		Estruturas acinares	1	33,3	0	0	0	0	2	66,7
	Ductos	Simples	2	66,7	1	33,3	0	0	0	0
		Duplos	0	0	0	0	1	33,3	2	66,7
		Sub. Eosinofílica no Interior	0	0	1	33,3	1	33,3	1	33,4
		Dilatados	2	66,7	1	33,3	0	0	0	0
Componente mioepitelial	Plasmocitóides	1	33,3	0	0	1	33,3	1	33,4	
	Fusiformes	3	100	0	0	0	0	0	0	
	Claras	1	33,3	0	0	0	0	2	66,7	
Metaplasia	Escamosa	1	33,3	0	0	0	0	2	66,7	
	Oncocítica	3	100	0	0	0	0	0	0	

Figura 14 – Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação ao tecido neoplásico dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos

5.2.8 Adenoma Pleomorfo: componente capsular

Nos adenomas pleomorfos, a cápsula fibrosa contínua foi encontrada em 21 (36,3%) dos casos e sua variante descontínua em 13 (22,4%) dos 58 casos analisados, como observado na figura 15 e 23. Quando presente, observou-se o desrespeito a esta cápsula com infiltração pelo tecido neoplásico em 22 (37,9%) dos casos.

5.2.9 Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo: componente capsular

Nos carcinomas ex-adenomas pleomorfos, a cápsula fibrosa contínua foi encontrada em um (33,3%) dos casos com o desrespeito a esta cápsula pelo tecido neoplásico. Observou-se sua ausência nos outros dois casos.

Lesão/Cápsula	Adenoma Pleomorfo n = 58		Carcinoma ex-Adenoma n = 3	
	T	%	T	%
Contínua	21	36,3	1	33,3
Descontínua	13	22,4	0	0
Ausente	24	41,3	2	66,7
Violação da Cápsula	22	37,9	1	33,3

Figura 15 – Quadro correspondente à caracterização da amostra com relação à cápsula das lesões

5.2.10 Adenoma Pleomorfo: achados de atipia

Nos adenomas pleomorfos, observou-se hiper celularidade localizada em 26 (44,8 %) dos casos e sua variante generalizada em sete casos (12,1%). Já 25 dos casos (43,1%) apresentaram-se com hiper cromatismo localizado enquanto que quatro adenomas demonstraram hiper cromatismo generalizado. O pleomorfismo nuclear e o bizarrismo localizado foram menos freqüentes com dez (17,4%) e cinco (8,6%) respectivamente, enquanto que o pleomorfismo e bizarrismo generalizados estiveram ausentes em todos os casos (figura 16).

5.2.11 Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo: achados de atipia

Nos carcinomas ex-adenomas pleomorfos, observando-se o componente carcinomatoso todos os achados de atipia estiveram presentes em 100% dos casos, na maioria generalizados, acrescentando-se ainda as numerosas mitoses atípicas em 100% das neoplasias malignas verificados na figura 16 e 24.

Lesão/Achados de Atipia	Adenoma Pleomorfo n = 58					
	Ausente		Localizado		Generalizado	
	T	%	T	%	T	%
Hipercelularidade	25	43,1	26	44,8	7	12,1
Hipercromatismo	29	51,1	25	43,1	4	6,8
Pleomorfismo nuclear	48	82,6	10	17,4	0	0
Bizarrismo	53	91,4	5	8,6	0	0
Lesão/Achados de Atipia	Carcinoma ex-Adenoma n = 3					
	Ausente		Localizado		Generalizado	
	T	%	T	%	T	%
Hipercelularidade	0	0	0	0	3	100
Hipercromatismo	0	0	0	0	3	100
Pleomorfismo nuclear	0	0	1	33,3	2	66,7
Bizarrismo	0	0	1	33,3	2	66,7
Mitoses atípicas	0	0	1	33,3	2	66,7

Figura 16 – Quadro correspondente à caracterização dos achados de atipia no tecido neoplásico dos adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos

Figura 17- Adenoma pleomorfo microscopicamente revelando componente epitelial formando ilhotas, cordões e estruturas ductais com estroma fibroialino. Notam-se células adiposas distribuídas no estroma neoplásico. (H.E.; aumento original=10X)

Figura 18- Aspectos microscópicos do adenoma pleomorfo com estroma condróide com células semelhantes aos condrócitos e na área central com focos de mineralização (componente osteóide) e tecido mixóide. (H.E.; aumento original=400X)

Figura 19- Estruturas ductais dos adenomas pleomorfos com duas camadas celulares: internamente as células luminais e externamente células claras mioepiteliais, além de substância eosinofílica no interior do ducto. (H.E.; aumento original=400X)

Figura 20- Adenoma pleomorfo apresentando microscopicamente células claras organizadas em estruturas acinares. (H.E.; aumento original=100X)

Figura 21- Células mioepiteliais plasmocitóides de adenoma pleomorfo. (H.E.; aumento original=400X)

Figura 22- Células mioepiteliais fusiformes dos adenomas pleomorfos (H.E.; aumento original=400X)

Figura 23- Notar a proximidade da neoplasia benigna (adenoma pleomorfo) com a glândula salivar remanescente. Destaca-se a presença de cápsula. (H.E.; aumento original=100X)

Figura 24- Carcinoma ex-adenoma pleomorfo apresentando microscopicamente células neoplásicas do carcinoma espinocelular originado. Destaca-se presença de pérolas córneas. (H.E.; aumento original=100X).

5.3 Análise microscópica imuno-histoquímica da β -catenina

5.3.1 Glândulas salivares normais

O grupo controle, correspondente a cinco glândulas salivares maiores (três sublinguais e duas submandibulares) e cinco glândulas salivares menores (quatro de lábio inferior e uma de lábio superior) (anexo C), demonstrou um padrão parcialmente uniforme, com algumas exceções, de marcação intensamente positivas na grande maioria das células ductais glandulares como observado na figuras 25A e 25B e suas características individuais estão apresentadas nos anexos D e E. A β -catenina não esteve presente no núcleo de nenhuma célula sequer. A diminuição da intensidade e a ausência da marcação em algumas estruturas foram observadas nos ductos estriados de dois casos (40%) de glândulas salivares menores. Verificou-se uma maior marcação dos ductos intercalares mais freqüentemente nas glândulas salivares maiores em comparação às glândulas salivares menores.

Glândulas Salivares Maiores						N=5										
Localização da Marcação		N (%)					C (%)					S (%)				
Intensidade da Marcação		-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+
Unidade glandular	Ductos Intercalares	100					20			20	60	20			20	60
	Ductos Estriados	100								40	60				40	60
	Ductos excretores	100								20	80				20	80
	Cél. Acin. Mucosas	100					100					100				
	Cél. Acin. Serosas	100					100					100				
	Cél. Mioepiteliais	100					60	40				60	40			
Septos Interlobulares	Cél. Inflamatórias	100					100					100				
	Vasos Sanguíneos	100					100					100				
	Nervos	100					60				40		60			40
	Fibras colágenas	100					100					100				
	Fibroblastos	100					100					100				
Controle Interno		100 +														

Figura 25 A– Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos do grupo controle de glândulas salivares maiores

Glândulas Salivares Menores						N=5										
Localização da Marcação		N (%)					C (%)					S (%)				
Intensidade da Marcação		-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+
Unidade glandular	Ductos Intercalares	100					60			40		60			40	
	Ductos Estriados	100							20	20	60			20	20	60
	Ductos excretores	100							20	20	60			20	20	60
	Cél. Acin. Mucosas	100					100					100				
	Cél. Acin. Serosas	100					100					100				
	Cél. Mioepiteliais	100							100					100		
Septos Interlobulares	Cél. Inflamatórias	100					100					100				
	Vasos Sanguíneos	100					100					100				
	Nervos	100					60				40	60				40
	Fibras colágenas	100					100					100				
	Fibroblastos	100					100					100				
Controle Interno		100 +														

Figura 25 B – Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos do grupo controle de glândulas salivares menores

As fotomicrografias das figuras 28 à 31 ilustram os padrões de marcação da β -catenina nas glândulas salivares menores e maiores. O maior aumento (Figuras 29 e 31) revelam detalhes da imunopositividade tanto citoplasmática como na superfície celular.

5.3.2 Adenomas Pleomorfos

A figura 26 e o anexo F (onde as características de cada caso foram expostas individualmente) mostram a variação de padrões de marcação pela β -catenina nos adenomas pleomorfos. Não houve marcação nuclear. Dois demonstraram forte imunopositividade na superfície celular e citoplasma em todas as células epiteliais neoplásicas. Uma totalidade de 18,6% dos adenomas pleomorfos foi completamente imunonegativa. Os demais casos assemelharam-se na intensidade e número de células com a marcação das estruturas ductiformes (Figura 32) e por vezes lençóis e ilhotas e cordões. Um caso contendo uma ilhota em organização

acinar com leve marcação pelo anticorpo pode ser visto na Figura 33. Houve casos isolados de marcação de células mioepiteliais nos seus três tipos.

Adenomas Pleomorfos							N=16									
Marcação da β-catenina		N(%)					C(%)					S(%)				
Intensidade de marcação		-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+
Estroma	Mixóide	100					100					100				
	Condróide	100					100					100				
	Mucóide	100					100					100				
	Fibroialino	100					100					100				
	Osteóide	100					100					100				
Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	100				93,7				6,3	93,7				6,3
		Lobular	100				100					100				
		Lençóis	100				81,2	12,5	6,3			81,2	12,5	6,33		
		Ilh. e cordões	100				62,4	6,3	25,0		6,3	62,4	6,3	25,0		6,3
		Est. acinares	100				93,7				6,3	93,7				6,3
	Ductos	Simples	100				37,4	25,0	12,5	18,8	6,3	37,4	25,0	12,5	18,8	6,3
		Duplos	100				18,6	31,3	18,8	18,8	12,5	18,6	31,3	18,8	18,8	12,5
		Sub. Eosi. Int.	100				100					100				
Compo. Mioepit.	Plasmocitóides	100				93,7		6,3			93,7		6,3			
	Fusiformes	100				87,4		6,3	6,3		87,4		6,3	6,3		
	Claras	100				81,2	6,33			12,5	81,2	6,33			12,5	
Metaplasia	Escamosa	100				81,2	12,5				81,2	12,5				
	Oncocítica	100				100					100					
Cápsula Fibrosa	Contínua	100				100					100					
	Descon.	100				100					100					
Achados de Atipia	Hipercel.	100				100					100					
	Hipercro.	100				100					100					
	Pleomorf.	100				100					100					
	Bizarismo	100				100					100					
	Viol. Cáps.	100				100					100					
Controle Interno		100,0 +														

Figura 26 – Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos de adenomas pleomorfos

5.3.3 Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo

Não houve casos imunonegativos para a β -catenina entre os carcinomas ex-adenomas pleomorfos (Figura 27 e anexo G). As estruturas ductais das áreas de adenoma pleomorfo benignas foram intensamente marcadas (Figura 34). Uma área com metaplasia escamosa imunopositiva pode ser vista na figura 35. As áreas

carcinomatosas, organizadas em lençóis com todas as características de atipia, apresentaram leve marcação pelo anticorpo. Não houve localização nuclear do marcador.

Carcinomas ex-Adenomas Pleomorfos							N=3											
Marcação da β-catenina		N(%)					C(%)					S(%)						
Intensidade de marcação		-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+	-	1+	2+	3+	4+		
Estroma	Mixóide	100					100					100						
	Condróide	100					100					100						
	Mucóide	100					100					100						
	Fibroialino	100					100					100						
	Osteóide	100					100					100						
Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	100					100					100					
		Lobular	100					100					100					
		Lençóis	100						33,3	66,7				33,3	66,7			
		Ilh. e cordões	100					100					100					
		Est. acinares	100					100					100					
	Ductos	Simples	100							33,3	33,3	33,4				33,3	33,3	33,4
		Duplos	100							33,3	33,3	33,4				33,3	33,3	33,4
		Sub. Eosi. Int.	100					100					100					
Compo. Mioepit..	Plasmocitóides	100					100					100						
	Fusiformes	100					100					100						
	Claras	100					33,3		66,7			33,3		66,7				
Metaplasia	Escamosa	100					33,3	33,3	33,4			33,3	33,3	33,4				
	Oncocítica	100					100					100						
Cápsula Fibrosa	Contínua	100					100					100						
	Descon.	100					100					100						
Achados de Atipia	Hipercel.	100						33,33	66,67				33,3	66,7	33,3			
	Hipercro.	100						33,3	66,7				33,33	66,67				
	Pleomorf.	100						33,3	66,7				33,3	66,7				
	Bizarrrismo	100						33,3	66,7				33,3	66,7				
	Viol. Cáps.	100					100					100						
Controle Interno		100 +																

Figura 27 – Quadro correspondente à caracterização da marcação imuno-histoquímica pela β -catenina dos casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos

Figura 28- Aspectos microscópicos imuno-histoquímicos da marcação pela β -catenina nos ductos das glândulas salivares menores do grupo controle. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=100X)

Figura 29- Detalhe dos ductos marcados pela β -catenina das glândulas salivares menores do grupo controle. Destaca-se o padrão de marcação tanto citoplasmático como na superfície celular. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X)

Figura 30- Aspectos microscópicos da marcação pela β -catenina nos ductos das glândulas salivares maiores do grupo controle. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=100X)

Figura 31- Detalhe dos ductos marcados pela β -catenina das glândulas salivares maiores do grupo controle. Destaca-se forte imunopositividade na superfície celular. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X)

Figura 32- Aspectos microscópicos da marcação da β -catenina nas estruturas ductais dos adenomas pleomorfos. Destaca-se a marcação citoplasmática e na superfície das células neoplásicas. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X)

Figura 33- Aspectos microscópicos da imunopositividade para a β -catenina nas estruturas acinares dos adenomas pleomorfos. Destaca-se a leve intensidade da marcação citoplasmática e na superfície das células neoplásicas. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X)

Figura 34- Carcinoma ex-adenoma pleomorfo revelando microscopicamente forte imunopositividade para a β -catenina nas estruturas ductais. (Imuno-histoquímica β -catenina aumento original=400X)

Figura 35- Aspecto da marcação pela β -catenina na superfície das células de ilhota com metaplasia escamosa em carcinoma ex-adenoma pleomorfo. (Imuno-histoquímica β -catenina; aumento original=400X)

5.4 Análise estatística

Os resultados obtidos na análise microscópica foram organizados em tabelas com dados de frequências absolutas. Após no mínimo 21 dias, as análises foram repetidas para aplicação do índice Kappa³⁸, utilizado para avaliação quanto ao nível de concordância de um mesmo observador, de acordo com a Figura 36.

Coefficiente Kappa	Nível de concordância
< 0,00	-
0,00 – 0,20	Baixo
0,21 – 0,40	Médio
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Substancial
0,81 – 1,00	Quase perfeito

Figura 36 - Quadro correspondente ao nível de concordância.

Priorizaram-se os seguintes aspectos sorteados aleatoriamente entre todos os outros observados.

a) Presença do epitélio estratificado pavimentoso (HE)

Para este critério o índice Kappa resultou em 0,92 com nível de concordância classificado como “quase perfeito”.

b) Presença de associação com a neoplasia (HE)

Para este critério o índice Kappa resultou em 0,92 com nível de concordância classificado como “quase perfeito”.

c) Marcação das áreas mixóides (IMUNO)

Para este critério o índice Kappa resultou em 1,0 com nível de concordância classificado como “quase perfeito”.

d) Marcação das ilhotas e cordões (IMUNO)

Para este critério o índice Kappa resultou em 0,92 com nível de concordância classificado como “quase perfeito”.

5.5 Da análise estatística dos resultados imuno-histoquímicos

Optamos pela análise estatística utilizando-se o teste *t-student*, para comparação de dois grupos independentes. Inicialmente comparamos a marcação imuno-histoquímica pela β -catenina em adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos. Para tanto os números de sinais positivos de cada caso transformou-se em uma variável numérica de zero a quatro. Devido à variedade de estruturas morfológicas das lesões optou-se pela verificação somente das estruturas ductais, tanto dos adenomas como dos carcinomas.

Em seguida fizemos o mesmo com relação aos adenomas pleomorfos e glândulas salivares, destas últimas utilizando o número de marcação nos ductos estriados (estrutura com marcação mais representativa do anticorpo neste estudo). Por último, também avaliamos com o teste estatístico o grupo de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e das glândulas salivares.

Os resultados estão expressos na forma de quadros numerados de 37A, 37 B e 37 C. Consideramos estatisticamente significantes os valores de probabilidade inferiores a 0,05. Verificamos diferença significativa somente entre os grupo de glândulas salivares e adenomas pleomorfos. Este resultado corresponde à diminuição considerada estatisticamente significativa da expressão da molécula β -catenina nos casos de adenomas pleomorfos quando comparados com as glândulas salivares. Entretanto, estes dados devem ser avaliados com cautela, pois o número de

carcinomas ex-adenomas pleomorfos é reduzido. Outra constatação foi a tendência da expressão da proteína por células organizadas em estruturas ductais, enquanto que as células das formações celulares sólidas em lençóis e ilhotas e cordões apresentaram menor imunopositividade.

Grupo	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Probabilidade*</i>
<i>Adenoma Pleomorfo</i>	1.750000	1.341640	0.146597
<i>Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo</i>	3.000000	1.000000	

Figura 37A – Quadro referente às informações estatísticas da β -catenina nos casos de adenomas pleomorfos e carcinomas ex-adenomas pleomorfos

Grupo	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Probabilidade*</i>
<i>Adenoma Pleomorfo</i>	1.750000	1.341640	0.000895
<i>Glândulas Salivares</i>	3.500000	0.707106	

Figura 37B – Quadro referente às informações estatísticas da β -catenina nos casos de adenomas pleomorfos e glândulas salivares

Grupo	<i>Média</i>	<i>Desvio padrão</i>	<i>Probabilidade*</i>
<i>Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo</i>	3.000000	1.000000	0.344342
<i>Glândulas Salivares</i>	3.500000	0.707106	

Figura 37C – Quadro referente às informações estatísticas da β -catenina nos casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos e glândulas salivares

* considerando significantes os valores de probabilidade inferiores a 0,05.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

6.1 DA CONCEPÇÃO DO TRABALHO

A partir de um artigo científico que relatou o caso de um paciente com a síndrome da polipose adenomatosa familiar e um adenoma pleomorfo²⁶ e das características da marcação imuno-histoquímica em adenomas de pacientes com a síndrome⁷¹, algumas dúvidas surgiram em relação à possibilidade das diferentes marcações da molécula de adesão nos diferentes padrões morfológicos do adenoma pleomorfo. Marcações estas que refletem a localização, relacionada à função que a β -catenina pode estar exercendo, uma vez que, a mesma compõe as junções celulares epiteliais célula-célula, participa da cascata Wnt/Wn e APC para fosforilação, participa da transcrição no núcleo ligando-se ao LEF/TCF sendo expressa nos seguintes locais: superfície celular, citoplasma e núcleo⁹.

Durante a revisão de literatura para confecção do projeto, verificou-se a importância do marcador como fator de prognóstico em lesões bucais^{5,69,76,80,81,83} dentre outras características relevantes da β -catenina. Realizou-se a pesquisa com o intuito de averiguar os perfis imuno-histoquímicos dos adenomas pleomorfos e compará-los aos das glândulas salivares.

Na literatura pertinente, verificaram-se inúmeros trabalhos que utilizavam a β -catenina em diversas lesões^{10,31,40,50,51,72,79,84,89,97,102}. No que tange à busca de conhecimento na área das junções celulares e carcinogênese de neoplasias de glândulas salivares, observaram-se estudos sobre o carcinoma mucoepidermóide⁸¹ e sobre o carcinoma adenóide cístico⁸⁰. Notou-se a inexistência de pesquisas sobre o

papel da β -catenina nos adenomas pleomorfos de glândulas salivares. A associação da molécula com a transformação maligna e a capacidade metastática de diversas neoplasias humanas^{10,51,80,84} justificaram a inclusão da variante maligna dos adenomas pleomorfos (carcinoma ex-adenoma pleomorfo) no estudo, na tentativa de colaborar com os conhecimentos a respeito da etiopatogenia dessas lesões, o que, nos dias atuais, ainda não está completamente esclarecida^{15,20,60,100}.

6.2 DA METODOLOGIA EMPREGADA

Vários trabalhos com diferentes metodologias têm sido realizados com o objetivo de descrever e caracterizar em detalhes tanto os aspectos clínicos, quanto microscópicos, ultra-estruturais, histoquímicos, imuno-histoquímicos, etiopatogênicos, citogenéticos e genéticos dos adenomas pleomorfos^{7,11,14,29,36}. Para a avaliação da morfologia, sob vários aspectos, diversas colorações já foram utilizadas: hematoxilina-eosina^{29,87}; coloração básica para morfologia; ácido periódico de Schiff (PAS)^{7,29} que cora estruturas ricas em polissacarídeos como glicogênio e mucopolissacarídeos de células mucosas, bem como tecido conjuntivo; azul de toluidina⁷, que confere uma cor homogênea azul à matriz orgânica com pequenas áreas purpúreas; preto do Sudão⁷ que indica a presença de lipídios na matriz orgânica; orceína^{7,29} para evidênciação de fibras elásticas, e van Gieson^{29,87}, para evidenciar substância colágena.

Neste estudo optou-se pela avaliação de uma coloração que fornecesse subsídios para um estudo geral (hematoxilina-eosina), e outra específica que evidenciasse a β -catenina (imuno-histoquímica com anticorpo monoclonal) que permitisse a observação da localização da molécula nas células epiteliais. Dessa

maneira, alguns espécimes selecionados participaram da análise imuno-histoquímica e todos casos da amostra foram avaliados na coloração hematoxilina e eosina.

A escolha do anticorpo para β -catenina deveu-se às diversas propriedades atribuídas a esta molécula de adesão: (1) durante a organogênese, a β -catenina atua diretamente na organização dos microtúbulos que são necessários para a formação e estabilização de extensões celulares no rearranjo celular durante a tubulogênese e morfogênese, processos indispensáveis na formação de órgãos como pulmão, fígado, pâncreas, glândulas mamárias⁶⁷; (2) interage com produtos da família dos fatores linfóides e liga-se ao Wnt/Wn, controlando transcrição e até proliferação celular⁶²; (3) altera a morfologia celular induzindo um processo denominado de EMT (epithelial to mesenchymal transition) característica esta que poderia estar associada aos padrões morfológicos das células mioepiteliais fusiformes; (4) , atenua o processo de bloqueio do ciclo celular induzido por radiação e inibe a apoptose induzida por suspensão⁶² podendo estar envolvida na carcinogênese de uma subdivisão dos carcinomas esofageais⁶³, no urotélio¹⁰², no desenvolvimento de carcinomas mucoepidermóides⁸¹ e na adesão celular e capacidade metastática de carcinomas adenóides císticos⁸⁰. Portanto, a análise da expressão da β -catenina poderia revelar algumas de suas funções desempenhadas na carcinogênese dos adenomas pleomorfos e sua transformação maligna como, por exemplo: expressão diminuída em adenomas pleomorfos em comparação com as glândulas salivares; expressão diferenciada em determinados tipos celulares (morfológicos e funcionais) no adenoma pleomorfo; sua expressão diferenciada entre o adenoma e sua variante maligna sugerindo sua participação na malignização.

O reduzido número de casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos, e a característica dos estudos retrospectivos de peças de arquivos (impossibilidade de controle de qualidade de manuseio das peças cirúrgicas no que tange fixação, histotécnica, inclusão em parafina) revelaram-se limitações do nosso estudo. LEONG⁴¹ em 2004 descreveu as limitações dos estudos imuno-histoquímicos a partir de espécimes incluídos em parafina e considerou as tentativas de quantificação na imuno-histoquímica como imprecisas devido à falta de controle dos fatores intrínsecos acima descritos, acrescentando que os resultados de estudos com análise quantitativa através de escores cruzados, como o utilizado no estudo, devem ser considerados como aproximações da real expressão da proteína estudada.

6.3 DOS RESULTADOS OBTIDOS

Na caracterização da amostra houve expressiva predominância do gênero feminino, resultado semelhante ao apresentado em alguns estudos^{14,35,58}. Essa prevalência do gênero feminino na amostra de adenomas pleomorfos repetiu-se em nossa amostra de carcinomas ex-adenomas pleomorfos contrariando os resultados de HARADA²⁸, NAGAO et al.⁵⁶ e OLSEN; LEWIS⁶¹, e semelhante ao estudo de NASSER⁵⁸, 2004 que possuía uma amostra de 14 casos, dos quais nove eram mulheres.

A ausência de sintomatologia foi observada nos casos de carcinomas, mas no estudo de OLSEN; LEWIS⁶¹, 35,0% dos pacientes apresentavam-se com dor. A ulceração superficial não esteve presente ao contrário de algumas pesquisas⁶¹.

O grupo de glândulas salivares mais afetadas pelos adenomas pleomorfos de nosso estudo: as glândulas salivares menores do palato, não foi compatível com as observações feitas por CHIDZONGA; LOPEZ-PEREZ; PORTILA ALVARES¹⁴, e KLIJANIENKO; VIELH³⁵ cujas glândulas mais atingidas foram as parótidas. Os carcinomas ex-adenomas pleomorfos de nossa amostra encontraram-se todos no palato, divergindo dos achados de LEWIS; OLSEN; SEBO⁴², de 2001, cuja amostra demonstrou 84,0% dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos em glândulas parótidas e 16,0% em submandibulares.

Quanto à idade acometida por adenomas, em nossa amostra foi observada uma concordância com outras pesquisas^{14,35} nas quais a população afetada pelo adenoma pleomorfo encontrou-se na faixa da terceira à quinta década de vida. A sexta e a sétima décadas foram afetadas pelo carcinoma ex-adenoma pleomorfo em nosso estudo, acima da média de idade da casuística de NAGAO et al.⁵⁶, de 1981, OLSEN; LEWIS⁶¹, de 2001, que foi de 61 anos de idade.

A faixa de idade afetada, comparativamente mais avançada, em carcinomas ex-adenomas pleomorfos confirma a determinação de HARADA²⁸, de 2000, a respeito do aumento da frequência de malignização como resultado da persistência do adenoma pleomorfo sem tratamento. NAGAO et al.⁵⁶, em 1981, ainda observaram que os adenomas pleomorfos com diâmetro acima de cinco centímetros possuíam maior probabilidade de malignização.

O tempo de evolução das lesões de adenomas pleomorfos variou de alguns meses a 31 anos, entretanto notamos a ausência de informações a este respeito nas fichas clínicas do arquivo, portanto, seria importante poder contar cada vez mais com os cirurgiões-dentistas clínicos no momento da descrição da história clínica, o

que enriqueceria a discussão dos resultados, uma vez que o ideal seria a discussão de dados completos. Nos casos de carcinomas ex-adenomas pleomorfos, dois casos tiveram evolução de um ano e um não continha a informação. O mesmo ocorreu com relação aos relatos sobre sintomatologia e tamanho da lesão, onde 57,7% e 55,9% respectivamente não traziam informações a respeito. A ausência de história clínica pode dificultar a interpretação e discussão destes quesitos, bem como a comparação como outros estudos anteriores.

A Organização Mundial da Saúde⁷⁷ estabeleceu as diversas características de variação celular e de morfologia do adenoma pleomorfo, mas não relatou as características do revestimento epitelial. Em nossa amostra, na maioria dos casos, este se demonstrou íntegro, quando presente, entretanto em alguns casos havia ulceração superficial. Estes últimos localizavam-se no palato e provavelmente a ulceração deveu-se a traumatismos por conta do aumento volumétrico e não como resultado do desenvolvimento da neoplasia.

Dos achados microscópicos dos tecidos glandulares remanescentes, a fibrose intersticial e o infiltrado inflamatório mononuclear difuso marcaram presença em quase 50,0% da amostra. WILLIS⁹⁶, em 1948, postulou que em muitos casos, porções de tecido glandular salivar excisado juntamente com a neoplasia demonstram padrão de normalidade. Entretanto, por vezes observava a presença de inflamação crônica, atrofia fibrosa e parenquimatosa e estas alterações poderiam ser responsáveis pela obstrução ductal e talvez originar a própria neoplasia. A evolução do conhecimento sobre a carcinogênese glandular permitiu excluir esta possibilidade, caso contrário os fenômenos de obstrução ductal como, por exemplo, as sialolitíases desencadeariam neoplasias.

A proximidade de estruturas glandulares sadias e neoplásicas pode ser observada em alguns casos de nossa amostra. Muitos casos possuíam delgada cápsula distinguindo-as. Somente os casos com íntimo contato dos ácinos ou ductos glandulares normais com as estruturas neoplásicas foram considerados neste item o que indicaria que tal glândula possa ter originado a neoplasia adjacente.

A imunopositividade dos filetes nervosos à β -catenina, foi utilizada como controle positivo da reação e foi encontrada não somente em cortes microscópicos glandulares como também em espécimes representantes do grupo dos adenomas pleomorfos. Provavelmente as células marcadas são células de Schwann, pois MENICHELLA et al.⁴⁸, em 2001, verificaram a expressão da β -catenina, durante do desenvolvimento neural, no citoplasma das células de Schwann.

A análise microscópica em HE dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos revelou achados rotineiros, cujas porções carcinomatosas representavam carcinomas espinocelulares bem diferenciados e as porções adenomatosas possuíam predominantemente estroma fibroialino com células epiteliais organizadas em ilhotas, estruturas ductais, acinares, metaplasia escamosa e células claras. Já a análise microscópica em HE dos adenomas pleomorfos revelou alguns achados microscópicos interessantes. Algumas características apresentaram-se ausentes na maioria da amostra: padrão de organização cribiforme e em redes ou plexos das células epiteliais, metaplasia oncocítica, tecido adiposo no interior da neoplasia, estroma mucóide e estroma osteóide embora alguns autores como SHIGEISHI et al.⁸² e XU et al.⁹⁸ tenham relatado casos de adenoma pleomorfo de parótida com extensiva formação de osso. Um dos espécimes de nossa amostra com estroma osteóide também se localizava na parótida. Este achado raro pode estar relacionado

com a presença das proteínas ósseas morfogenéticas evidenciadas imuno-histoquimicamente nos adenomas⁴⁴.

Apesar da OMS⁷⁷ conceituar o adenoma pleomorfo contendo estroma mucóide, raramente este componente é citado na literatura e poucos casos de nossa amostra apresentaram tal característica, assim como dos cinco casos do estudo de TAKEUCHI et al.⁸⁷, de 1975, dois possuíam este estroma. Provavelmente o estroma mucóide venha sendo enquadrado como constituinte do componente condromixóide na literatura.

Alguns padrões morfológicos foram um tanto quanto incomuns em nosso estudo, entretanto estão bem estabelecidos na literatura como é o caso da organização das células epiteliais em padrão cribiforme encontrado na maioria dos casos da amostra de SAVERA; GOWN; ZARBO⁷⁶, 1997, que consideram a natureza destas células como mioepitélio transformado. DARDICK et al.¹⁸, em 1983, acreditavam que o padrão de distribuição das células em redes ou plexos resulta da separação gradual de células mioepiteliais modificadas de agregados compactos por deposição de matriz extracelular, tornando-as isoladas. A metaplasia das células neoplásicas dos adenomas pleomorfos em oncócitos também chamada metaplasia oncocítica é relatada na literatura¹¹, entretanto não foi um achado comum em nossa amostra.

O adenoma pleomorfo lipomatoso é um subtipo raro cuja porção lipomatosa constitui mais de 90,0% da lesão⁷⁸. No contexto de nossa amostra, somente alguns espécimes continham algumas células adiposas em quantidade pouco representativa, portanto não se encaixando na classificação de adenoma lipomatoso.

O estroma fibroialino apresentou maior frequência em comparação ao mixóide e condróide. Entretanto há uma tendência na literatura a unir dois

componentes e descrevê-los como estroma condromixóide^{4,18,19,35,101}. Caso comparássemos juntos, a quantidade destes dois estromas: fibroialino e condromixóide tornar-se-ia equilibrada, logo, os estromas predominantes tanto na literatura como em nossa amostra são o fibroialino e uma mistura de áreas condróides e mixóides. A atenção a estes aspectos morfológicos é fundamental para o correto diagnóstico entre o adenoma pleomorfo e os adenomas de células basais, adenomas canaliculares, carcinomas adenóides císticos e adenocarcinomas de baixo grau⁷⁷.

A avaliação do infiltrado inflamatório no interior da neoplasia e da neoformação vascular não é citada na literatura, mas de acordo com as observações em nossa amostra, o primeiro caracteriza-se por predomínio de células mononucleadas, principalmente linfócitos, distribuídos em focos próximos a vasos sanguíneos na região da cápsula. Na maioria dos espécimes estudados, pudemos observar numerosos pequenos vasos sanguíneos distribuídos pela neoplasia.

O adenoma pleomorfo pode possuir áreas de atipia celular, entretanto, esta característica por si só, não é suficiente para o diagnóstico definitivo de alterações malignas e deve-se associar esse tipo de alteração com outros critérios antes do estabelecimento do diagnóstico de carcinoma ex-adenoma pleomorfo⁶⁰. As ilhotas com concentração de células atípicas estiveram presentes no estudo de OHTAKÉ et al.⁶⁰, de 2002, em 51,0% dos adenomas pleomorfos estudados. Em nossa amostra, nossos achados de atipia corresponderam à hiper celularidade, ao hipercromatismo, ao pleomorfismo nuclear e ao bizarrismo, além de invasão capsular. Grande parte de nossa amostra corroborando com OHTAKÉ et al.⁶⁰ também apresentou áreas de células atípicas que poderiam representar um foco de

malignização ou um carcinoma ex-adenoma pleomorfo em sua fase inicial, sendo necessária a atenção à presença destes achados nos adenomas pleomorfos.

As presenças de hialinização e hipocelularidade foram achados considerados de importância por LEWIS; OLSEN; SEBO⁴², em 2001, em carcinomas ex-adenomas pleomorfos na porção benigna de adenoma pleomorfo. Segundo os autores, esta característica pode indicar o potencial de malignização do adenoma pleomorfo. Há ainda diversos fatores relacionados à transformação maligna dos adenomas pleomorfos como a expressão de alguns protooncogenes: myc, ras p21 e p53, também importantes no estabelecimento do prognóstico²⁰. Já a expressão do PCNA em adenomas pleomorfos não prediz, segundo YANG et al¹⁰⁰ a possibilidade de transformação maligna. COSTA ROSA et al.¹⁵ acreditam que a proteína c-erbB-2 pode ser associada ao prognóstico do carcinoma ex-adenoma pleomorfo e a amplificação do gene c-erbB-2 está associada à transformação maligna do adenoma pleomorfo.

Também se discute a respeito das alterações genéticas que levariam ao desenvolvimento do carcinoma ex-adenoma pleomorfo: LI et al.⁴³, em 1997, acreditam que a perda do cromossomo 17 pode participar no processo de transformação maligna dos adenomas pleomorfos. Anormalidades ou aberrações no cromossomo 13q1-2 e 15 q1, segundo MORIO et al.⁵² podem estar relacionados à carcinogênese ou à transformação maligna dos adenomas pleomorfos em carcinomas ex-adenomas pleomorfos.

Com relação às observações realizadas na análise imuno-histoquímica dos casos do grupo controle, corroborando com os resultados deste estudo, a β -catenina foi fracamente expressa no domínio lateral das células acinares das

glândulas salivares e fortemente expressa nas regiões látero-apicais das células ductais nas pesquisas de ACTIS; LAMPE; EYNARD¹, HIEDA et al.³⁰ que também puderam verificar a participação da E-caderina e da β -catenina durante todos os estádios de desenvolvimento das glândulas submandibulares de ratos em distribuição similar. Segundo MENKO et al.⁴⁹, apesar destas duas moléculas colaborarem na formação de junções celulares estáveis e estabelecer a polaridade celular, sua presença nos estádios mais precoces do desenvolvimento glandular indica uma função além da adesão celular ainda a ser estabelecida. Apesar de MONAGHAN et al.⁵⁰, em 2001, verificarem a presença de β -catenina em tecidos ósseos e cartilagosos (sadios e neoplásicos), no presente estudo, não houve imunopositividade para a molécula em nenhum componente estromal dos adenomas e carcinomas ex-adenomas pleomorfos.

O gene APC apresenta-se mutado em pacientes com polipose adenomatosa familiar cuja análise imuno-histoquímica da β -catenina nos pólipos revela marcação nuclear pelo anticorpo devido à sua translocação em virtude da proteína APC alterada não cumprir seu papel de degradação da β -catenina⁹. No estudo de GERRARD; DONALDSON²⁶, em 1998, um adenoma pleomorfo associou-se de à polipose adenomatosa familiar e no estudo de KAS, et al.³³, em 1997 ocorreu de um rearranjo genético resultando em fusão de uma fração do PLAG1 dos adenomas pleomorfos ao gene CTNNB1 da β -catenina, portanto esperava-se que esta proteína demonstrasse alterações em sua expressão, o que foi confirmado por este estudo.

Mesmo levando-se em consideração as limitações da técnica de quantificação utilizada, a análise estatística dos resultados nos grupos de adenomas

pleomorfos e glândulas salivares explicitou a diminuição estatisticamente significativa da expressão da β -catenina nos adenomas pleomorfos, que pode conferir uma importante função para proteína no seu desenvolvimento. As estruturas marcadas mais expressivamente foram as ductais dos adenomas e carcinomas ex-adenomas pleomorfos, tal como ocorreu nos ductos das glândulas salivares. Foi observada uma diferença de marcação da molécula nas células ductais normais e nas neoplásicas, fato que pode confirmar a participação da β -catenina na carcinogênese das lesões, sugerindo-nos que as alterações genéticas associadas aos genes *PLAG1* e *CNTTB1* desencadeiam a diminuição da expressividade da molécula e sua capacidade funcional na adesão célula-célula. Isto justificaria o fato das células que apresentam a positividade organizarem-se em estruturas ductais, e outras negativas distribuírem-se em lençóis ou ilhotas. POLLACK et al.⁶⁷, em 1997, já verificaram a participação da β -catenina na morfogênese e tubulogênese.

Houve uma variação de intensidade e número de células marcadas pela molécula de adesão de caso para caso que pode ser devida à variação de expressão da β -catenina em determinadas células epiteliais que deram origem ao adenoma ou carcinoma ex-adenoma pleomorfo ou ainda estar associada aos fatores intrínsecos de limitação da técnica utilizada.

Segundo DARDICK¹⁸ os adenomas pleomorfos resultam da transformação neoplásica da unidade ducto-acinar completa ao invés de uma célula ductal em particular. Como consequência, têm-se células epiteliais ductais e células mioepiteliais originando uma neoplasia que possui enorme variedade celular e arquitetural⁷⁷. Em algumas glândulas salivares, estruturas afiladas ao redor dos ácinos sugerindo a localização e característica de células mioepiteliais apresentaram

marcação positiva para o anticorpo. No entanto, as células mioepiteliais plasmocitóides, claras e fusiformes dos adenomas e carcinomas ex-adenomas pleomorfos apresentaram positividade quase irrelevante no universo da amostra. As células que apresentaram imunopositividade provavelmente são epiteliais ductais e a variedade de intensidade de marcação pode refletir o tipo ductal que deu origem à neoplasia.

No contexto da amostra de carcinomas ex-adenomas pleomorfos em comparação ao grupo da variante benigna, a proteína foi expressa mais fortemente tanto no citoplasma e superfície celular, sem entretanto, demonstrar a organização verificada nas glândulas salivares, sugerindo-nos que a diminuição da capacidade de adesão celular associada às altas concentrações da β -catenina poderiam estar estimulando a proliferação celular; inibição da apoptose⁶², aumentando a capacidade de invasão e desenvolvimento de metástases dos carcinomas ex-adenomas pleomorfos⁸⁰.

A expressão da β -catenina foi significativamente correlacionada com a graduação microscópica, o estágio clínico e a sobrevida de pacientes com carcinomas mucoepidermóides e carcinomas adenóides císticos^{80,81}. Seria de grande valor científico a realização de estudos prospectivos para a padronização da coleta dos espécimes na tentativa de eliminação de alguns fatores de limitação da técnica imuno-histoquímica além da realização de acompanhamento clínico dos pacientes na tentativa de correlacionar a molécula de adesão celular β -catenina como fator de prognóstico dos adenomas e carcinomas ex-adenomas pleomorfos.

6.4 DE UM CASO ESPECIAL

Um caso diagnosticado em 1999 compatível com adenoma pleomorfo teve a seguinte descrição: os cortes microscópicos revelam proliferação de células epiteliais ora ovóides, ora plasmocitóides, configurando formações ductiformes. Observam-se numerosos microcistos contendo em seu interior material amorfo e eosinofílico. De permeio, observa-se tecido conjuntivo fibroso frouxamente colagenizado constituído por células fusiformes de aspecto estelar. PerifERICAMENTE, a cápsula fibrosa apresentava-se infiltrada por cordões e ilhotas de epitélio tumoral, com margens comprometidas.

Este espécime foi selecionado para ser preparado pela técnica imuno-histoquímica. A análise imuno-histoquímica permitiu a observação da marcação nuclear da β -catenina unicamente neste caso (Figura 38). Em revisão microscópica observou-se padrão de organização nuclear em paliçada das células em estruturas tubulares e sólidas com estrutura lembrando membrana basal. As células apresentavam-se hipercromáticas e basalóides. Após a revisão do diagnóstico de adenoma pleomorfo estabeleceu-se o diagnóstico de adenoma de células basais cujos aspectos citados acima, são referidos pela OMS⁷⁷. Após a revisão diagnóstica, o caso foi retirado da amostra deste estudo e verificou-se a interessante constatação de que a β -catenina pode ser um marcador diferenciador dos adenomas pleomorfos e adenomas de células basais devido às marcações distintas aqui verificadas.

Figura 38- Núcleos celulares marcados pela β -catenina. Destaca-se a disposição em paliçada e a presença de estrutura semelhante a membrana basal neste caso de adenoma de células basais (Imunohistoquímica β -catenina; aumento original=400X)

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

De acordo com a metodologia de revisão empregada constatamos que:

- 7.1 O gênero mais afetado pelo Adenoma Pleomorfo foi o feminino, com faixa etária da 3ª a 5ª décadas de vida com localização mais freqüente no palato e as características morfológicas mais representativas foram o estroma fibroialino e as células epiteliais distribuídas em ilhotas, cordões e estruturas ductais;
- 7.2 O gênero mais afetado pelo Carcinoma ex-Adenoma Pleomorfo foi o feminino, com faixa etária da 6ª a 7ª décadas de vida com localização mais freqüente no palato e as características morfológicas mais representativas foram as de carcinoma espinocelular na porção maligna e na benigna. foram o estroma fibroialino, estruturas ductais, acinares, metaplasia escamosa e células mioepiteliais claras.

De acordo com a metodologia imuno-histoquímica empregada e considerando suas limitações concluímos que:

- 7.3 A β -catenina participa da patogênese dos Adenomas Pleomorfos tendo se apresentado com expressão diminuída quando comparada com o grupo controle de glândulas salivares;
- 7.4 A expressão da β -catenina nos Adenomas Pleomorfos influencia na organização das células epiteliais, sendo que as estruturas ductiformes apresentam maior expressão da molécula em comparação com as estruturas em ilhotas, cordões, lençóis celulares.

DADOS GERAIS			Número do caso	31/69	14/73	34/73	123/73	124/73	36/75	148/76	51/78	58/81			
			Idade	44	48	22	9	84	70	21	46	30			
			Gênero	F	F	M	M	M	M	M	M	M	F		
			Localização	-	-	1	1	1	5	7	1	5			
			Tamanho	-	-	-	-	-	2cm	-	-	-			
			Tempo de evolução	-	-	-	12m	4a	30a	8a	-	-			
			Sintomatologia	-	-	-	A	A	-	-	-	-			
EPITÉLIO			Ep. estrat. Pavimentoso	●	-	●	●	●	-	-	-	●			
			Epitélio ulcerado	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
			Epitélio ausente	-	●	-	-	-	●	●	●	-			
TECIDO GLANDULAR			Ácinos Mucosos	A	A	P	P	A	A	A	P	A			
			Ácinos Serosos	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A		
			Fibrose intersticial	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A		
			Infiltrado infl. MN	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A		
			Associação com neoplasia	A	A	A	A	A	A	A	P	A			
TECIDO NEOPLÁSICO			Estroma		Mixóide*	M	M	Mt	A	A	Mt	A	A	Po	
					Condróide*	A	A	A	A	A	A	A	A	Po	
					Mucóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
					Fibroialino*	Mt	A	Mt	Mt	Mt	A	Mt	Mt	Po	
					Osteóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
					Tecido adiposo*	Po	A	Po	A	A	A	A	Po	Po	
					Infilt. infl. Predomin. MN*	A	A	A	A	A	A	Po	A	Po	
					Neoformação vascular *	M	Mt	M	Mt	Mt	Mt	M	Mt	Po	
			Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	A	A	A	A	A	A	A
						Plexiforme*	Po	Po	A	A	A	Po	A	A	A
						Lençóis*	Mt	Po	A	Mt	A	Mt	A	M	Mt
						Ilhotas e Cordões*	Mt	Po	Mt	Po	Mt	Po	A	Mt	Mt
						Estruturas acinares*	Po	Po	Mt	Po	A	Mt	A	A	Po
						Ductos	Simplex*	Po	A	Po	A	A	A	A	A
					Duplos *	Po	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	
					Sub. Eosinofílica no Interior*	M	Mt	Mt	M	Mt	Mt	Po	Po	Mt	
					Dilatados*	Po	A	Po	Mt	A	Mt	Mt	M	A	
			Componente mioepitelial		Plasmocitóides*	Mt	Po	Mt	A	A	A	A	Mt	A	
					Fusiformes*	Mt	A	A	A	A	A	Mt	Mt	A	
					Claras*	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	A	A	Mt	
			Metaplasia		Escamosa*	A	A	A	A	A	Mt	Mt	A	Po	
					Oncocítica*	A	A	M	Po	A	A	A	A	A	
			Cápsula Fibrosa		Contínua	A	A	A	A	A	A	P	A	A	
					Descontínua	A	P	P	A	A	P	A	P	A	
			Achados de Atipia		Violação da Cápsula	A	P	P	A	A	A	A	A	A	
					Hipercelularidade**	A	L	L	A	A	G	A	L	L	
					Hipercromatismo**	G	A	A	A	A	A	A	L	L	
					Pleomorfismo nuclear**	A	A	A	A	A	A	A	L	A	
					Bizarismo**	A	A	A	A	A	L	A	A	A	

Anexo A: Quadro com as características microscópicas de cada uma das lesões de Adenomas Pleomorfs coradas pela hematoxilina e eosina. F-Feminino M-Masculino B-Branca N-Negra J-Amarela a-ano cm-centímetro m-meses v-vários P-Presente A-Ausente 1-Palato 2-Sublingual 3-Submandibular 4-Parótida 5-Mucosa Jugal 6-Maxila 7-Lábio **L-Localizado G-Generalizado * Conforme quantidade Po-pouco M-médio Mt-muito A-Ausente

DADOS GERAIS			Número do caso	271/83	213/84	25/85	73/88	189/88	301/88	77/89	273/89	266/90			
			Idade	32	27	42	48	33	41	36	-	21			
			Gênero	F	M	F	F	M	M	F	F	F			
			Localização	1	1	1	4	1	1	5	-	1			
			Tamanho	2cm	4cm	1cm	4cm	2cm	-	-	-	8cm			
			Tempo de evolução	-	-	-	-	12a	-	4a	-	5a			
			Sintomatologia	-	-	A	-	A	-	A	-	A			
EPITÉLIO			Ep. estrat. Pavimentoso	●	-	●	-	●	●	-	-	-			
			Epitélio ulcerado	-	●	-	-	-	-	-	-	-	-		
			Epitélio ausente	-	-	-	●	-	-	●	●	●			
TECIDO GLANDULAR			Ácinos Mucosos	P	A	A	A	P	A	A	A	P			
			Ácinos Serosos	A	A	A	P	A	A	A	A	A	A		
			Fibrose intersticial	A	A	A	P	A	A	A	A	A	P		
			Infiltrado infl. MN	A	A	A	P	A	A	A	A	A	P		
			Associação com neoplasia	A	A	A	A	A	A	A	A	A	P		
TECIDO NEOPLÁSICO			Estroma		Mixóide*	Po	Po	Mt	Mt	A	Po	Po	Mt	M	
					Condróide*	M	M	A	A	A	A	Po	Mt	A	
					Mucóide*	A	A	A	A	Mt	A	A	A	A	A
					Fibroialino*	M	Mt	M	M	A	Mt	Mt	A	Mt	
					Osteóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
					Tecido adiposo*	A	Po	A	A	A	A	Mt	A	A	
					Infilt. infl. Predomin. MN*	A	A	A	A	A	Po	Po	A	A	
					Neoformação vascular *	M	M	M	Mt	Po	Po	Mt	M	Mt	
			Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	Po	Po	A	A	A	A	A
						Plexiforme*	A	A	A	A	A	A	A	A	A
						Lençóis*	Mt	M	Mt	Mt	A	Mt	A	A	Po
					Ductos	Ilhotas e Cordões*	A	Mt	Mt	Mt	Mt	M	Mt	Po	Mt
						Estruturas acinares*	A	A	A	A	A	A	A	A	A
						Simplex*	M	Po	Po	Po	A	Po	Mt	Mt	Po
			Componente mioepitelial		Duplos *	M	A	A	A	A	A	M	Mt	Mt	
					Sub. Eosinofílica no Interior*	Mt	A	A	A	A	A	Mt	Mt	Po	
					Dilatados*	A	A	A	A	A	Po	Mt	Po	Po	
					Plasmocitóides*	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	A	A	Mt	
			Metaplasia		Fusiformes*	M	A	A	A	A	Mt	Mt	Mt	Mt	
					Claras*	Mt	A	A	Mt	A	A	Mt	Po	Po	
					Escamosa*	Mt	Mt	M	M	A	A	A	M	A	
			Cápsula Fibrosa		Oncocítica*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
					Contínua	P	P	P	P	P	A	A	P	P	
			Achados de Atipia		Descontínua	A	A	A	A	A	P	P	A	A	
					Violação da Cápsula	P	P	A	A	A	A	A	P	P	
					Hipercelularidade**	L	L	A	A	A	L	L	A	L	
					Hipercromatismo**	L	L	A	A	A	L	L	A	L	
					Pleomorfismo nuclear**	L	L	A	A	A	L	L	A	A	
					Bizarrismo**	L	A	A	A	A	L	L	A	A	

Continuação do Anexo A

DADOS GERAIS			Número do caso	65/91	83/91	260/91	307/92	255/93	395/94	297/95	304/95	462/95			
			Idade	11	23	58	47	51	41	16	38	63			
			Gênero	F	F	F	F	F	M	M	F	F			
			Localização	1	4	1	6	-	1	4	5	2			
			Tamanho	2cm	2cm	5cm	-	-	-	3cm	2cm	5cm			
			Tempo de evolução	-	-	6a	3a	-	7a	vm	3a	3a			
			Sintomatologia	A	A	A	A	-	A	-	-	A			
EPITÉLIO			Ep. estrat. Pavimentoso	-	-	-	●	-	●	-	-	-			
			Epitélio ulcerado	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
			Epitélio ausente	●	●	●	-	●	-	●	●	●			
TECIDO GLANDULAR			Ácinos Mucosos	P	A	A	A	A	A	A	P	A			
			Ácinos Serosos	A	A	A	A	A	A	P	A	P			
			Fibrose intersticial	P	A	A	A	A	A	P	A	A			
			Infiltrado infl. MN	P	A	A	A	A	A	A	A	P			
			Associação com neoplasia	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
TECIDO NEOPLÁSICO			Estroma		Mixóide*	A	Mt	M	Mt	Mt	A	M	Po	Mt	
					Condróide*	A	Mt	Mt	Po	Po	A	A	A	Mt	
					Mucóide*	A	M	A	A	A	A	A	A	A	
					Fibroialino*	Po	Po	Mt	M	M	Mt	Mt	Mt	M	
					Osteóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
					Tecido adiposo*	A	A	M	A	A	A	A	A	A	
					Infilt. infl. Predomin. MN*	A	A	Po	A	A	Mt	A	Po	A	
					Neoformação vascular *	Mt	A	Mt	Mt	Mt	M	M	Po	M	
			Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	Mt	A	A	A	A	A	A
						Plexiforme*	A	A	A	A	A	A	A	A	Mt
						Lençóis*	Mt	A	A	Mt	Mt	A	M	A	Po
						Ilhotas e Cordões*	A	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	M	Mt	Po
						Estruturas acinares*	A	A	Po	A	A	Mt	Po	M	A
					Ductos	Simples*	Po	Po	Mt	Po	Po	A	A	A	Po
						Duplos *	Mt	Mt	Mt	A	A	A	M	Mt	Mt
						Sub. Eosinofílica no Interior*	Po	Mt	Mt	A	A	A	A	Mt	Po
			Componente mioepitelial		Dilatados*	A	M	Mt	A	A	A	A	M	M	
					Plasmocitóides*	Po	A	Mt	Mt	Mt	M	Po	Mt	A	
					Fusiformes*	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	Mt	
			Metaplasia		Claras*	Mt	A	Mt	A	A	Mt	Po	Mt	Mt	
					Escamosa*	A	A	Mt	A	A	A	A	A	A	
			Cápsula Fibrosa		Oncocítica*	A	Mt	A	A	A	A	Po	A	A	
					Contínua	P	A	A	A	A	A	P	P	A	
					Descontínua	A	A	A	A	A	A	A	A	P	
					Achados de Atipia		Violação da Cápsula	A	A	A	A	A	A	P	A
			Hipercelularidade**	G			A	A	L	L	A	L	L	A	
			Hipercromatismo**	L			A	A	L	L	A	L	L	A	
Pleomorfismo nuclear**	A	A	A	A			A	A	L	A	A				
Bizarismo**	A	A	L	A			A	A	A	A	A				

Continuação do Anexo A.

DADOS GERAIS		Número do caso	94/97	208/97	387/97	420/97	670/97	137/98	1135 /98	34/99	227/99			
		Idade	38	39	22	15	62	25	18	36	26			
		Gênero	M	F	F	F	F	F	F	M	F			
		Localização	1	4	4	1	1	7	1	7	1			
		Tamanho	1cm	5cm	-	1cm	2cm	1cm	2cm	1cm	-			
		Tempo de evolução	-	4m	-	2m	2m	3a	7a	-	3a			
		Sintomatologia	A	A	-	A	-	A	A	-	-			
		EPITÉLIO		Ep. estrat. Pavimentoso	●	-	-	●	-	-	-	-	●	
Epitélio ulcerado	-			-	-	-	●	-	-	-	-			
Epitélio ausente	-			●	●	-	-	●	●	●	-			
TECIDO GLANDULAR		Ácinos Mucosos	P	P	A	P	A	P	P	P	P			
		Ácinos Serosos	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
		Fibrose intersticial	A	P	A	P	A	A	A	A	A			
		Infiltrado infl. MN	A	A	A	P	A	P	A	A	A			
		Associação com neoplasia	A	P	A	P	A	A	P	A	A			
TECIDO NEOPLÁSICO		Estroma		Mixóide*	A	Mt	Mt	A	Mt	M	A	Mt	A	
				Condróide*	A	Po	M	A	A	A	A	A	A	A
				Mucóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	Po	A
				Fibroialino*	Po	A	A	Mt	A	Mt	Mt	A	Mt	
				Osteóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				Tecido adiposo*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				Infilt. infl. Predomin. MN*	A	A	A	A	A	A	Mt	A	A	
				Neoformação vascular *	Mt	Po	Po	Po	Po	Mt	M	Mt	Po	
		Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	A	A	A	A	A	A	A
					Plexiforme*	A	A	A	A	Mt	A	A	A	A
					Lençóis*	Mt	M	A	Mt	Po	M	Mt	Po	Mt
					Ilhotas e Cordões*	A	M	Po	M	M	A	Po	Mt	A
					Estruturas acinares*	A	A	A	A	A	A	M	A	Mt
				Ductos	Simples*	Po	A	Po	A	Po	A	A	Po	Mt
					Duplos *	A	M	Po	Po	Po	Mt	Mt	A	Po
					Sub. Eosinofílica no Interior*	A	A	A	A	A	Mt	Mt	A	Mt
					Dilatados*	A	A	A	A	A	A	M	A	Mt
		Componente mioepitelial		Plasmocitóides*	Mt	M	A	Mt	A	M	Mt	Mt	M	
				Fusiformes*	A	A	A	M	A	A	A	Po	M	
				Claras*	A	Mt	Po	A	A	A	Mt	A	Mt	
		Metaplasia		Escamosa*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
				Oncocítica*	A	A	A	Po	Po	A	A	A	Po	
		Cápsula Fibrosa		Contínua	A	A	A	P	A	P	P	P	A	
				Descontínua	P	A	A	A	A	A	A	A	A	
		Achados de Atipia		Violação da Cápsula	P	A	A	P	A	P	P	A	A	
				Hipercelularidade**	L	A	A	L	A	L	L	L	G	
				Hipercromatismo**	A	A	A	L	A	L	L	L	G	
				Pleomorfismo nuclear**	A	A	A	L	A	L	A	A	A	
				Bizarismo**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	

Continuação do Anexo A.

DADOS GERAIS		Número do caso	384/99	404/99	465/99	612/99	131/00	886/00	1041/00	1132/00	4/01			
		Idade	28	36	-	65	48	43	49	39	-			
		Gênero	F	F	F	F	F	F	F	M	M			
		Localização	1	4	1	7	4	1	1	-	5			
		Tamanho	2cm	2cm	-	1cm	2cm	3cm	9cm	-	-			
		Tempo de evolução	-	8a	2a	-	-	-	-	20a	23a			
		Sintomatologia	-	dor	A	A	A	dor	-	A	A			
EPITÉLIO		Ep. estrat. Pavimentoso	●	-	-	-	-	-	-	●	●			
		Epitélio ulcerado	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Epitélio ausente	-	●	●	●	●	●	●	-	-			
TECIDO GLANDULAR		Ácinos Mucosos	P	A	A	P	A	A	A	P	P			
		Ácinos Serosos	A	P	A	A	P	A	A	P	A			
		Fibrose intersticial	A	A	A	P	A	A	A	P	P			
		Infiltrado infl. MN	A	A	A	P	A	A	A	A	A			
		Associação com neoplasia	A	A	A	P	A	A	A	P	A			
TECIDO NEOPLÁSICO		Estroma		Mixóide*	Mt	M	Mt	A	Mt	Mt	M	M	A	
				Condróide*	A	Mt	A	A	Mt	Po	M	Po	A	
				Mucóide*	Po	A	A	A	A	A	Mt	A	A	
				Fibroialino*	Mt	A	M	Mt	Po	Mt	Mt	M	M	
				Osteóide*	A	A	A	A	Mt	A	A	A	A	
				Tecido adiposo*	Mt	A	A	Po	A	A	A	A	A	
				Infilt. infl. Predomin. MN*	Po	A	A	A	A	A	Po	A	A	
				Neoformação vascular *	Po	Po	Mt	Po	Mt	Mt	Mt	Po	Mt	
		Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	A	A	A	A	A	A	A
					Plexiforme*	A	A	A	A	A	Po	A	A	A
					Lençóis*	M	A	M	Mt	Mt	Po	Mt	Mt	Mt
					Ilhotas e Cordões*	Mt	Po	Po	Mt	Mt	A	Mt	A	Mt
					Estruturas acinares*	A	A	A	Mt	Po	A	Po	A	Mt
				Ductos	Simples*	Mt	Po	Po	M	Mt	A	A	M	Mt
					Duplos *	Mt	Po	Po	A	Mt	Mt	Mt	Mt	A
					Sub. Eosinofílica no Interior*	Mt	A	Po	A	Mt	M	Mt	Mt	Mt
					Dilatados*	Mt	A	A	Po	Mt	A	A	M	Mt
		Componente mioepitelial		Plasmocitóides*	Mt	M	A	A	Po	Mt	Mt	Mt	A	
				Fusiformes*	Mt	M	A	A	A	Mt	A	Mt	A	
				Claras*	A	A	A	Mt	Mt	A	Mt	A	Mt	
		Metaplasia		Escamosa*	Po	A	M	A	A	A	M	A	A	
				Oncocítica*	A	A	A	Po	A	A	A	A	A	
		Cápsula Fibrosa		Contínua	P	A	A	P	A	P	P	P	P	
				Descontínua	A	A	A	A	P	A	A	A	A	
		Achados de Atipia		Violação da Cápsula	P	A	A	P	A	P	P	P	A	
				Hiper celularidade**	A	A	A	G	L	L	L	A	G	
				Hipercromatismo**	A	A	A	G	L	L	L	A	A	
				Pleomorfismo nuclear**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	
				Bizarismo**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	

Continuação do Anexo A.

DADOS GERAIS		Número do caso	317/01	471/01	474/01	774/01	1573/ 01	444/02	1125/ 02	1306/ 02	392/03			
		Idade	-	51	68	58	12	74	-	44	78			
		Gênero	M	M	F	F	F	F	M	F	F			
		Localização	5	1	1	1	7	1	5	1	1			
		Tamanho	2cm	4cm	-	3cm	-	2cm	0,3	-	1cm			
		Tempo de evolução	4a	-	4a	30a	4a	-	-	va	6m			
		Sintomatologia	dor	A	A	A	A	A	-	A	A			
EPITÉLIO		Ep. estrat. Pavimentoso	-	●	-	●	-	-	●	●	●			
		Epitélio ulcerado	-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Epitélio ausente	●	-	●	-	●	●	-	-	-			
TECIDO GLANDULAR		Ácinos Mucosos	A	P	P	P	P	A	A	P	A			
		Ácinos Serosos	P	A	A	A	A	A	A	A	A			
		Fibrose intersticial	P	P	P	A	A	A	A	P	A			
		Infiltrado infl. MN	P	P	P	P	A	A	A	P	A			
		Associação com neoplasia	A	A	A	A	A	A	A	A	A			
TECIDO NEOPLÁSICO		Estroma		Mixóide*	Po	Po	M	A	A	A	Mt	M	A	
				Condróide*	Po	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				Mucóide*	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				Fibroialino*	Po	Mt	M	Mt	M	Mt	A	Mt	Mt	
				Osteóide*	A	A	A	M	A	A	A	A	A	A
				Tecido adiposo*	Po	A	A	A	A	A	A	A	A	A
				Infilt. infl. Predomin. MN*	M	Po	M	A	A	A	A	Po	A	
				Neoformação vascular *	Po	M	M	Mt	Po	Po	Mt	Mt	Po	
		Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	A	A	A	A	A	A	Mt
					Plexiforme*	A	A	A	A	Mt	A	A	A	A
					Lençóis*	Mt	A	A	A	A	A	A	Mt	A
					Ilhotas e Cordões*	Mt	Mt	M	Mt	A	Mt	Po	Mt	A
					Estruturas acinares*	Mt	A	Mt	A	A	A	Po	A	
				Ductos	Simples*	A	Mt	A	A	A	Mt	A	A	A
					Duplos *	Mt	Mt	Mt	Po	Mt	Mt	A	Mt	Mt
					Sub. Eosinofílica no Interior*	Mt	A	Mt	Po	Mt	Mt	A	Mt	Mt
					Dilatados*	Mt	A	Mt	A	A	Mt	A	Mt	Mt
		Componente mioepitelial		Plasmocitóides*	Po	A	A	A	A	A	A	A	A	
				Fusiformes*	A	A	A	Mt	Mt	A	A	A	A	
				Claras*	Mt	A	Mt	Mt	A	A	Po	A	Mt	
		Metaplasia		Escamosa*	Mt	A	A	A	A	Po	A	Mt	A	
				Oncocítica*	Po	A	A	A	A	A	A	A	A	
		Cápsula Fibrosa		Contínua	P	A	P	A	P	A	A	P	A	
				Descontínua	A	P	A	P	A	A	A	A	P	
		Achados de Atipia		Violação da Cápsula	P	P	P	A	P	A	A	P	P	
				Hipercelularidade**	G	L	A	A	A	L	A	L	G	
				Hipercromatismo**	A	L	A	A	A	L	A	L	G	
				Pleomorfismo nuclear**	A	A	A	A	A	A	A	L	A	
				Bizarismo**	A	A	A	A	A	A	A	A	A	

Continuação do Anexo A.

DADOS GERAIS		Número do caso	400/03	453/03	724/03	762/03	Carcinomas Ex- Adenomas Pleomorfos	1213/ 99	28/00	1046/ 00		
		Idade	22	44	-	55		54	-	68		
		Gênero	F	F	F	F		M	F	F		
		Localização	1	5	1	4		1	1	1		
		Tamanho	-	0,5	-	-		1cm	0,9	-		
		Tempo de evolução	15d	10a	-	-		6m	6m	-		
		Sintomatologia	A	-	-	A		-	A	-		
EPITÉLIO		Ep. estrat. Pavimentoso	-	●	●	●	-	●	-			
		Epitélio ulcerado	●	-	-	-	-	-	-			
		Epitélio ausente	-	-	-	-	●	-	●			
TECIDO GLANDULAR		Ácinos Mucosos	P	A	A	A	A	A	A			
		Ácinos Serosos	A	A	A	A	A	A	A			
		Fibrose intersticial	P	A	A	A	A	A	A			
		Infiltrado infl. MN	P	A	A	A	A	A	A			
		Associação com neoplasia	P	A	A	A	A	A	A			
TECIDO NEOPLÁSICO		Estroma		Mixóide*	Po	A	Mt	Mt	Po	A	A	
				Condróide*	A	A	Po	A	A	A	A	
				Mucóide*	A	A	A	A	A	A	A	
				Fibroialino*	Po	Mt	Po	A	Mt	M	M	
				Osteóide*	A	A	A	A	A	A	A	
				Tecido adiposo*	Po	A	Po	A	A	A	A	
				Infilt. infl. Predomin. MN*	Po	A	A	A	A	A	A	
				Neoformação vascular *	M	Mt	Po	Po	M	M	M	
		Componente epitelial		Padrão	Cribiforme*	A	A	A	A	M	A	A
					Plexiforme*	A	A	A	A	Mt	A	A
					Lençóis*	Mt	Mt	Mt	A	Mt	Mt	Mt
				Ductos	Ilhotas e Cordões*	Mt	Po	Mt	A	A	A	A
					Estruturas acinares*	Mt	A	A	A	Mt	A	Mt
					Simples*	A	Po	M	Mt	Po	A	A
		Componente mioepitelial		Duplos *	M	A	M	A	Mt	M	Mt	
				Sub. Eosinofílica no Interior*	M	Po	A	Mt	M	Po	Mt	
				Dilatados*	Po	A	M	Mt	Po	A	A	
				Plasmocitóides*	Mt	Po	A	A	A	Mt	M	
		Metaplasia		Fusiformes*	Mt	A	A	Mt	A	A	A	
				Claras*	Mt	A	Po	A	Mt	A	Mt	
		Cápsula Fibrosa		Escamosa*	Mt	A	A	A	Mt	A	Mt	
				Oncocítica*	A	A	A	A	A	A	A	
		Achados de Atipia		Contínua	A	A	A	A	P	A	A	
				Descontínua	A	A	P	A	A	P	A	
		Achados de Atipia		Violação da Cápsula	A	A	A	A	A	P	A	
				Hipercelularidade**	L	A	L	A	G	G	G	
				Hipercromatismo**	L	A	L	A	G	G	G	
Pleomorfismo nuclear**	L			A	A	A	L	G	G			
Bizarrismo**	L			A	A	A	L	G	G			

Continuação do Anexo A.

Anexo B:

Anexo B: Quadro com as características microscópicas de cada uma das lesões de Carcinomas ex-Adenomas Pleomorfos coradas pela hematoxilina e eosina. F-Feminino M-Masculino B-Branca N-Negra m-meses P-Presente A-Ausente 1-Palato **L-Localizado G-Generalizado

*Conforme quantidade Po-pouco M-médio Mt-muito A-Ausente

<i>Caso</i>	<i>Gênero</i>	<i>Idade</i>	<i>Tamanho (cm)</i>	<i>Localização</i>	<i>Diagnóstico</i>
1	Masc	30	1,5	Lábio Inferior	Glândulas salivares normais
2	Masc	26	-	Lábio Superior	Lábio duplo
3	Masc	-	0,4	Lábio Inferior	Mucocele
4	Fem	-	0,5	Lábio Inferior	Mucocele
5	Masc	16	0,5	Lábio Inferior	Mucocele
6	Masc	26	-	Submandibular	Sialoadenite Crônica
7	Fem	27	2	Sublingual	Rânula
8	Masc	46	5	Sublingual	Glândula Sublingual com fibrose intersticial
9	Fem	8	-	Submandibular	Sialoadenite Submandibular
10	Fem	-	-	Sublingual	Rânula

Anexo C: Características clínicas e diagnósticos do grupo controle com glândulas salivares.

Número do Caso		1			2			3			4			5		
Marcação da β -catenina		N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S
Unidade glandular	Ductos Intercalares	-	-	-	-	3+	3+	-	-	-	-	3+	3+	-	-	-
	Ductos Estriados	-	4+	4+	-	3+	3+	-	4+	4+	-	4+	4+	-	2+	2+
	Ductos excretores	-	4+	4+	-	3+	3+	-	4+	4+	-	4+	4+	-	2+	2+
	Células Acinares Mucosas	-	-	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Acinares Serosas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Mioepiteliais	-	2+	2+	-	2+	2+	-	2+	2+	-	2+	2+	-	2+	2+
Septos Interlobulares	Células Inflamatórias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos Sanguíneos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nervos	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	Fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fibroblastos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle Interno		+			+			+			+			+		

Anexo D: Quadro com os dados imuno-histoquímicos de cada caso do grupo controle de glândulas salivares menores. N-Nuclear C-Citoplasmática S-Superfície celular

Número do Caso		6			7			8			9			10		
Marcação da β -catenina		N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S
Unidade glandular	Ductos Intercalares	-	4+	4+	-	-	-	-	4+	4+	-	4+	4+	-	3+	3+
	Ductos Estriados	-	4+	4+	-	3+	3+	-	4+	4+	-	4+	4+	-	3+	3+
	Ductos excretores	-	4+	4+	-	4+	4+	-	3+	3+	-	4+	4+	-	4+	4+
	Células Acinares Mucosas	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Acinares Serosas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Células Mioepiteliais	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
Septos Interlobulares	Células Inflamatórias	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Vasos Sanguíneos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Nervos	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	Fibras colágenas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Fibroblastos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle Interno		+			+			+			+			+		

Anexo E: Quadro com os dados imuno-histoquímicos de cada caso do grupo controle de glândulas salivares maiores. N-Nuclear C-Citoplasmática S-Superfície celular.

Número do Caso			260/91			304/95			462/95			94/97			384/99			
Marcação da β-catenina			N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	
TECIDO NEOPLÁSICO	Estroma	Mixóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Condróide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mucóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fibroialino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Osteóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lobular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lençóis	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-
			Ilhotas e cordões	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+
			Estruturas acinares	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ductos	Simples	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	3+	3+	-	2+	2+
			Duplos	-	2+	2+	-	+	+	-	-	-	-	3+	3+	-	2+	2+
			Sub. Eosi. Int.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Componente mioepitelial	Plasmocitóides	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	
		Fusiformes	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Claras	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	
	Metaplasia	Escamosa	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	
		Oncocítica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cápsula Fibrosa	Contínua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Descontínua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Achados de Atipia	Hipercel.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Hipercro.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pleomorf.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Bizarrismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Viol. Cápsula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Controle Interno			+			+			+			+			+			

Anexo F: Quadro com o dados imuno-histoquímicos de cada caso de Adenomas Pleomorfos. N-Nuclear C-Citoplasmática S-Superfície celular

Número do Caso			404/99			131/00			886/00			1041/00			1132/00			
Marcação da β -catenina			N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	
TECIDO NEOPLÁSICO	Estroma	Mixóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Condróide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mucóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fibroialino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Osteóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lobular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lençóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ductos	Ilhotas e cordões	-	2+	2+	-	4+	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Estruturas acinares	-	-	-	-	4+	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Simples		-	+	+	-	4+	4+	-	+	+	-	3+	3+	-	-	-	
	Componente mioepitelial	Duplos	-	+	+	-	4+	4+	-	+	+	-	3+	3+	-	-	-	
		Sub. Eosi. Int.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Plasmocitóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fusiformes	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	
		Claras	-	-	-	-	4+	4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Metaplasia	Escamosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Oncocítica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cápsula Fibrosa	Contínua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Descontínua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Achados de Atipia	Hipercel.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Hipercro.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pleomorf.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Bizarrismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Viol. Cápsula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Controle Interno			+			+			+			+			+			

Continuação do Anexo F.

Número do Caso			317/01			471/01			1573/01			1306/02			724/03			
Marcação da β-catenina			N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	N	C	S	
TECIDO NEOPLÁSICO	Estroma	Mixóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Condróide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Mucóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fibroialino	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Osteóide	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lobular	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lençóis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-
			Ilhotas e cordões	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-	-	-	-	+	+
			Estruturas acinares	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ductos	Simples	-	-	-	-	2+	2+	-	-	-	-	3+	3+	-	-	-
			Duplos	-	+	+	-	2+	2+	-	+	+	-	3+	3+	-	-	-
			Sub. Eosi. Int.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Componente mioepitelial	Plasmocitóides	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fusiformes	-	-	-	-	-	-	-	3+	3+	-	-	-	-	-	-	
		Claras	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Metaplasia	Escamosa	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Oncocítica	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Cápsula Fibrosa	Contínua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Descontínua	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Achados de Atipia	Hipercel.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Hipercro.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Pleomorf.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Bizarrismo	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Viol. Cápsula	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Controle Interno			+			+			+			+			+			

Continuação do Anexo F.

Número do Caso			392/03			Carcinomas	1213/99			1046/00			28/00					
Marcação da β -catenina			N	C	S		Ex-	N	C	S	N	C	S	N	C	S		
TECIDO NEOPLÁSICO	Estroma	Mixóide	-	-	-	Ex- Adenomas Pleomorfos	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
		Condróide	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-			
		Mucóide	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fibroialino	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Osteóide	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Componente epitelial	Padrão	Cribiforme	-	4+		4+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Lobular	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Ductos	Lençóis	-	-		-	-	2+	2+	-	2+	2+	-	+	+		
			Ilhotas e cordões	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Estruturas acinares	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Simples		-	-	-		-	3+	3+	-	4+	4+	-	2+	2+			
	Duplos		-	4+	4+		-	3+	3+	-	4+	4+	-	2+	2+			
	Componente mioepitelial	Sub. Eosi. Int.	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Plasmocitóides	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
		Fusiformes	-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	Metaplasia	Escamosa	Claras	-	4+		4+	-	2+	2+	-	2+	2+	-	-	-	-	-
			Oncocítica	-	-		-	-	+	+	-	2+	2+	-	-	-	-	-
		Cápsula Fibrosa	Contínua	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			Descontínua	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
		Achados de Atipia	Hipercel.	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Hipercro.		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Pleomorf.		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Bizarrismo		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Viol. Cápsula		-	-	-		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Controle Interno			+			+			+			+			+		

Continuação do Anexo F.

Anexos G: Quadro com o dados imuno-histoquímicos de cada caso de Carcinomas ex-Adenomas Pleomorfos. N-Nuclear C-Citoplasmática S-Superfície celular

Referências Bibliográficas

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

- 1 ACTIS, A.B.; LAMPE, P.D.; EYNARD, A.R. Cellular basis and clinical implications of biological markers in salivary tissues: their topological distribution in murine submandibular gland. **Oral Oncol**, v.38, n.5, p.441-9, July 2002.
- 2 Adenoma. In: STEDMAN, T.L. **Stedman's Medical Dictionary**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989. 24.
- 3 ALBERTS, B. et al. Junções celulares, adesão celular e a matriz extracelular. In:_____. **Biologia molecular da célula**. 3. ed. Artes Médicas, Porto Alegre, 1997. p.949-1009.
- 4 ALVES, F.A. et al. Pleomorphic adenoma of the submandibular gland: clinicopathological and immunohistochemical features of 60 cases in Brazil. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v.128, n.12, p.1400-3, Dec. 2002.
- 5 BAGUTTI, C.; SPEIGHT, P.M.; WATT, F.M. Comparison of integrin, cadherin, and catenin expression in squamous cell carcinomas of the oral cavity. **J Pathol**, v.186, n.1, p.8-16, Sept. 1998.
- 6 BANDUCCI, D.; REES, R.; BLUETT, M.K.; SAWYERS, J.L. Pleomorphic adenoma of the cervical esophagus: a rare tumor. **Ann Thorac Surg**, v.44, n.6, p.653-5, Dec.1987.
- 7 BARBOSA, J. Detecção histoquímica de mucopolissacarídeos no adenoma pleomórfico (tumor misto) da glândula parótida humana. **Rev Fac Odontol Univ São Paulo**, v.5, n.2, p.133-46, June 1976.
- 8 BECELLI, R. et al. Pleomorphic adenoma of the lachrymal gland: presentation of a clinical case of relapse. **J Craniofac Surg**, v.13, n.1, p.49-52, Jan. 2002.
- 9 BEN-ZE'EV, A.; GEIGER, B. Differential molecular interactions of beta-catenin and plakoglobin in adhesion, signaling and cancer. **Curr Opin Cell Biol**, v.10, n.5, p.629-39, Oct. 1998.
- 10 BRYDEN, A.A. et al. E-cadherin and beta-catenin are down-regulated in prostatic bone metastases. **BJU Int**, v.89, n.4, p.400-3, Mar. 2002.
- 11 BUCHNER, A.; DAVID, R.; HANSEN, L.S. "Hyaline cells" in pleomorphic adenoma of salivary gland origin. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.52, n.5, p.506-12, Nov. 1981.

*Normas recomendadas para uso no âmbito da Universidade de São Paulo, com base no documento "Referências Bibliográficas: exemplos", emanado do Conselho Supervisor do Sistema Integrado de Bibliotecas da USP, em reunião de 20 de setembro de 1990.

- 12 CATTELINO, A. et al. The conditional inactivation of the beta-catenin gene in endothelial cells causes a defective vascular pattern and increased vascular fragility. **J Cell Biol**, v.162, n.6, p.1111-22, Sept. 2003.
- 13 Carcinoma. In: STEDMAN, T.L. **Stedman's Medical Dictionary**. Baltimore, Willians & Wilkins, 1989. 245.
- 14 CHIDZONGA, M..M.; LOPEZ PEREZ, V..M.; PORTILLA ALVAREZ, A.L. Pleomorphic adenoma of the salivary glands. Clinicopathologic study of 206 cases in Zimbabwe. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.79, n.6, p.747-9, June 1995.
- 15 COSTA ROSA, J.C. et al. Immunohistochemical study of c-erbB-2 expression in carcinoma ex-pleomorphic adenoma. **Histopathology**, v.28, n.3, p.247-52, Mar. 1996.
- 16 CRAWFORD, J.M. O trato gastrointestinal In:_____. COTRAN, R.S.; KUMAR, V.; COLLINS, T. **Robbins: patologia estrutural e funcional**. 6. ed. Guanabara koogan, Rio de Janeiro, 2000. p.746-47.
- 17 CUADROS, C.L.; RYAN, S.S.; MILLER, R.E. Benign mixed tumor (pleomorphic adenoma) of the breast: ultrastructural study and review of the literature. **J Surg Oncol**, v.36, n.1, p.58-63, Sep. 1987.
- 18 DARDICK, I. et al. Pleomorphic adenoma, I: Ultrastructural organization of "epithelial" regions. **Hum Pathol**, v.14, n.9, p.780-97, Sept. 1983.
- 19 DARDICK, I. et al. Pleomorphic adenoma, II: Ultrastructural organization of "stromal" regions. **Hum Pathol**, v.14, n.9, p.798-809, Sept. 1983.
- 20 DEGUCHI, H.; HAMANO, H.; HAYASHI, Y. C-myc, ras p21 and p53 expression in pleomorphic adenoma and its malignant form of the human salivary glands. **Acta Pathol Jpn**, v.43, n.7-8, p.413-22, July-Aug. 1993.
- 21 Dicionário eletrônico Houaiss da língua portuguesa 1.0. Dezembro, 2001, Instituto Antônio Houaiss, Ed. Objetiva Ltda. CD-ROM.
- 22 EL-NAGAR, A.K. et al. Concurrent cytogenetic , interphase fluorescence in situ hibridization and DNA flow cytometric analyses of a carcinoma ex-pleomorphic adenoma of parotid gland. **Cancer Genet Cytogenet**, v.107, n.2, p.132-6, Dec. 1998.
- 23 FÉLIX, A. et al. Laminin and collagen IV in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma: an immunohistochemical study. **Hum Pathol**, v.30, n.8, p.964-9, Aug. 1999.

- 24 FLISS, D.M. et al. Pleomorphic adenoma: a preliminary histopathologic comparison between tumors occurring in the deep and superficial lobes of the parotid gland. **Ear Nose Throat J**, v.71, n.6, p.254-7, June 1992.
- 25 FUJITA, S.; TAKAHASHI, H.; OKABE, H. Proliferative activity in normal salivary gland and pleomorphic adenoma. A study by argyrophilic nucleolar organizer region (AgNOR) staining. **Acta Pathol Jpn**, v.42, n.8, p.573-8, Aug. 1992.
- 26 GERRARD, D.J.; DONALDSON, D.R. Salivary pleomorphic adenoma in familial adenomatous polyposis. **J R Soc Med**, v.91, n.2, p.86-7, Feb. 1998.
- 27 GNEPP, D.R. Malignant mixed tumors of the salivary glands: a review. **Pathol Annu**, v.28, n.1, p.279-328, 1993.
- 28 HARADA, H. Histomorphological investigation regarding to malignant transformation of pleomorphic adenoma (so-called malignant mixed tumor) of the salivary gland origin: special reference to carcinosarcoma. **Kurume Med J**, v.47, n.4, p.307-23, 2000.
- 29 HARRISON, J.D.; AUGER, D.W. Mucosubstance histochemistry of pleomorphic adenoma of parotid and submandibular salivary glands of man: light and electron microscopy. **Histochem J**, v.23, n.7, p.293-302, July 1991.
- 30 HIEDA, Y.; IWAI, K.; MORITA, T.; NAKANISHI, Y. Mouse embryonic submandibular gland epithelium loses its tissue integrity during early branching morphogenesis. **Dev Dyn**, v.207, n.4, p.395-403, Dec. 1996.
- 31 INAGAWA, S. et al. Expression and prognostic roles of β -catenin in hepatocellular carcinoma: correlation with tumor progression and postoperative survival. **Clin Cancer Res**, v.8, n.2, p.450-6, Feb. 2002.
- 32 KAPLAN, D.D. et al. Identification of a role for beta-catenin in the establishment of a bipolar mitotic spindle. **J Biol Chem**, v.279, n.12, p.10829-32, Mar. 2004.
- 33 KAS, K. et al. Promoter swapping between the genes for a novel zinc finger protein and beta-catenin in pleiomorphic adenomas with t(3;8)(p21;q12) translocations. **Nat Genet**, v.15, n.2, p.170-4, Feb. 1997.
- 34 KIM, H.S. et al. Expression of β -catenin and E-cadherin in the adenoma-carcinoma sequence of the stomach. **Anticancer Res**, v.23, n.3, p.2863-8, May 2003.
- 35 KLIJANIENKO, J.; VIELH, P. Fine-needle sampling of salivary gland lesions. I. Cytology and histology correlation of 412 cases of pleomorphic adenoma. **Diagn Cytopathol**, v.14, n.3, p.195-200, May 1996.

- 36 KOOLS, P.F. et al. Identification of the chromosome 12 translocation breakpoint region of a pleomorphic salivary gland adenoma with t(1;12)(p22;q15) as the sole cytogenetic abnormality. **Cancer Genet Cytogenet**, v.79, n.1, p.1-7, Jan. 1995.
- 37 KORAL, K. et al. Recurrent pleomorphic adenoma of the parotid gland in pediatric and adult patients: value of multiple lesions as a diagnostic indicator. **AJR Am J Roentgenol**, v.180, n.4, p.1171-4, Apr. 2003.
- 38 LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, v.33, n.1, p.159-74, Mar. 1977.
- 39 LANGLOIS, C.C.; DEVILDOS, L.R. Adenoma pleomórfico. **Rev Bras Odontol**; v.25, n.142, p.423-7, July 1966.
- 40 LEE, C.M. et al. Beta-catenin nuclear localization is associated with grade in ovarian serous carcinoma. **Gynecol Oncol**, v.88, n.3, p.363-8, Mar. 2003.
- 41 LEONG, A.S.Y. Quantitation in immunohistology: fact or fiction? A discussion of variables that influence results. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v.12, n.1, p.1-7, Mar. 2004.
- 42 LEWIS, J.E.; OLSEN, K.D.; SEBO, T.J. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: pathologic analysis of 73 cases. **Hum Pathol**, v.32, n.6, p.596-604, June 2001.
- 43 LI, X. et al. Detection of numeric abnormalities of chromosome 17 and p53 deletions by fluorescence in situ hybridization in pleomorphic adenomas and carcinomas in pleomorphic adenoma. Correlation with p53 expression. **Cancer**, v.79, n.12, p.2314-9, June 1997.
- 44 LIANJIA, Y. et al. An immunohistochemical study of bone morphogenetic protein in pleomorphic adenoma of the salivary gland. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**, v.422, n.6, p.439-43, 1993.
- 45 LOPEZ-GONZALEZ, J.S. Localization and level of expression of beta-catenin in human laryngeal squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v.130, n.1, p.89-93, Jan. 2004.
- 46 MASUMURA, C. et al. Magnetic resonance imaging of pleomorphic adenoma arising from the external auditory canal. **J Laryngol Otol**, v.117, n.11, p.908-9, Nov. 2003.
- 47 MATSUSHITA, F. et al. Effects of acidic and basic fibroblast growth factors on cell proliferation in pleomorphic adenoma of the parotid gland. **Acta Otolaryngol**, v.117, n.4, p.634-9, July 1997.

-
- 48 MENICHELLA, D.M. et al. Protein zero is necessary for E-cadherin-mediated adherens junction formation in schwann cells. **Mol Cell Neurosc**, v.18, n.6, p.606-18, Dec. 2001.
- 49 MENKO, A.S. et al. Regulation of cadherin junctions during mouse submandibular gland development. **Dev Dyn**, v.224, n.3, p.321-33, July 2002.
- 50 MONAGHAN, H. et al. Adenomatous polyposis coli (APC), beta-catenin, and cadherin are expressed in human bone and cartilage. **Histopathology**, v.39, n.6, p.611-9, Dec 2001.
- 51 MORENO-BUENO, G. et al. Abnormalities of E- and P-cadherin and catenin (beta-, gamma-catenin, and p120ctn) expression in endometrial cancer and endometrial atypical hyperplasia. **J Pathol**, v.199, n.4, p.471-8, Apr. 2003.
- 52 MORI, M. et al. Immunolocalization of keratins in salivary gland pleomorphic adenoma using monoclonal antibodies. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.61, n.6, p.611-6, June 1986.
- 53 MORIO, T. et al. DNA copy number changes in carcinoma in pleomorphic adenoma of the salivary gland: A comparative genomic hybridization. **Pathol Int**, v.52, n.8, p.501-507. Aug. 2002.
- 54 MURATA, I.; MIYAJI, T. Histochemical evaluation of enzymatic activities in pleomorphic salivary adenoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.22, n.1, p. 82-90, July 1966.
- 55 NAGAFUCHI, A.; TAKEICHI, M. Cell binding function of E-cadherin is regulated by the cytoplasmic domain. **EMBO J**, v.7, n.12, p.3679-84, Dec. 1988.
- 56 NAGAO, K. et al. Histopathologic studies on carcinoma in pleomorphic adenoma of the parotid gland. **Cancer**, v.48, n.1, p.113-21, July 1981.
- 57 NAKAZATO, Y. et al. Localization of S-100 protein and glial fibrillary acidic protein-related antigen in pleomorphic adenoma of the salivary glands. **Lab Invest**, v.46, n.6, p.621-6, June 1982.
- 58 NASSER, S.M.; FAQUIN, W.C.; DAYAL, Y. Expression of androgen, estrogen, and progesterone receptors in salivary gland tumors. Frequent expression of androgen receptor in a subset of malignant salivary gland tumors. **Am J Clin Pathol**, v.119, n.6, p.801-6, June 2003.
- 59 NORRIS, A.L. et al. Characterization of the human β -catenin gene. **Mam Genome**, v.7, n.2, p.160-2, Feb. 1996.
- .

- 60 OHTAKÉ, S. et al. Precancerous foci in pleomorphic adenoma of the salivary gland: recognition of focal carcinoma and atypical tumor cells by P53 immunohistochemistry. **J Oral Pathol Med**, v.31, n.10, p.590-7, Nov. 2002.
- 61 OLSEN, K.D.; LEWIS, J.E. Carcinoma ex pleomorphic adenoma: a clinicopathologic review. **Head Neck**, v.23, n.9, p.705-12, Sept. 2001.
- 62 ORFORD, K.; ORFORD, C.C.; BYERS, S.W. Exogenous expression of beta-catenin regulates contact inhibition, anchorage-independent growth, anoikis, and radiation-induced cell cycle arrest. **J Cell Biol**, v.146, n.4, p.855-68, Aug. 1999.
- 63 OSTERHELD, M.C. et al. Beta-catenin expression and its association with prognostic factors in adenocarcinoma developed in Barrett esophagus. **Am J Clin Pathol**, v.117, n.3, p.451-6, Mar. 2002.
- 64 OZAWA, M.; BARIBAULT, H.; KEMLER, R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. **EMBO J**, v.8, n.6, p.1711-7, June 1989.
- 65 PERSCHBACHER, K.; JACKSON-BOETERS, L.; DALEY, T. The adhesion molecules NCAM, HCAM, PECAM-1 and ICAM-1 in normal salivary gland tissues and salivary gland malignancies. **J Oral Pathol Med**, v.33, n.4, p.230-6, Apr. 2004.
- 66 Pleomorphic. In: STEDMAN, T.L. **Stedman' Medical Dictionary**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989. 1215.
- 67 POLLACK, A.L. et al. Dynamics of beta-catenin interactions with APC protein regulate epithelial tubulogenesis. **J Cell Biol**, v.137, n.7, p.1651-62, June 1997.
- 68 Polymorphic. In: STEDMAN, T.L. **Stedman' Medical Dictionary**. Baltimore, Williams & Wilkins, 1989. 1235.
- 69 PUKKILA, M.J. et al. Nuclear beta catenin expression is related to unfavourable outcome in oropharyngeal and hypopharyngeal squamous cell carcinoma. **J Clin Pathol**, v.54, n.1, p.42-7, Jan. 2001.
- 70 RÖIJER, E. et al. Translocation, deletion/amplification and expression of HMGIC and MDM2 in a carcinoma ex pleomorphic adenoma. **Am J Pathol**, v.160, n.2, p.433-440, Feb. 2002.
- 71 RUBINFELD, B. et al. Stabilization of beta-catenin by genetic defects in melanoma cell lines. **Science**, v.275, n.5307, p.1790-2, Mar. 1997.

- 72 RYU, J.H. et al. Regulation of the chondrocyte phenotype by a β -catenin. **Development**, v.129, n.23, p.5541-50, Dec 2002.
- 73 SAKU, T. et al. Immunolocalization of basement membrane molecules in the stroma of salivary gland pleomorphic adenoma. **J Oral Pathol Med**, v.19, n.5, p.208-14, May 1990.
- 74 SALEH, E.R.; FRANÇA, C.M.; MARQUES, M.M. Neural adhesion molecule (N-CAM) in pleomorphic adenoma and carcinoma ex-pleomorphic adenoma. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.9, p.562-7, Oct. 2003.
- 75 SATO, K. et al Expression of beta-catenin in rat oral epithelial dysplasia induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Oral Oncol**, v.38, n.8, p.772-8, Dec. 2002.
- 76 SAVERA, A.T.; GOWN, A.M.; ZARBO, R.J. Immunolocalization of three novel smooth muscle-specific proteins in salivary gland pleomorphic adenoma: assessment of the morphogenetic role of myoepithelium. **Mod Pathol**, v.10, n.11, p.1093-100, Nov. 1997.
- 77 SEIFERT, G. Histological classification of salivary gland tumours. In:_____. **Histological typing of salivary gland tumours**. 2. ed. New York, 1991. p.9-38.
- 78 SEIFERT, G.; DONATH, K.; SCHÄFER, R. Lipomatous pleomorphic adenoma of the parotid gland. Classification of lipomatous tissue in salivary glands. **Pathol Res Pract**, v.195, n.4, p.247-52, 1999.
- 79 SEKINE, S. et al. Beta-catenin mutations in pulmonary blastomas: association with morule formation. **J Pathol**, v.200, n.2, p.214-21, June 2003.
- 80 SHIBUYA, Y. et al. Ultrastructural localization of E-cadherin and α -/ β -catenin in adenoid cystic carcinoma. **Histopathology**, v.35, n.5, p.423-32, Nov. 1999.
- 81 SHIEH, Y.S. et al. Cadherin and catenin expression in mucoepidermoid carcinoma: correlation with histopathologic grade, clinical stage, and patient outcome. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.5, p.297-304, May 2003.
- 82 SHIGEISHI, H. et al. Pleomorphic adenoma of the parotid gland with extensive bone formation. **Pathol Int**, v.51, n.11, p.883-6, Nov. 2001.
- 83 SPEIGHT, P.M.; BARRETT, A.W. Salivary gland tumours. **Oral Dis**, v.8, n.5, p.229-40, Sept. 2002.
- 84 SUGIO, K. et al. Micrometastasis in the bone marrow of patients with lung cancer associated with a reduced expression of E-cadherin and beta-catenin:

- risk assessment by immunohistochemistry. **Surgery**, v.131, n.1, p.226-31, Jan. 2002.
- 85 TAHLAN, A.; NANDA, A.; NAGARKAR, N.; BANSAL, S. Pleomorphic adenoma of the nasal septum: a case report. **Am J Otolaryngol**, v.25, n.2, p.118-20, Mar. 2004.
- 86 TAKEDA, Y. An immunohistochemical study of bizarre neoplastic cells in pleomorphic adenoma: its cytological nature and proliferative activity. **Pathol Int**, v.49, n.11, p.993-9, Nov. 1999.
- 87 TAKEUCHI, J. et al. Pleomorphic adenoma of the salivary gland. With special reference to histochemical and electron microscopic studies and biochemical analysis of glycosaminoglycans in vivo and in vitro. **Cancer**, v.36, n.5, p.1771-89, Nov. 1975.
- 88 TAKEUCHI, J. et al. Glycosaminoglycan-synthetic activity of pleomorphic adenoma. Adenoid cystic carcinoma and nonneoplastic tubuloacinar cells of the salivary gland. **Cancer**, v.42, n.1, p.202-8, July 1978.
- 89 TEJPAR, S., LI, C., YU, C. Tcf-3 expression and beta-catenin mediated transcriptional activation in aggressive fibromatosis (desmoid tumour). **Br J Cancer**, v.85, n.1, p. 98-101, July 2001.
- 90 TRIANTAFYLLOU, A.G. Histochemical detection of myoepithelial cells in pleomorphic adenoma with azophloxine and amidoblack. **J Oral Med**, v.41, n.3, p.184-8, July-Sept. 1986.
- 91 VESTWEBER, D.; KEMLER, R. Some structural and functional aspects of the cell adhesion molecule uvomorulin. **Cell Differ**, v.15, n.2/4, p.269-73, Dec. 1984.
- 92 VOZ, M.L. The recurrent translocation t(5;8)(p13;q12) in pleomorphic adenomas results in upregulation of PLAG1 gene expression under control of the LIFR promoter. **Oncogene**, v.16, n.11, p.1409-16, Mar. 1998.
- 93 VOZ, M.L. et al. PLAG1, the main translocation target in pleomorphic adenoma of the salivary glands, is a positive regulator of IGF-II. **Cancer Res**, v.60, n.1, p.106-13, Jan. 2000.
- 94 VOZ, M.L. et al. Microarray screening for target genes of the proto-oncogene PLAG1. **Oncogene**, v.23, n.1, p.179-91, Jan. 2004.
- 95 WEBER, A. et al. Alterations of the INK4a-ARF gene locus in pleomorphic adenoma of the parotid gland. **J Pathol**, v.198, n.3, p.326-34, Nov. 2002.
- 96 WILLIS, R.A. Epithelial tumours of the salivary glands. In:_____. **Pathology of Tumours**. London, Butterworth, 1948. p.320-41.
- .

- 97 XU, B. et al. Cribriform-morular variant of papillary thyroid carcinoma: a pathological and molecular genetic study with evidence of frequent somatic mutations in exon 3 of the beta-catenin gene. **J Pathol**, v.199, n.1, p.58-67, Jan. 2003.
- 98 XU, H. et al. Pleomorphic adenoma of the submandibular salivary glands with marked ossification. **J Oral Pathol Med**, v.32, n.8, p.499-501, Sept. 2003.
- 99 XUE, H. et al. Overexpression and amplification of c-myc and c-Ha-ras oncogenes in pleomorphic salivary adenoma. **Chin Med J (Engl)**, v.106, n.1, p.22-5, Jan. 1993.
- 100 YANG, L. et al. Comparison of proliferating cell nuclear antigen index in benign and malignant salivary pleomorphic adenoma. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v.30B, n.1, p.56-60, Jan. 1994.
- 101 ZHAO, M. et al. Immunohistochemical evaluation of the small and large proteoglycans in pleomorphic adenoma of salivary glands. **J Oral Pathol Med**, v.28, n.1, p.37-42, Jan. 1999.
- 102 ZHU X. et al. Aberrant expression of beta-catenin and mutation of exon 3 of the beta-catenin gene in renal and urothelial carcinomas. **Pathol Int**, v.50, n.12, p.945-52, Dec. 2000.

Abstract

ABSTRACT

EXPRESSION OF β -CATENIN IN CARCINOMA IN PLEOMORPHIC ADENOMA, PLEOMORPHIC ADENOMA AND SALIVARY GLAND: AN IMMUNOHISTOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL STUDY

Pleomorphic adenomas (PAs) are the most frequent type of salivary gland neoplasms, and their malignant counterpart, the carcinoma in pleomorphic adenomas (CPAs) arises much less commonly. β -catenin was originally identified on the basis of its association with cadherin adhesion molecules and has been implicated in carcinogenesis because it is frequently absent in human epithelial cancers. β -catenin also is significantly associated with the invasion and metastasis of carcinoma in the head and neck, esophagus and other organ. In this study we evaluated the morphological and clinical features of all the PAs and CPAs of the archives of the Department of Pathology at the Bauru Dental School of the University of São Paulo since 1963 until 2003. We also realized immunohistochemical analysis in formalin-fixed, paraffin embedded specimens of 10 salivary glands, 16 PAs and 3 CPAs by the avidin-biotin-peroxidase complex method. Our results showed that in both lesions the predominant gender was the feminine with age ranging between 3^a and 5^a decades in PA and 6^a and 7^a in CPA. The most commonly glands affected were located in the palate in both types of tumours. The more significant histopathological features in PAs were fibrohyaline stroma with epithelial cells organized in clusters and islands or ductal structures. In CPAs, squamous cell carcinomas were originated in all the cases. In the benign counterpart, there was fibrohyaline stroma with clear cells, squamous metaplasia, epithelial cells organized in clusters or acinic or ductal structures. All specimens have membranous and cytoplasmic immunostaining. Higher β -catenin index rates were seen mainly in ductal structures. The loss of expression of the protein in PAs was statistically significant when comparing with salivary glands ($p=0,008$) and there was cytoplasmic accumulation of the β -catenin in CPAs. Our experiment showed that the loss of β -catenin participates in the development of pleomorphic adenoma and that the cytoplasmic accumulation of the molecule takes part in the malignant transformation of the PA into CPA.

Apêndice

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru
Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)235-8000 – FAX (0XX14)223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa

Processo nº 111/2003

Bauru, 04 de novembro de 2003

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **“Estudo comparativo imuno-histoquímico da β -catenina em adenomas pleomorfos e glândulas salivares”**, de autoria de Renata Falchete do Prado, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação.

Na reunião de 29 de outubro de 2003 o parecer do relator, **aprovando o projeto**, foi aceito pelo Comitê, considerando que não existem infrações éticas pendentes.

Informamos que após o envio do trabalho concluído, este Comitê enviará o parecer final, que será utilizado para publicação do trabalho.

Atenciosamente,

Profª Drª Ana Lúcia Alves Capelozza
Coordenadora

Ilmº Sr. Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira
DD. Docente do Departamento de Estomatologia (Patologia)